

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
РЕСПУБЛИКАНСКОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ
имени С.Н. ВЫШЕЛЕССКОГО»

Международная научно-практическая конференция

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ НАУКИ

24 – 25 октября 2013 года

*90-летию
РУП «Институт экспериментальной
ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого»*

Минск 2013

УДК 619(06)
ББК 54.13
В 39

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

Редакционная коллегия:

А.А. Гусев (главный редактор), **М.В. Якубовский** (зам. главного редактора), **Е.В. Гусева** (секретарь), **Ю.В. Ломако**, **О.П. Ивашкевич**, **А.П. Лысенко**, **П.А. Красочко**, **И.В. Насонов**, **В.А. Бабак**.

Основные направления развития ветеринарной науки: материалы международной научно-практической конференции, посвящённой 90-летию РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», Минск, 24 – 25 октября 2013 г./РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского; под. ред. А.А. Гусева.–Минск, 2013.–392с.

В 39

Опубликованные материалы представляют собой результаты экспериментальных исследований по вирусным и микробным болезням сельскохозяйственных животных, по эпизоотологическим и диагностическим методам исследований, лечению и профилактики 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»

Объедков Г.А., доктор ветеринарных наук, профессор

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

**К ИСТОРИИ БЕЛОРУССКОГО РЕСПУБЛИКАНСКОГО
УНИТАРНОГО ПРЕДПРИЯТИЯ «ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕН-
ТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМ. С.Н. ВЫШЕЛЕССКОГО»
(К 90-ЛЕТИЮ)**

Исполнилось 90 лет РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», выполнявшему научно-исследовательскую функцию в составе государственной ветеринарной организации Республики Беларусь. Не следует переоценивать, но нельзя и недооценивать достигнутые успехи с учетом особенностей 20-го века, века многократных революционных социально-экономических разрывов, мировых и гражданских войн, способствующих возникновению и распространению болезней людей и животных. Нельзя также не учитывать географического места Беларуси – фактического эпицентра указанных событий.

В 1913 году в Витебске открыто первое на территории Беларуси диагностическое и научно-исследовательское учреждение – губернская земская ветеринарно-бактериологическая лаборатория, с 1919 г. – Витебская губернская ветеринарная лаборатория.

В 1922 году Витебская губернская ветеринарно-бактериологическая лаборатория была реорганизована в Витебский ветеринарно-бактериологический институт. Белорусский ветеринарно-бактериологический институт осуществлял производственную и научно-исследовательскую деятельность преимущественно в интересах республики.

Первым руководителем института стал Богдановский А.А. с 1922 по 1926 гг. и был освобожден от этой должности 1 декабря 1926 года по независящим от него обстоятельствам. Временно исполняющим обязанности директора Белорусского ветеринарно-бактериологического института был назначен А.С. Лубкин, заведующий сыровоточным отделом этого института. Лубкин А.С. исполнял обязанности директора Белорусского ветеринарно-бактериологического института с декабря 1926 по январь 1928 года.

С февраля 1928 года директором Белорусского ветеринарно-бактериологического института был назначен профессор Вышелесский Сергей Николаевич. Он организовал научно-исследовательскую работу по бруцеллезу, туберкулезу, сапу, ящуру, бешенству и продолжил исследования по сибирской язве, чуме и роже свиней, септицемии и холере

кур, пироплазмозу крупного рогатого скота и лошадей.

Кроме изучения эпизоотий, под руководством С.Н. Вышелесского осуществлялось производство биопрепаратов для диагностики, лечения и профилактики, в том числе туберкулина, маллеина, сыворотки против сибирской язвы, рожи, чумы свиней, холеры кур, бивалентной сыворотки против рожи и чумы свиней, вакцин против сибирской язвы Ценковского (1 и 2), антирабической эмульсии.

В результате эпизоотологических исследований и разработки ряда наставлений, инструкций по ликвидации и профилактике заболеваний, изготовления высококачественных по тому времени диагностических, лечебно-профилактических ветеринарных препаратов в 30-е годы в республике были ликвидированы такие особо опасные болезни, как чума и повальное воспаление легких крупного рогатого скота, сеп лошадей, сибирская язва, оспа, бешенство, чума, рожа свиней, холера птиц.

В 1928 году С.Н. Вышелеский был избран членом Витебского окружного Совета депутатов трудящихся, членом ЦИК Белорусской ССР, действительным членом Академии наук БССР, в 1940 году он получил звание заслуженного деятеля науки РСФСР, стал лауреатом Государственной премии.

С.Н. Вышелеский является, по выражению академика Я.Р. Коваленко, основоположником отечественной эпизоотологии, талантливым экспериментатором, педагогом, общественным деятелем, организатором крупных научных учреждений и выдающимся исследователем. Не было ни одной важной проблемы по эпизоотологии, в решении которой он не принимал бы участия. Он является автором и редактором более 140 научных работ и учебников.

В должности директора института Вышелеский С.Н. проработал до февраля 1930 года, когда по согласованию между НКЗ СССР и НКЗ БССР и его согласию был переведен на работу в ГИЭВ (Москва) (Ф,48.О.1, Д.3929. Л35).

После Вышелесского С.Н. директором Белорусского ветеринарно-бактериологического института 21 марта 1930 года по рекомендации Вышелесского С.Н. был назначен Крылов Василий Дмитриевич, работавший до того заведующим отделом военно-микробиологического ветеринарного института РККА в г. Ленинграде и одновременно ассистентом кафедры микробиологии Ленинградского ветеринарного института (Ф,48.О.1, Д.3929,Л36). Заместителем директора института работал ветврач Х.С. Горегляд. Крылов В. Д. принял ряд новых шагов в направлении развития научных исследований в институте, поскольку в нем еще превалировало производственное направление. Однако его намерения не были реализованы. С середины 1930 года началась реорганизация в ветеринарной отрасли СССР.

Постановлением Наркомзема СССР № 520 от 30.06.1930 года в

стране был организован Всесоюзный трест «Ветснабпром НКЗ СССР». В соответствии с этим последовало Постановление Коллегии НКЗ БССР № 368 от 27 сентября 1930 года о передаче с 1 октября производственной части Витебского ветеринарно-бактериологического института Ветснабпрому НКЗ СССР.

01.10.1930 на базе научно-исследовательской части Витебского ветеринарно-бактериологического института был организован Белорусский ветеринарный научно-исследовательский институт в г. Витебске, директором которого был назначен бывший директор Витебского ветеринарно-бактериологического института Крылов В. Д..

Далее Постановлением СНК БССР от 13.10 1930 года утверждается «Положение о Ветеринарном научно-исследовательском институте Белоруссии» в составе НКЗ БССР, который в научно-исследовательском и методологическом отношении подчиняется ВИЭВу. Структура института: эпизоотологический, паразитологический, санитарно-гигиенический, консультативно-диагностический (Ф,48.О.1, Д.3929, Л.186). Директором института с 5.10 1930 г. согласно Постановлению ЦК ВК(б) Белоруссии назначается Миловзоров (Ф.48.О.1.Д.3877.Л.184).

Однако в таком виде институт просуществовал только в течение двух лет, так как вскоре подвергся новой реорганизации. Постановлением СНК БССР № 118 от 7 марта 1932 года в соответствии с Постановлением Коллегии НКЗ БССР от 28 декабря 1931 года было вынесено решение «О реорганизации Витебского ветеринарного научно-исследовательского института» на три самостоятельных института и одну Зональную станцию:

- На базе Витебского ветеринарного научно-исследовательского института организовать Государственный Республиканский научно-исследовательский ветеринарный институт для изучения болезней крупного рогатого скота и лошадей с дислокацией в Витебске (директор института Давыдович);

- На базе Могилевской Зональной станции по изучению болезней свиней организовать Государственный Республиканский научно-исследовательский ветеринарный институт для изучения болезней свиней с дислокацией в Могилеве (директор института Горегляд);

- На базе Минской ветеринарно-бактериологической лаборатории организовать Государственный Республиканский научно-исследовательский ветеринарный институт санитарии и зоогигиены с дислокацией в Минске;

- На базе Гомельской ветеринарно-бактериологической лаборатории организовать Государственную Республиканскую научно-исследовательскую ветеринарную Зональную станцию для изучения болезней птиц и кроликов с дислокацией в Гомеле, с тем, чтобы в 1933 году она была реорганизована в НИИ институт для изучения болезней птиц и кроликов (Ф,48.О.1, Д. 4639, Л.2).

Указанным Постановлением СНК БССР № 118 от 7 марта 1932 года предусматривалось выделение НКЗ для реализации поставленных задач 200.000 рублей.

Если теперь, по истечении многих лет, подвергнуть непредубежденному анализу Постановление Коллегии НКЗ БССР № 368 от 27 сентября 1930 года, то следует признать, что фактически существовавший Белорусский ветеринарно-бактериологический институт был просто переименован в биофабрику. Как давно сложившийся единый организм он лишь условно делился на производственную и научно-исследовательскую части. Однако такое решение было сделано. И Крылов В.Д. определялся как директор двух организаций. Такое положение не могло практически существовать долго. Тем более, республике нужен был научно-исследовательский ветеринарный институт, потому что ее экономику давили эпизоотии. Вот почему не прошло и двух лет после Постановления об организации биофабрики, СНК БССР вновь 7 марта 1932 года вернулся к вопросу «О реорганизации Витебского ветеринарного научно-исследовательского института».

Далее следует подчеркнуть, что в обоих Постановлениях (Коллегии НКЗ БССР № 368 от 27 сентября 1930 года и СНК БССР № 118 от 7 марта 1932 года 7 марта 1932 года) речь идет «О реорганизации Витебского ветеринарного научно-исследовательского института». Но такого института в тот период уже не было. А был Белорусский ветеринарно-бактериологический институт с дислокацией в г. Витебске. Не трудно заметить сознательную замену наименования института «Витебский» вместо «Белорусский» в тот период времени, потому что это противоречило бы документу о перечне организаций, составленных «Ветснабпром НКЗ СССР», подписанных Н.И. Ежовым.

Анализ архивных документов показал, что фактически были созданы четыре ветеринарные научно-исследовательские организации. Доказательством тому является представление НКЗ БССР о плане работ на 1933 – 1935 гг., хотя Горегляд Х.С. жаловался в пояснительной записке Наркомзему БССР о том, что ни один сотрудник из Витебска не приехал на работу в Могилев.

О состоянии вновь организованных институтов в последующие годы документов обнаружить не удалось.

В 1937 г. Белорусский ветеринарно-бактериологический институт разделили на два самостоятельных объекта: Витебскую биофабрику со своим директором и Белорусскую научно-исследовательскую ветеринарную опытную станцию (БелНИВОС) со своим директором с дислокацией по одному и тому же адресу.

О деятельности этих организаций в период вплоть до 1945 г. архивные документы также не сохранились.

В 1945 – 1946 гг. БелНИВОС была восстановлена в составе 6 отделов

с 27 научными сотрудниками, 7 из которых - кандидаты ветеринарных наук.

Директором БелНИВОС в 1945–1956 гг. был кандидат ветеринарных наук Таровердов Л. Н., заместителем директора по научной части, кандидат ветеринарных наук Акрамовский М.Н. (Ф.48. О.-9. Д-384). Изучались инфекционные и паразитарные заболевания лошадей, крупного рогатого скота, свиней: туберкулез, бруцеллез, чума, рожа, си-бирская язва, ящур, бешенство, диктиокаулез. К 1950 году в республике была восстановлена сеть ветеринарных учреждений, а также Витебская биофабрика, сосуществовавшая с институтом на одной и той же территории, – Юрьева Горка.

Организованная работа государственной ветеринарной службы в республике позволила улучшить в первую очередь диагностическую работу. В 1956 – 1959 годы были проведены исследования по диагностике хронических инфекций сельскохозяйственных животных. Определены и картированы неблагополучные пункты по экономически значимым эпизоотиям, в том числе бруцеллез крупного рогатого скота (1113), бруцеллез свиней (65), бруцеллез овец (175), туберкулез крупного рогатого скота (854), туберкулез свиней (143), пуллуроз, кокцидиоз птиц (243), бешенство крупного рогатого скота (75), сибирская язва (23), ящур (13), рожа свиней 1400 пунктов, фасциолез ежегодно в среднем по 200 хозяйств, диктиокаулез – по 400– 500, подкожно-оводовая инвазия, аскаридоз – по 300, лептоспироз – по 100, чума свиней – по 90 хозяйств.

В этот период, несмотря на 10-летний срок после окончания войны, в республике не было достигнуто довоенного уровня поголовья крупного рогатого скота, свиней, овец и птицы. Кроме того, распространенные эпизоотии тормозили развитие животноводства в республике, а имеющееся поголовье сельскохозяйственных животных было малопродуктивным. Перед руководящими органами республики встала задача по научному обеспечению ведения животноводства и ликвидации экономически значимых эпизоотий.

Поэтому еще в 1949 году в республике в структуре Академии наук БССР создается Белорусский научно-исследовательский институт животноводства с отделом ветеринарии, возглавляемым доктором ветеринарных наук, профессором действительным членом АН БССР, заслуженным деятелем науки БССР Х.С. Гореглядом.

В 1956 году на основании Постановления ЦК КПСС и СМ СССР от 14.02.1956 № 253 и приказа МСХ СССР от 8.03.1956 г. № 87 на базе Белорусской (Витебской) НИВОС и отдела ветеринарии АН БССР был организован, т. е. фактически возрожден БелНИВИ во главе с доктором ветеринарных наук, профессором, заслуженным деятелем науки БССР Моисеем Калининковичем Юсковцом.

Заместителем директора по научной работе работал по 1958 г. Х.С. Горегляд. С 1959 г. по 1978 г. он являлся заведующим отделом санитарии и зоогигиены. Под руководством Х.С. Горегляда было выполнено 30

кандидатских и 6 докторских диссертаций: Богуш А.А., Линник В.Я., Скибо В.Н., Пышко И.И., Зенькович Е.М., Ямщиков П.М., Иванов Н.П., Красиков С.А., Герасимович М. М., Мозоль Е.П., Якубов В.Н.

Несмотря на решение об организации института в г.Минске в 1956 г., фактическое объединение произошло только в 1962 году, когда институту была выделена рабочая и жилая площади в пос. Курасовщина. В то время из Витебска в Минск переехали кандидаты ветеринарных наук Мордасов П.М., Егоров Ю.П., Крайнова В.И. С 1959 г. в институте работали к.в.н. Григорьев И. Ф., Гавриченков А.И., Карягин В.И..

С 1958 по 1960 гг. заместителем директора по научной работе работал профессор Голубев И.Е.. Ученым секретарем института с 1956 по 1958 г. работал Жариков Иван Семенович, а с 1959 г. – Шмулевич Ш. С.. С этого времени основная деятельность института была направлена на изучение и ликвидацию эпизоотий туберкулеза и бруцеллеза, других острых и хронических болезней крупного рогатого скота, эпизоотий свиней, паразитозов животных и птиц, зоогигиену, ветеринарно-санитарный надзор на всех этапах пищевой цепи производства продуктов питания и сырья животного происхождения в Беларуси.

С 1959 года М.К. Юсовец сосредоточил свою работу в Академии сельскохозяйственных наук БССР, оставив в институте своими последователями кандидатов ветеринарных наук Н.А. Ковалева, А.Т. Кофейникова, профессора Р.В.Тузову Е.И. Иванову, В.А. Сюсюкина. Рядовыми исследователями эпизоотий туберкулеза и бруцеллеза животных в республике после М.К.Юсовца остались кандидаты ветеринарных наук И.В.Васильченко, П.К.Гульев, Г.А.Объедков.

В 1959 г. директором БелНИВИ был назначен доктор ветеринарных наук, профессор Роман Семенович Чеботарев, избранный в 1959 году академиком Академии сельскохозяйственных наук БССР, в 1961 году – академиком Академии наук БССР.

Заместителем директора по научной работе с 1960 г. работал кандидат ветеринарных наук, доцент Демидов В.А, ученым секретарем продолжал оставаться Ш.С. Шмулевич. Чеботарев Р.С. возглавлял в институте отдел паразитологии, им была разработана методика изучения паразитологической ситуации в республике, а также система мероприятий по борьбе с паразитами сельскохозяйственных животных и человека, были изданы три монографии. Р.С.Чеботарев воспитал докторами и кандидатами ветеринарных наук: И.С. Жарикова, Л.Ф.Головневу, Н.К.Слепнева, И.В. Сафронова, Г.Ф., Когана, Г.П. Дубовицкого, М.А. Гузенка, В.Р. Гобзема, В.М. Мацуева, А.А. Кашникова, Н.В. Пахолкину.

Демидов В.А. курировал тематику НИР по инфекционному профилю и с коллективом научных сотрудников кандидатами ветеринарных наук Григорьевым И.Ф., Гавриченковым А.А., В.И. Крайновой, В.С. Азаренко, В.С. Майоровым, В. П. Голубничим занимался изучением чумы, инфекци-

онного атрофического ринита, лептоспироза свиней, разработкой мер специфической и неспецифической профилактики этих болезней. В итоге им была организована лаборатория вирусологии. С 1961 года проблемой вибриозов занималась Р.И. Евсейченко.

С 1968 по 1988 гг. директором БелНИВИ был Иван Семенович Жариков, доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный деятель науки БССР.

Под научным руководством И.С.Жарикова подготовлено 10 докторов и кандидатов ветеринарных наук (М.В. Якубовский, Р.Г. Баширов, И.И. Гудименко, Л.Ф. Головнева А.Е. Антоненко, С.С. Липницкий, С.И. Петренко, М.А. Ананчиков, С.И. Лавор, А.И. Антоненков, И.А. Антоненков).

Заместителями директора по научной работе института работали кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник Объедков Г.А. (1968 – 1984 гг., куратор тематики НИР по инфекционной патологии) и в течение 1973 – 1998 годов – кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник Д. П. Иванов (куратор тематики НИР по незаразной патологии).

С 1985 г. заместителем директора по научной работе стал кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник Антоненко Алексей Евдокимович.

Ученым секретарем в этот период работала кандидат ветеринарных наук Л. Ф. Головнева (1968–1998).

В течение 1968 – 1980 гг. в институте значительно возросло качество научно-исследовательских работ, а также были организованы лаборатории биохимии, обмена веществ, химиопрофилактики, по изучению болезней птиц и пчел, болезней рыб и пушных зверей, лейкозов.

Объедков Г. А. с 1957 г. работал в отделе по изучению бруцеллеза, а с 1968 по 1995 г. заведовал отделом по изучению туберкулеза и бруцеллеза животных. В руководимом им коллективе было защищено 8 кандидатских (Л.М. Луцевич, А.А. Солонко, Г.А. Карпова, В.А. Сюсюкин, З.П. Ровнейко, А.П. Лысенко, И.И. Румачик, В.А. Летецкий, А.А. Холод) и 2 докторские диссертации (А.А. Солонко, Г.А. Объедков). Это был наиболее трудный период работы, завершившийся ликвидацией в Республике Беларусь эпизоотий бруцеллеза и туберкулеза крупного рогатого скота, свиней, овец. Объедков Г.А. является автором 165 научных статей, 4-х монографий, одного патента на изобретение.

Иванов Д.П. проводил исследования по разработке средств и методов профилактики и лечения болезней микроэлементной, витаминной недостаточностей и респираторных болезней свиней. Им воспитаны такие известные ученые, как доктор ветеринарных наук, профессор Н.Н. Андросик, кандидаты ветеринарных наук П.М. Шешко, М.П. Кучинский, Н.Г. Золотова и др.

Антоненко А. Е., курировал тематику НИР по инфекционной патологии и заведовал отделом радиологии, автор 99 научных статей. В этом же отделе работали доктор биологических наук Кенигсберг Я.Э., кандидат биологических наук Петрова В.П..

Во вновь организованном отделе по изучению бактериальных болезней работали доктор ветеринарных наук, профессор Леньков В.И., д. в. н. Музычин С.И., к. в. н. Дереза А.Ф. и позже – к. в. н. Битюков П.А., д. в. н. Геведзе В.И., д. в. н. Ленькова В.И., к. в. н. Карышева А.Ф., к. в. н. Д.В. Бучукури, а в отделе по изучению незаразных болезней работали кандидаты ветеринарных наук Иванов А.Ф., Панковец Е.А., Малиновский И.Ф., Сенькин М.М., Пилуй А.Ф., Лапо Л. В., Иванов В.Е., Володкович М. М.

В отделе по изучению болезней птиц, рыб и пушных зверей – кандидаты ветеринарных наук Хруцкий А.Е., Дереза А.Ф., Бойко В.П..

Постановлением Совета Министров СССР № 149 от 1 марта 1974 года Белорусский научно-исследовательский ветеринарный институт переименовывается в Белорусский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени С.Н. Вышеселского с награждением Почетной грамотой Верховного Совета БССР.

В 1988 году директором института был избран доктор ветеринарных наук, профессор Н.А. Ковалев, в 1992 г. он был избран членом-корреспондентом, а в 1994 г. – действительным членом (академиком) Академии аграрных наук Республики Беларусь. В 2003 году он избран академиком Национальной академии наук Беларуси и почетным профессором Витебской государственной ордена «Знак Почёта» академии ветеринарной медицины. Он является автором или соавтором около 30 диагностикумов, вакцин и лечебных препаратов.

Под руководством Н. А. Ковалева подготовлено 6 докторов и 28 кандидатов ветеринарных и биологических наук: А.С. Шашенько, А.С. Ястребов, М.М. Плетнева, Т.И. Помирко, В.С. Майоров, В.А. Кирпиченок, В.Т. Сакович, В.П. Остапчук, В.П. Давыденко, Л.В. Белянко, И.И. Уласович, В.В. Шимко, В.Р. Бобрович, А.В. Шаломскас, С.Г. Соколов, С.А. Гайтамонова, Д.В. Бучукури, Т.А. Савельева, А.П. Свиридова, М.Г. Николаишвили, И.А. Красочко, А.А. Русинович, А.М. Бычковский, Л.С. Кашко, Л.Д. Андросик, В.М. Мосин, Т.В. Белявская, С.М. Усов и доктора наук: С.И. Музычин, А.И. Ерошов, В.А. Кирпиченок.

Заместителям директора по научной работе, курирующим НИР по инфекционному профилю, был с 1988 по 1990 год С. И. Музычин, который в 1967 г. защитил кандидатскую, а в 1989 г. – докторскую диссертацию. С. И. Музычин является автором 2-х изобретений, одной монографии и 62 научных статей.

Заместителем директора по научной работе, курирующим НИР по незаразному профилю и радиологии и одновременно заведующим лабораторией ветеринарной гигиены и терапии был с 1988 по 1990 год Е.А Пан-

ковец – кандидат ветеринарных наук автор ряда ветеринарных препаратов, обеспечивающих снижение содержания тяжелых металлов и радионуклидов в организме животных и продуктах питания.

Ученым секретарем института с 1987 по 1998 гг. года был ведущий специалист по проблеме воспроизводства сельскохозяйственных животных, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник А. Г. Ботяновский.

С 1994 по 1999 год заместителем директора по НИР, курирующим работу отделов и лабораторий инфекционного профиля, работал доктор ветеринарных наук А.П.Лысенко, который одновременно являлся заведующим лабораторией туберкулеза.

С 1999 года директором БелНИИЭВ им. С.Н. Вышелесского стал доктор ветеринарных наук, профессор, академик ААН Беларуси Н.Н. Андросик.

Н.Н. Андросик является автором 177 научных работ, в том числе одной монографии, 6 книг, двух авторских свидетельств на изобретения и 5 удостоверений на рационализаторские предложения. Основал новое научное направление исследований по изучению малоизвестных и неизвестных болезней сельскохозяйственных животных бактериальной этиологии, разработке методов их диагностики, профилактики и лечения.

Под руководством Н.Н. Андросика разработаны вакцины против микоплазмоза, гемофилёзного полисерозита и актинобациллярной плевропневмонии свиней, легочного пастереллеза крупного рогатого скота и свиней, диагностикумы микоплазмоза свиней и ряд других. Он являлся консультантом одной докторской (В.В. Максимович) и руководителем более 10 кандидатских диссертаций (Ю. Шюгждайте, Ю.Г. Лях, Л.В. Курлович, Ю.В. Ломако, А.А. Букин, Г.Е. Толяронок, М. М. Мистейко, А. Ю. Финогенов, И. А. Стрельченя, О. А. Лукин).

После распада СССР численный состав института в 2000–2006 гг. сократился до 163 человек, 88 из которых были научными сотрудниками (8 докторов и 46 кандидатов наук).

С июля 2003 по апрель 2007 гг. директором института был доктор ветеринарных наук А.П.Лысенко, являвшийся одновременно заведующим лабораторией туберкулеза.

А.П.Лысенко – автор 307 научных статей, одного учебника, 3-х справочников, патентов на изобретения, подготовил одного доктора и 7 кандидатов наук: И.И. Румачика, Т.Н. Агеева, Н.А. Кузнецова, А.Н. Притыченко.

В 2004 году в связи с суверенитетом Республики Беларусь БелНИИЭВ им. С. Н. Вышелесского получает статус и название Республиканское Унитарное Предприятие «Институт экспериментальной ветеринарии имени С.Н.Вышелесского» в составе Республиканского предприятия «Научно-практический Центр Национальной Академии Наук по

животноводству Республики Беларусь».

В этот период заместителем директора по научной работе, курирующим НИР инфекционного профиля, становится Бирман Борис Яковлевич, являясь одновременно заведующим отделом по изучению болезней птиц. Бирман Борис Яковлевич – доктор ветеринарных наук, автор 319 научных статей, 5 монографий, 13 ТНПА, 15 патентов. В настоящее время этот отдел возглавляет доктор ветеринарных наук Насонов И.В..

В этот же период резко меняется направление деятельности ветеринарной науки. Ее задачей становится разработка собственных (республиканских) диагностических, лечебных, профилактических средств, создание материально-технической базы для их производства. Решать эти задачи приходилось в условиях резкого дефицита государственного финансирования и невозможности рыночных отношений с колхозами и совхозами, как организациями социалистического склада.

С мая 2007 года директором РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» назначен доктор ветеринарных наук, профессор, член – корреспондент РАСХН, академик РАЕН Гусев Анатолий Алексеевич. Имея большой опыт организаторской, научно-исследовательской, общественной и политической работы, Гусев А.А. сразу же перестроил ранее сложившуюся структуру института, стиль производственных взаимоотношений и моральный климат в коллективе. Проведенная перестройка соответствовала целям и задачам совершенствования ветеринарии и всего сельского хозяйства республики, предусмотренной «Программой возрождения села Республики Беларусь на 2006 – 2015 годы».

В первую очередь работа была направлена на **организацию в институте мониторинговых исследований** наиболее опасных и экономически значимых болезней, распространенных в Беларуси, **создание коллекции референтных штаммов** вирусов и микробов, **разработку ТНПА** (ТУ, Технологические регламенты по изготовлению, Инструкции по применению) специфических средств профилактики наиболее опасных и экономически значимых болезней (перечень вакцин крс, свиней, птиц, др. животных); **подготовку и воспитание кадров молодых ученых, совершенствование внутриреспубликанских и межгосударственных связей, координацию научно-исследовательских работ и патентно-информационных исследований.**

Огромная работа была проделана Гусевым А.А. и сотрудниками института по реконструкции и модернизации Витебской биофабрики и, в дальнейшем, по ее запуску.

Гусев А.А. – автор 355 научных статей, 2 монографий, 57 патентов на изобретения, руководитель 37 докторских и кандидатских диссертаций.

Заместителем директора по научной работе, координации и внедрению НИР с 2011 года является профессор Красочко Петр Альбинович, автор 800 научных статей, 22 монографий, справочников и учебников,

35 изобретений.

Заместителем директора по научной работе и инновациям с 2007 года является доктор ветеринарных наук, Кучинский Михаил Павлович – автор 173 научных статей, 10 монографий, справочников, учебников, 10 патентов на изобретения,

Ученым секретарем института является доктор ветеринарных наук, профессор Красочко Ирина Александровна, автор 146 научных статей, 10 методических рекомендаций, 8 патентов на изобретения.

В настоящее время РУП «ИЭВ им.С.Н. Вышелесского» осуществляет координацию научных исследований по ветеринарии в Беларуси. Научные исследования проводятся в комплексе с исследовательскими учреждениями и учебными заведениями республики, в том числе НАН Беларуси, Минздрава республики, Витебской ордена «Знак Почета» государственной академии ветеринарной медицины, Гродненского сельскохозяйственного университета.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии имени С.Н. Вышелесского» организует и проводит научно-исследовательскую, экспериментальную, технологическую работу в области инновационной и производственной деятельности по наиболее актуальным проблемам животноводства, птицеводства, звероводства, рыбоводства, пчеловодства, а также ведёт подготовку совместно с учебными организациями республики научно-педагогических кадров высшей квалификации – кандидатов и докторов наук, определяющих научно-технический прогресс.

Аксенов А.М., директор

Русинович А.А., доктор ветеринарных наук, начальник отдела

ГУ «Белгосветцентр», г. Минск

ВЕТЕРИНАРНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ПО ОБЕСПЕЧЕНИЮ ЭПИЗООТИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ И БЕЗОПАСНОСТИ ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО СЫРЬЯ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Для нормального развития человечество нашей планеты должно ежегодно потреблять около 2,2 млрд. тонн молока и около 440 млн. тонн мяса.

Проблема обеспечения населения продовольствием животного происхождения особенно остро ощущается в отдельных регионах Африки, Азии, Латинской Америки. В настоящее время на планете значительная часть людей испытывают недостаток в продуктах питания, более того определенная их часть голодает.

Вместе с тем, в развитых странах наблюдается его перепроизводство. Основными экспортерами животноводческой продукции являются страны Европейского сообщества, США, Китай, Бразилия и некоторые другие.

Увеличение объемов производства и торговли продовольствием будет наблюдаться и в будущем. Причем значительные его объемы будут в Китае, юго-восточной Азии, Латинской Америке и традиционных регионах – в Европе, Северной Америке.

Основными необходимыми условиями успешной торговли и конкуренции продовольственным сырьем и продуктами животного происхождения являются их цена, качество и безопасность. Из этих характеристик наибольшую значимость имеет их безопасность.

В последние годы в современном мире по этому направлению деятельности сформировались определенные тенденции, которые оказывают серьезное влияние на успешное развитие бизнеса, в частности: опережающий рост народонаселения планеты по сравнению с приростом производства и сбытом продовольствия порождает серьезный дефицит последнего. Как следствие, на планете в настоящее время почти 2 млрд. чел. страдает от недоедания и несбалансированного питания и около 700 млн. человек голодают [6]. В связи с этим, в перспективе прогнозируется постоянное увеличение в мире спроса на продовольствие с соответствующим ростом цен ежегодно увеличиваются объемы экспортно-импортных операций с продовольственным сырьем и пищевыми продуктами животного происхождения и скорости их совершения на больших пространствах. В случае возникновения инцидентов, вызванных вредными факторами (физические, химические

и биологические опасности) этих товаров, как правило, последствия бывают значительными.

Как известно, животные могут передавать человеку более 150 болезней из них лошади – более 50, крупный рогатый скот – более 50, свиньи – 45–50, собаки, кошки – 60–65, птица – 25–30; болезни, опасные для человека и домашних животных, передают также дикие животные, рыбы, рептилии и т.д. У различных видов животных можно найти до 60% патогенных микроорганизмов человека [8].

Высокие скорости в совершении экспортно-импортных операций по продовольственному сырью и пищевым продуктам животного происхождения создают условия для возникновения вспышек инфекций. В 2002г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) по причине регистрируемых вспышек листериоза назвала безопасность продуктов питания приоритетным вопросом для потребителей, производителей и государственных органов. Птичий грипп, ящур, африканская чума свиней, губкообразная энцефалопатия (BSE) и другие биологические инциденты подтверждают развитие этой нежелательной тенденции.

Серьезную опасность для здоровья человека представляют химические вещества, особенно использование в животноводстве гормональных препаратов, лекарственных веществ без соблюдения сроков их выведения из организма животных и т.н. химические загрязнители (хлор-, фосфорорганические соединения и др.). Последние события, связанные с наличием диоксина в ирландской свинине, меламина в китайском молоке, технической поваренной соли в польской мясной продукции и ряд других, свидетельствуют о проблемах в области безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов животного происхождения. Более того, это не спорадические случаи, а широкомасштабные инциденты, как в пространстве, так и во времени;

- несмотря на то, что правительства многих стран мира приняли и осуществляют программы по развитию биоэнергетики, предполагая за этим будущее в обеспечении населения продуктами питания, пока нет однозначного мнения по использованию пищевых продуктов, содержащих генетически модифицированные ингредиенты;

- в последние годы в мире, особенно в странах с развитой животноводческой отраслью и соответствующей перерабатывающей промышленностью, придается предпочтение производству т.н. умной пище (Smart Food) – безопасной, разнообразной, аппетитной, научно обоснованной и прослеживаемой по всей пищевой цепи.

Перечисленные тенденции обуславливают необходимость совершенствования деятельности официальных органов по контролю/надзору за качеством и безопасностью продовольственного сырья и пищевых продуктов, как производимых внутри страны, так и импортируемых. Если раньше основной целью этих органов являлось обнаружение фальсифицированных пище-

вых продуктов, то в настоящее время внимание сконцентрировано на их безопасности во всех аспектах, включая микробиологический и токсикологический контроль на всех этапах производства, транспортировки, хранения и реализации продукции [4, 5, 6]. Вместе с тем, последние т.н. «конино-говядинные» инциденты в странах ЕС также требуют осуществления соответствующего контроля со стороны государственных служб за качественными показателями продовольственного сырья и пищевых продуктов. Все-го в "мясной скандал" было втянуто 27 стран, в том числе и Россия, где конина была обнаружена не только в импортной продукции, но и в колбасных изделиях отечественного производства. После громких скандалов с подменной говядины кониной и дорогих видов рыбы более дешевыми аналогами Евросоюз (ЕС) предлагает кардинально изменить законодательство о качестве и безопасности пищевой продукции. Вероятно, производители и поставщики пищевой продукции более часто будут подвергаться внезапным проверкам со стороны контролирующих органов. В Россельхознадзоре также считают, что реформа мониторинга безопасности продуктов необходима и в России [3].

Важное значение этому направлению деятельности придают и соответствующие международные организации.

Так, среднесрочным стратегическим планом ВОЗ на 2008 – 2013 годы предусматривалось проведение мероприятий, направленных на улучшение питания, безопасность пищевых продуктов и продовольственную безопасность с целью поддержки общественного здравоохранения и устойчивого развития населения. Аналогичные цели предусмотрены деятельностью Сельскохозяйственной и продовольственной организации ООН (ФАО), Международного эпизоотического бюро (МЭБ) и др.

Международная практика свидетельствует о необходимости создания государством системы обеспечения безопасности продовольствия. Прежде всего – разработка и реализация законодательства и создание соответствующих структур по этому направлению деятельности.

Природно-географические, социально-экономические и ряд других условий Республики Беларусь, позволяют не только полностью обеспечивать собственное населения продовольствием животного происхождения, но даже значительную часть его экспортировать. В 2012 году только в Российскую Федерацию экспортировано 4,16 млн. тонн молока и молочных продуктов и 352, 8 тыс. тонн мяса и мясных продуктов [1].

Политикой государства на перспективу определено увеличение производства и экспорта продовольственного сырья и пищевых продуктов животного происхождения.

Агропромышленный комплекс Беларуси стал важным источником поступления валюты в страну. Экспорт продовольствия в период с 2005 по 2012 годы увеличился более чем в 3 раза и составил в 2012 году около 5 млрд. долларов США. Вклад продовольственных товаров в общий объем

товарного экспорта Беларуси составляет около 10%.

Программой социально-экономического развития Республики Беларусь на 2011–2015 годы, утвержденной Указом Президента Республики Беларусь от 11 апреля 2011 года № 136, предусмотрено увеличить производство сельскохозяйственной продукции на 39–45 процентов и довести ее экспорт до уровня не ниже 7,2 млрд. долларов США.

Действующая в стране система позволяет производить продукцию гарантированного качества и безопасности, которые обеспечиваются существующими в республике правовыми, организационными и социальными основами, направленными на использование безопасного сырья и добавок, используемых для их производства, гигиену и технологию производства, а также систему контроля санитарно-гигиенических условий, технологии производства, показателей качества и безопасности сырья, вспомогательных материалов и готовой продукции по принципу «от поля до стола».

Ветеринарная деятельность согласно национальному ветеринарному законодательству направлена на охрану здоровья животных, защиту людей от болезней общих для человека и животных (болезней, передаваемых через животных, продукты животного происхождения), контроль за обеспечением выпуска доброкачественных в ветеринарно-санитарном отношении продуктов животного происхождения, кормов и кормовых добавок, диагностических, профилактических и лечебных средств, изготавливаемых в республике или ввозимых из других стран и используемых в животноводстве, а также определяют меру ответственности всех участников этого направления деятельности.

Существующая структура ветеринарной службы республики построена по территориально административному принципу с административной подчиненностью субъектам собственности, а по специальным вопросам – государственной ветеринарной службе по вертикали с общей ее численностью около 8000 специалистов. Центральный орган управления ветеринарным делом в стране представлен Департаментом ветеринарного и продовольственного надзора со штатной численностью 33 человек, в том числе 14 ветеринарных специалистов, занятых в сфере ветеринарной деятельности, 13 специалистов, выполняющих функции в области фитосанитарного контроля и качества продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также 6 специалистов вспомогательного персонала.

Объектами государственного ветеринарного надзора и ветеринарной деятельности в настоящее время являются организации по выращиванию животных, производству, переработке, транспортировке, в том числе и при экспортно-импортных операциях, хранению и реализации продукции животного происхождения с общим количеством более 13,5 тысяч.

В сферу деятельности ветеринарной службы входит более 2 млн. подворий на селе, где выращиваются домашние животные, птица, рыба, пчелы, а также ветеринарные объекты Министерства обороны, Министерства внут-

ренных дел, Комитета пограничных войск и др. Кроме этого, у жителей городов содержатся домашние животные, декоративная птица и экзотические живые существа, которые тоже обслуживаются ветеринарными специалистами.

Ныне действующее ветеринарное законодательство Республики Беларусь базируется на законодательстве бывшего Союза ССР, которое было представлено соответствующим законом и 642 нормативными правовыми актами с общим количеством более 2700 страниц типографского шрифта.

Исполнение ветеринарного дела осуществлялось государственной и ведомственной ветеринарными службами. Эффективность ее работы подтверждена ликвидацией в стране массовых эпизоотий ряда опасных болезней списка МЭБ и обеспечением выпуска безопасных в ветеринарно-санитарном отношении продуктов животного происхождения. К 1990 году СССР, занимая 1/6 часть суши земного шара, был одним из наиболее благополучных в ветеринарно-санитарном отношении регионов нашей планеты.

В настоящее время разработанные нормативные правовые документы в республике приведены в соответствие международным требованиям, с 2005 года реализуется ежегодная программа контроля вредных веществ и их остатков у живых животных и продукции животного происхождения. В программу на 2013 включено 726 показателей (с учетом матриц).

Установлены и осуществляются контакты с соответствующими службами ФАО, МЭБ, Европейского союза и стран торговых партнеров.

Основу эпизоотического благополучия страны и решения предусмотренных ныне действующим Законом задач составляет ежегодный План противоэпизоотических мероприятий и соответствующие программы по их реализации. Их планирование осуществляется согласно общепринятым принципам на основании эпизоотической ситуации в стране, мире и странах торговых партнеров. В план ежегодно в зависимости от ситуации включается около 80 противоэпизоотических мероприятий. Финансирование ветеринарной деятельности проводится в соответствии действующему в республике законодательству. Одним из примеров выполнения противоэпизоотических мероприятий и обеспечения эпизоотического благополучия может служить реализация Программы государственного ветеринарно-санитарного контроля сальмонеллеза в птицеводческих организациях Республики Беларусь на 2010 – 2013 годы. В программу включены все виды домашней птицы по направлениям ее промышленного выращивания. Только за 2012 год исследовано 37018 проб, отобранных на запланированных объектах контроля, и выявлено 10 положительных случаев сальмонеллеза (0,027%).

Ежегодно выполняется около 1 млрд различного рода ветеринарных обработок, 10 млн. диагностических исследований, 55 млн. ветеринарно-санитарных экспертиз.

Как результат проводимой работы, в стране обеспечено стойкое благополучие по таким опасным заболеваниям, как ящур, сибирская язва, бруцеллез, чума свиней и ряду других особо опасных заразных болезней списка МЭБ. Ликвидирована эпизоотия лейкоза крупного рогатого скота. Подтверждением надежности ветеринарного законодательства, структуры ветеринарной службы и ее управляемости при исполнении ветеринарного дела является благополучие по высокопатогенному гриппу птиц. Несмотря на сложную эпизоотическую ситуацию в мире и странах соседей по этой инфекции в 2005–2012 гг. и при весенней миграции птицы в текущем году, проводимыми мероприятиями болезнь на территорию республики не допущена. Кроме этого, в отчёте МЭБ за 2005 год в состав которого входит Республика Беларусь, подтверждены результаты эффективности работы ветеринарной службы, а также в 2006 году получены сертификаты МЭБ о признании благополучия Республики Беларусь по ящуру без вакцинации и чуме крупного рогатого скота. В ближайшее время будет получен соответствующий сертификат и по BSE.

Минсельхозпродом Республики Беларусь также проводится серьезная работа по совершенствованию условий производства продовольственного сырья и пищевых продуктов животного происхождения. На предприятиях осуществляется широкомасштабная работа по модернизации и переоснащению производства, внедрению систем менеджмента качества серии ИСО, безопасности продукции на основе анализа рисков в критических контрольных точках (ХАССП), совершенствуется деятельность контрольно-надзорных органов.

В настоящее время проводится интенсивная работа по гармонизации национальной системы относительно безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов животного происхождения, разрабатываемой таковой для Таможенного союза (ТС) и Евразийского экономического сообщества (ЕврАзЭС). Республика Беларусь осуществляет экспортно-импортные операции с живыми животными и продукцией животного происхождения ежегодно более чем с 70 странами мира.

В период с 2003 года по настоящее время в Республике Беларусь было 9 миссий инспекторов Генерального директората по охране здоровья и защите потребителей (САНКО) ЕС с целью проверки соответствия условий нашей страны требованиям законодательства ЕС относительно экспорта на рынок стран ЕС животных и продукции животного происхождения. Как результат этих инспекций, республика включена в список стран по экспорту на рынок ЕС рыбы (аквакультур) и рыбной продукции, молочной продукции, лошадей. Таким образом, сложившееся положение дел по здоровью животных, производству безопасного продовольственного сырья и продуктов животного происхождения в основном отвечает международным требованиям и не препятствуют международной торговле.

Вместе с тем, в стране имеются отдельные несоответствия международным подходам, которые влияют на эффективность экспорта продовольственного сырья и пищевых продуктов.

По оценке инспекторов САНКО, экспертов ФАО наше национальное законодательство нуждается в дополнениях относительно норм по идентификации и прослеживаемости животных и продукции животного происхождения, гуманному обращению с животными, кормам и кормлению животных.

Одним из направлений для совершенствования в стране является национальная система контрольно-надзорной деятельности в области безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов животного происхождения, т.н. компетентный орган.

Основные звенья системы представлены соответствующими службами Минсельхозпрода, Минздрава и Госстандарта.

Каждая из представленных структур выполняет свои функции в рамках компетенции установленной действующим в стране законодательством, которое, в определенной части, не предусматривает координацию их действий.

Во многих странах мира функции т.н. компетентного органа выполняют национальные комиссии Кодекс алиментариус или государственная ветеринарная служба (примеры по странам Балтии). Они организованы при правительстве или основном органе государственного управления в сфере обеспечения безопасности пищевых продуктов при их производстве, переработке, транспортировке, хранении и реализации, чаще это в лице государственной ветеринарной службы при министерстве сельского хозяйства или министерстве здравоохранения. В состав компетентного органа входят представители всех заинтересованных, в том числе и по связям с общественностью. Результаты его деятельности открыты и доступны для всех членов общества, не зависимо от их социальной или политической принадлежности.

В связи с этим, одной из первоочередных задач для осуществления без барьерной внешней торговли продуктами животного происхождения в Республике Беларусь запланировано создание **Компетентного органа**, который будет не только осуществлять государственный контроль в сфере безопасности пищевых продуктов, но и отвечать за результаты контроля.

В ст. 9 Закона Республики Беларусь «О ветеринарной деятельности» указано, что Министерство сельского хозяйства и продовольствия является уполномоченным органом в области государственного регулирования ветеринарной деятельности, а также **компетентным органом** в области обеспечения ветеринарного благополучия [2]. Указанным Законом определено понятие ветеринарного благополучия как состояние здоровья животных, при котором обеспечиваются технологическая продуктивность животных, получение продуктов животного происхождения, соответствующих ветери-

нарно-санитарному качеству, предотвращается распространение болезней, передаваемых от человека животным, а также состояние защищенности населения от болезней животных и болезней, передаваемых человеку через животных, продукты животного происхождения.

Нуждается в изменении и система лабораторного контроля показателей безопасности продукции животного происхождения. Это направление деятельности, по нашему мнению, требует изменений не только в Республике Беларусь, но и странах – членах ТС и ЕврАзЭС. Так в Республике Беларусь, как и в странах – членах ТС и ЕврАзЭС, лабораторный контроль осуществляется по показателям, предусмотренным национальным законодательством и принятыми Техническими регламентами ТС, которыми его периодичность определяется не от объемов производства, а временными интервалами в отличие от рекомендованных международными организациями и принятыми в ЕС нормами.

Целесообразным является и расширение номенклатуры контролируемых показателей, особенно в части контроля т.н. вредных веществ и их остатков, которые должны контролироваться службами стран-импортеров.

Важным обстоятельством доверия к деятельности испытательных лабораторий, а вместе с тем и к безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, особенно при экспорте, является качество и достоверность проводимых ими испытаний, которое обеспечивается соответствующим техническим, методическим, кадровым, финансовым оснащением лабораторий. Подтверждением качества и достоверности служат межлабораторные сличительные исследования и взаимное признание их результатов на наднациональном уровне. К сожалению, это направление в республике, как и в странах-членах ЕврАзЭС и ТС, не имеет системной направленности и носит скорее спорадический характер.

Данная проблема особенно актуальна при разрешении споров в отношении результатов контроля качества и безопасности продукции при экспортно-импортных операциях.

В настоящее время активно разрабатывается и формируется законодательство по обеспечению безбарьерной торговли продовольственными товарами на пространстве ЕврАзЭС и ТС. Целесообразно, по нашему мнению, разработать и соответствующий пакет нормативных документов относительно согласованной научно-обоснованной системы действий, технического, методического обеспечения лабораторной деятельности, оценки результатов испытаний, а также разрешения споров в случае сомнений в их достоверности и так далее.

Таким образом, реформирование системы лабораторного контроля на предмет ее соответствия международным нормам и правилам должно быть не только предметом деятельности в Республике Беларусь, но и в странах – членах ТС и ЕврАзЭС посредством создания соответствующих наднациональных структур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Условия и возможности Республики Беларусь позволяют не только полностью обеспечивать население страны продовольственным сырьем и пищевыми продуктами животного происхождения, а также экспортировать его значительную часть.

Вместе с тем, глобализация торговли животными и продовольствием животного происхождения превратила безопасность пищевых продуктов в международную проблему, и ее решение должно быть первоочередной задачей государственных контрольно-надзорных органов. Ведущее звено в их системе занимает государственная ветеринарная служба, а эффективность ее работы – это необходимое условие успешного развития бизнеса.

ЛИТЕРАТУРА

1 Жуков, А. Беларусь и Россия сбалансировали интересы / А. Жуков. – Белорусское сельское хозяйство. – 2013. – № 2 (130). – С. 4–5.

2 Закон Республики Беларусь «О ветеринарном деле» / Ведомости Верховного Совета Республики Беларусь, 1995. – № 4. – 2/461.

3 Ментюкова, С., Зубов Н. «Евросоюз готовит контрольную закупку. Производителей продуктов проверяют без предупреждения» / Портал о животноводстве и мясопереработке в России. – 13.05.2013.

4 Общие рекомендации для администраций третьих стран по процедурам, которыми надлежит руководствоваться при импорте живых животных и продуктов животного происхождения в Европейский Союз / Европейская комиссия, Генеральная дирекция по охране здоровья и защите потребителя Дирекция «F» – Управление продуктами питания и ветеринарии; 2003. – 40с.

5 Русинович, А. Совершенствование системы обеспечения безопасности продукции животного происхождения в Беларуси / А. Русинович, П. Расторгуев // Аграр. экономика. – 2007. – № 2. – С.10–13.

6 Сборник докладов «Согласованная аграрная политика Беларуси и России – важнейшее условие продовольственной безопасности Союзного государства»: материалы пост. действ. семин. при Парлам. Собр. Союза Беларуси и России по вопр. строит.-ва Союз. гос.-ва, Заседание семнадцатое, Санаторий «Озерный», Гродненская область, 14–15 окт. 2009 г. / Центр системного анализа и стратегических исследований НАН Беларуси; под ред. С. Г. Стрельченко. – Минск, 2009. – С. 3–74.

7 Санитарный Кодекс наземных животных МЭБ. Paris, France, Четырнадцатое издание, 2005. – С. 15–17.

8 Проблемы растущих инфекционных и инвазионных угроз в XXI веке: Балтийский форум ветеринарной медицины 2011: материалы междунар. научно-практической конференции; Санкт-Петербург, 2011.

Лизун Р.П., кандидат ветеринарных наук
Даровских И.А., аспирант*

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

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

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ПТИЧЬИХ ИЗОЛЯТОВ САЛЬМОНЕЛЛ В ЭПИДЕМИОЛОГИИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА

Для промышленного птицеводства решение проблемы сальмонеллезов имеет особое значение, так как именно эта отрасль производит диетическую, легко усвояемую продукцию. На основании сообщений об обнаружении сальмонеллы в продуктах питания можно сделать вывод, что чаще ее выделяют из продуктов переработки домашней птицы, чем от любых других видов животных. Этот факт свидетельствует о широкой распространенности сальмонеллезной инфекции среди сельскохозяйственной птицы, в частности, среди цыплят и индюшат, выращиваемых на мясо. Вспышки сальмонеллеза среди людей в большинстве своем вызваны потреблением обсемененного сальмонеллами мяса домашней птицы и яиц, поэтому контроль за распространением сальмонеллезов птиц является важной задачей птицеводства с точки зрения здравоохранения и экономических перспектив.

Бактерии рода *Salmonella* являются одной из причин острых и хронических инфекционных болезней домашней птицы. Однако, в отличие от млекопитающих, у которых манифестация сальмонеллеза практически всегда проявляется в виде тяжелого септического системного заболевания, у птицы инфекция может развиваться по одному из трех сценариев:

- бактерия может транзиторно элиминироваться из желудочно-кишечного тракта, птица при этом остается непораженной;
- бактерия может колонизировать стенку кишечника, размножиться и диссеминировать окружающую среду; птица при этом выглядит клинически здоровой, но является пожизненным сальмонеллоносителем;
- бактерия может проникать через кишечник и инфицировать внутренние органы (желчный пузырь, печень, органы размножения). Клинически птица может выглядеть здоровой, но может развиваться полноценный инфекционный процесс различной степени тяжести.

Повышенное рассеивание сальмонелл в окружающую среду приводит к инфицированию другой птицы на ферме (горизонтальная передача). У ремонтного молодняка колонизация сальмонеллой органов размножения может привести к инфицированию яиц в половых путях (вертикальная пе-

редача). Обсеменение поверхности яиц также может происходить в клоаке в процессе яйцекладки. Полученная из инфицированных яиц птица становится пожизненным сальмонеллоносителем с момента вывода. Контаминация тушек птиц, предназначенных на мясо, происходит при убое и потрошении.

Продолжающийся рост заболеваемости сальмонеллезом во многих странах (в США в 1985–1991 гг. 82% всплеск заболеваний у людей, вызванных *Salmonella enteritidis*, было связано с поеданием яиц), увеличение числа серовариантов сальмонелл, обнаруживаемых у птиц, животных и у людей, значительная контаминация сальмонеллами пищевых продуктов животного происхождения и объектов внешней среды выдвигают эту инфекцию в ряд важнейших не только ветеринарных, но и медико-экологических и социальных проблем [1].

В последние пятнадцать лет этиологическая структура сальмонеллезов птиц значительно изменилась: резко снизилась циркуляция хозяина-адаптированных сальмонелл *Salmonella gallinarum-pullorum* и увеличилось количество хозяин-неадаптированных к организму птиц сальмонелл – *S. haifa*, *S. virchow*, *S. dublin* и других. Вариации в доминировании того или иного серотипа, выделяемого от птиц, прослеживаются в различных странах и регионах мира. Также интересным является общий уровень контаминации сальмонеллами мяса птиц и птицепродуктов.

Так, за 5-летний период исследования (2000–2004 гг) в Литве было установлено, что около 2,5% мяса птицы было обсеменено сальмонеллой. Всего из различных проб от птицы (помет, клоакальные смывы, мясо) было выделено 18 сероваров сальмонелл [5].

Ещё серьезней дело обстоит в азиатских странах и Африке. Так, при обследовании торговых точек, уличных ресторанов, реализующих блюда из птицы, в Тегеране (Иран) 62,7% проб мяса птицы содержали сальмонеллу; было выделено 10 серовариантов, доминирующий серотип – *S. Thompson* [3].

В Сенегале сальмонелла выделена в 14,3% уличных ресторанов, торгующих птицепродуктами, и в 40,4% куриных тушек. Всего выделено 18 сероваров, из них доминирующие серотипы *S. Brancaster* (57%), *S. Goelzau* (10,7%), *S. Kentucky* (8,4%) [4].

В Индии при обследовании тушек птицы, продаваемых в магазине, у 20% выделена сальмонелла [4].

В Нигерии у 24,7% обследованных тушек птиц выделена сальмонелла, ведущий серотип – *S. Hiduddify* [6].

В Европе ведущее место по выделению от птицы имеет эпидемиологически значимый вид *Salmonella enteritidis* – 25–82% от всех выделенных видов сальмонелл, в Японии этот вид выделяется всего в 0,9% случаев [7].

В Португалии вторым по распространенности эпидемиологически значимым видом, выделяемым от птиц, является *Salmonella Hadar* (28% от

всех выделяемых видов сальмонелл), в Литве этот вид выделили 1 раз за 5-летний период исследования [5].

В связи с этим, следует обязательно учитывать доминирующие серотипы сальмонелл, выделяемых от птиц и имеющих эпидемиологическое значение для человека, на территории каждой страны.

По данным статистической отчетности Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья Республики Беларусь ведущими серотипами сальмонелл, выделяемых от людей на протяжении многих лет, являются *Salmonella enteritidis* и *Salmonella typhimurium*. Заболевания сальмонеллезной этиологии регистрируются у людей на протяжении всего года в виде спорадических случаев, однако имеют место и вспышки массового заболевания. За последние 10 лет зарегистрировано 34 вспышки сальмонеллезной этиологии, в которых пострадало 620 человек. Вспышки, вызванные серотипами *S. enteritidis* и *S. typhimurium*, регистрировались примерно с одинаковой частотой (45 и 46%), прочие серотипы выделялись в 10% вспышек [1].

По данным отдела бактериологии Белорусского государственного ветеринарного центра при исследовании патологического материала от птиц в преобладающем большинстве выделяется *S. enteritidis*; удельный вес второго эпидемиологически значимого серотипа *S. typhimurium* варьирует по годам [2].

Сводные данные по выделению доминирующих в Республике Беларусь эпидемиологически значимых серотипов при сальмонеллезной инфекции человека и птиц представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Общие для человека и птиц доминирующие серотипы сальмонелл (в %)

Годы	Птицы		Люди	
	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>
2004	50,9	7,7	88,1	3,7
2005	Нет данных		90,5	4,1
2006	35,5	16,1	80,0	12,2
2007	73,1	0,7	79,7	6,7
2008	71,9	0	78,1	3,5
2009	55,3	6,1	Нет данных	
2012	100	0	84,0	7,1

Как видно из таблицы 1, птицы могут являться для человека основным резервуаром инфекции, поддерживающим уровень циркуляции наиболее патогенных для человека серотипов *Salmonella enteritidis* и *Salmonella typhimurium*. Наблюдается определенная адаптация *S. enteritidis* к организму птиц.

В этиологической структуре сальмонеллёзов, выделенных из пищевого сырья и продуктов питания, как и в пейзаже у больных, доминирует *S. enteritidis* – 86%.

По данным Республиканского ЦГЭ в 67% вспышек сальмонеллезов среди людей фактором передачи сальмонелл явились мясные изделия или мясные блюда (включая мясо птицы и яйцо), в 3% случаев кондитерские изделия с кремом, в остальных случаях распространение инфекции происходило через предметы обихода.

Анализ анамнестических данных пациентов инфекционных больниц республики при спорадических случаях сальмонеллезов представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Эпидемиологическая роль птицепродуктов как факторов передачи сальмонеллезной инфекции людям (в %)

Годы	Мясо и мясопродукты (включая мясо птицы)	Яйца и яйцепродукты
2006	30,9	15
2007	28,4	19
2008	29,1	24,3
2009 (данные по г.Минску)	12,3*	23,5
2012	21,6**	35**

Примечание – * только мясо птицы; ** данные лабораторного мониторинга пищевого сырья и продуктов питания

Как видно из таблицы 2, птицепродукты (мясо птицы, субпродукты, яйца и яйцепродукты) являются значимыми факторами передачи сальмонеллезной инфекции людям.

Полученные данные лабораторного мониторинга свидетельствуют, что поддержание уровня заболеваемости сальмонеллезами населения Республики Беларусь способствует поражённость сальмонеллами поголовья сельскохозяйственных животных (птиц, в частности), импорт в республику недоброкачественной по микробиологическим показателям сельскохозяйственной продукции, а также реализация такой продукции животноводческими предприятиями республики.

В этой связи усовершенствование системы контроля сальмонелла энтеритидис инфекции птиц, т.е. разработка программы профилактики и оздоровления хозяйств от этого возбудителя, объективно обосновано.

ЛИТЕРАТУРА

1 Анализ эпидемиологической обстановки по сальмонеллезам в Республике Беларусь. Документация Республиканского ЦГЭ РБ (статистические данные, отчеты, презентации). – 2008, 2012. – 16 с.

2 Отчеты отдела бактериологии ГУ «Белгосветцентр». – 2004–2009, 2012. – 36 с.

3 Dallal, M. Characterization of antibiotic resistant patterns of *Salmonella* serotypes isolated from beef and chicken samples in Tehran / Dallal M., Taremi M., Gachkar L., Modarressi S. et al. // *Jundishapur Journal of Microbiology*, – Vol. 2, Issue 4. – 2009. – P. 124–131.

4 Dione, M. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolated from Broiler Farms, Chicken Carcasses, and Street-Vended Restaurants in Casamance, Senegal / Dione, M., Ieven M., Garin B. et al. // *Journal of Food Protection*, – Vol. 72 Issue 11. – Nov 2009. – P. 2423–2427.

5 Pieskus, J. The Distribution of *Salmonella* Serovars in Chicken and Humans in Lithuania / Pieskus J., Milius J., Michalskiene I., Zagrebneviene G. // *J. Vet. Med.*, A53, 2006. – P. 12–16.

6 Raufu, I. Occurrence and characterization of *Salmonella* Hiduddify from chickens and poultry meat in Nigeria / Raufu, I.; Hendriksen, R. S.; Ameh, J. A.; Aarestrup, F. M. // *Foodborne Pathogens and Disease*, 6 (4), 2009. – P. 425–430.

7 Van Asselt, E. D. *Salmonella* serotype distribution in the Dutch broiler supply chain / Van Asselt E. D., Thissen J. T., Van der Fels-Klerx H. J. // *Poultry Science*, – Vol. 88, Issue 12. – Dec 2009. – P. 2695–2701.

Литвиненко О.П., кандидат ветеринарных наук

Неволько О.М., кандидат ветеринарных наук

Неволько И.О., врач-интерн

*Государственный научно-исследовательский институт с лабораторией
диагностики и ветеринарно-санитарной экспертизы, г. Киев*

ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ЭПИЗООТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ЭХИНОКОККОЗНОЙ ИНВАЗИИ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ ЗА ПЕРИОД С 2004 ПО 2011 ГОД

ВВЕДЕНИЕ

Эхинококкозы – хронически протекающие гельминтозы, характеризующиеся деструктивными поражениями печени, лёгких и других органов, аллергизацией организма и тяжёлыми осложнениями, нередко приводящими к смерти. Существуют затруднения в ранней диагностике, оперативные вмешательства осуществляются в запущенных стадиях, имеются определённые трудности в проведении комплексных профилактических мероприятий, которые связаны с серьёзными экономическими проблемами. ВОЗ и Международное Эпизоотическое Бюро включили эхинококкоз в список болезней, подлежащих радикальному искоренению (J. Eckert et al., 2001; Алиев М.А., 1999). В ряде стран (Новая Зеландия, Аргентина, Греция, Турция, Испания, Италия и др.), для которых гидатидозный эхинококкоз является краевой патологией, его ликвидация возведена в ранг государственной задачи, разрабатываются специальные национальные программы по контролю и предотвращению заболевания. Благодаря таким программам в ряде ранее неблагополучных по эхинококкозу стран (Исландия, Норвегия, Австралия, Тасмания) болезнь практически искоренена (P. R. Torgerson, C. M. Budke, 2003). Эхинококкоз не только вредит здоровью животных и человека, но и наносит экономический ущерб и поэтому продолжает оставаться важной государственной проблемой [6].

Эхинококкоз имеет хроническое течение, развитие паразита проходит со сменой хозяев. В половозрелой стадии гельминт паразитирует в тонком кишечнике собаки и плотоядных животных. Ларвоциста растёт в тканях и органах животных, а также человека. Основным источником заражения сельскохозяйственных животных и человека являются собаки, а фактором передачи для животных является абиотическая среда, содержащая онкосферы эхинококка. Онкосферы гематогенным путем разносятся по всему организму, но чаще локализуются в печени и легких. Патогенетическое влияние эхинококков на организм животных обусловлено рядом факторов: токсичным, антигенными, ферментативным и другим.

Эпизоотический процесс при эхинококкозе развивается только при наличии четырех движущих биологических сил: дефинитивного хозяина, двоякого механизма передачи и восприимчивого животного. Эпизоотический процесс поддерживается постоянно, поскольку факторы передачи возбудителя восприимчивому животному всегда имеют место. В свиноводстве таковы комбикорма, в скотоводстве – комбикорма и сено, в овцеводстве – трава и сено [10].

По данным Петрик О.Б.[6], на территории Краснодарского края значительную долю в структуре заболеваемости занимает эхинококкоз – на долю его в 2008 г. пришлось 39,99% всех паразитарных заболеваний; в 2009 г. – 46,79%, в 2010 – 44,93% и в 2011 – 33,13%. Наибольшая экстенсивность эхинококкозной инвазии зарегистрирована в 2009 г. – 2,04%; практически на том же уровне (2,01%) она была и в предыдущем – 2008 г.; в последующих 2010 и 2011 гг. наметилась тенденция снижения степени инвазированности – 1,25% и 0,88% заражённых эхинококкозом животных соответственно.

В лабораториях ветеринарно-санитарной экспертизы рынков эхинококкоз регистрировался только в 2008 г., причём наибольшая экстенсивность инвазии наблюдалась у мелкого рогатого скота – 1,98%; у свиней и крупного рогатого скота она составила 0,59% и 0,10% соответственно. Средняя же ЭИ составила 0,61%. На убойных пунктах мясокомбинатов ежегодно регистрируется значительное количество инвазированных эхинококкозом туш сельскохозяйственных животных.

С 2008 по 2011 г. степень инвазированности мелкого рогатого скота возросла в 37 раз. Ещё в 2008 г. она составляла 0,70%, в 2009 г. – уже 9,19%, а в 2010 и 2011 гг. – 25,13% и 26,05% соответственно. Максимальная экстенсивность инвазии эхинококками туш свиней выявлены при убое животных на мясокомбинатах отмечалась в 2009 г. и составила 7,71%; в 2008, 2010 и 2011 гг. – 5,98; 3,83 и 3,08% соответственно. Крупный рогатый скот согласно отчётности в меньшей степени инвазирован эхинококками, причём на протяжении 2008–2010 гг. наблюдалась тенденция к снижению – 2,64; 0,89 и 0,25% соответственно, однако уже в 2011 г. ЭИ выросла и составила 0,48%.

При проведении исследований сельскохозяйственных животных в регионах провинции Буэнос-Айрес (Аргентина), где было зарегистрировано наибольший процент инвазирования сельского населения, выяснилось, что поражённость крупного рогатого скота составляет 11,9% из 513 голов, овец составляет 4,0% из 792 голов [8].

Согласно данным Kassem Н.Н. [9], распространение эхинококкозной инвазии постоянно регистрируется в Северной Африке среди забитых животных на бойнях в Сирте и Ливии. В период с июля 2004 по май 2005 года общее количество пораженного поголовья овец составила 4,9%, коз – 2,7%, верблюдов – 2,4%, крупного рогатого скота – 15%.

Эхинококкоз является одним из основных паразитарных заболеваний, выявляется у животных и человека в любой климатической зоне. Первоочередной задачей улучшения эпизоотической ситуации по этой болезни является детальное изучение распространения и профилактика заболевания путем разорвания биологической цепи.

Цель работы заключалась в ретроспективном анализе эпизоотической ситуации и изучения динамики распространения эхинококкозной инвазии среди крупного рогатого скота, свиней и мелкого рогатого скота на территории Украины за период с 2004 по 2011 год.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами был проведен ретроспективный статистический анализ и обобщены результаты лабораторных исследований Государственного научно-исследовательского института с лабораторией диагностики и ветеринарно-санитарной экспертизы, региональных, межрайонных, районных государственных лабораторий ветеринарной медицины, а также государственных лабораторий ветеринарно-санитарной экспертизы на агропродовольственных рынках и лабораторий мясоперерабатывающих предприятий за период с 2004 по 2011 год.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эхинококковая инвазия распространена на территории Украины повсеместно. При проведении ветеринарно-санитарного контроля и надзора на убойных пунктах хозяйств и в государственных лабораториях ветеринарно-санитарной экспертизы на рынках за период с 2004 по 2011 год средний процент инвазированности крупного рогатого скота составил 0,4%, свиней и мелкого рогатого скота по 2,7%.

Анализируя динамику заболеваемости поголовья крупного рогатого скота эхинококкозом за период с 2004 по 2011 год следует отметить, что инвазированность колеблется в пределах от 0,3 до 0,6%, то есть расхождение составляет 0,3%. Данный процесс условно можно разделить на 2 фазы: частичного повышения и частичного снижения показателей инвазированности. Фазы частичного повышения, с уровнем инвазированности 0,6% регистрировались в 2004 и 2006 годах. Фазы частичного снижения с уровнем инвазированности 0,3% регистрировались в 2006, 2009 и 2010 годах (рисунок 1).

Процент пораженности мелкого рогатого скота колебался в пределах от 5,9 до 3% с расхождением в 2,9%. Процент пораженности свиней колебался в пределах от 1,5 до 5 % с расхождением в 3,5 %. Фаза частичного повышения регистрировалась у мелкого рогатого скота в 2008, 2009 и 2011 годах, а у свиней только в 2004 и 2005 годах. Фаза частичного снижения регистрировалась у мелкого рогатого скота в 2005 и 2006 годах, а у свиней только в 2009, 2010, 2011 годах (рисунок 1).

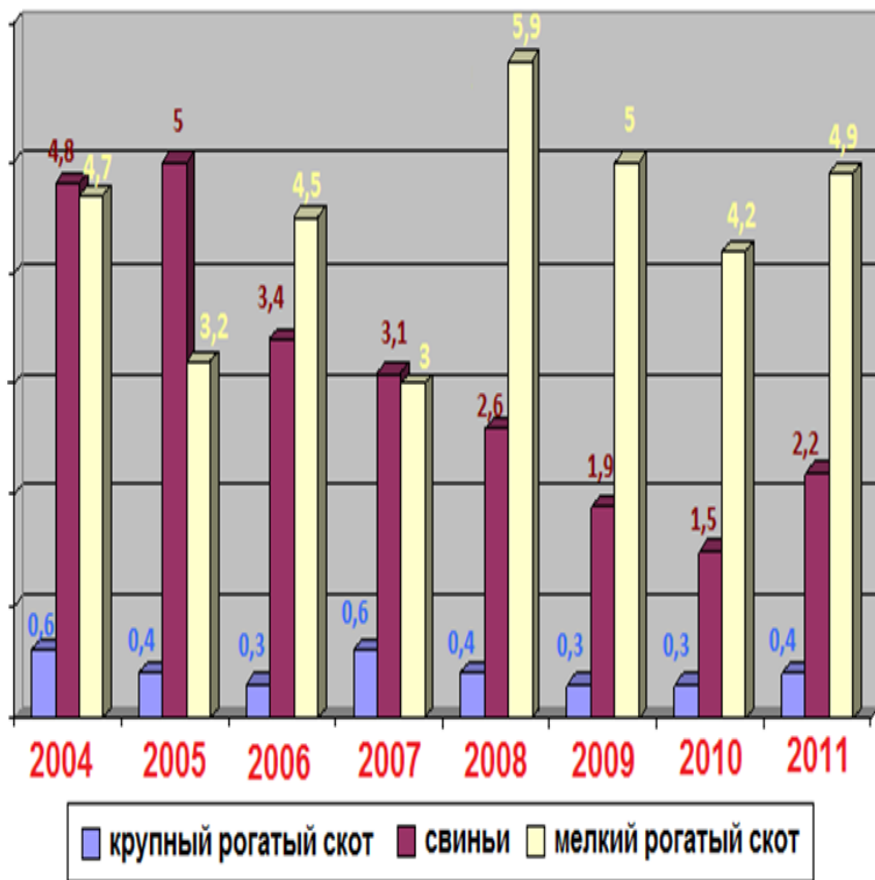


Рисунок 1– Инвазированность крупного рогатого скота, мелкого рогатого скота и свиней возбудителем эхинококкоза в 2004 – 2011годах

Анализ статистических данных по уровню инвазированности свиней и мелкого рогатого скота свидетельствует, что он находится на одном уровне, однако наивысший уровень инвазированности мелкого рогатого скота составлял 5,9% в 2008 году, а самый высокий уровень инвазированности свиней составлял 5% в 2005 году с расхождением в 0,9%.

ВЫВОДЫ

– Заболеваемость эхинококкозом свиней в Украине в период с 2004 по 2011г. динамично снижалась с 4,8 до 2,2 %.

– Инвазированность крупного рогатого скота эхинококками в период с 2004 по 2011гг. характеризуется относительной стабильностью.

– Инвазированность мелкого рогатого скота эхинококками характеризуется изменчивостью показателей по годам с пиком снижения в 2005 и 2007 годах в 3 – 3,2 %, и повышением в 2006, 2008, 2009 и 2011 годах соответственно до 4,5, 5,9, 5 и 4,9% соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1 Артеменко, Л.П. Эхинококкоз. Возбудители, особенности эпизоотологии /Л.П. Артеменко, Н.В. Букалова, А.Д. Небешук // Сучасна ветеринарна медицина. – Київ, 2013. – № 3. Ч. 1. – С.48–51.

2 Багаева, У.В. Эпизоотология и эпидемиология ларвального эхинококкоза в регионе Центрального Кавказа / У.В. Багаева : Автореф. дис. на соиск. учён. степени канд. биол. наук – М. 2009. – 15 с.

3 Блохина, С.В. Эпизоотология цистного эхинококкоза в Омской области / С.В. Блохина: Автореф. дис. на соиск. учён. степени канд. биол. наук – Тюмень, 2009. – 17 с.

4 Валиуллин С.М. О распространении эхинококкоза в овец и крупного рогатого скота в условиях различных природных зон /С.М. Валиуллин // Материалы 9-й конф. укр. об-ва паразитологов. – К.: 1980. – Ч. 1. – С. 108 –110.

5 Лысенко Г.А. Распространение и профилактика эхинококкоза в Краснодарском крае / Г.А. Лысенко, А.Я. Сапунов, М.М. Антонов // Агро-вестник Кубани. – 2006. – № 5. – С. 23.

6 Петрик О.Б. Оценка качества и безопасности продуктов убоя при гидатидном эхинококкозе сельскохозяйственных животных / О.Б. Петрик // Автореф. дис. канд. био. наук. – М., 2012. – 129 с.

7 Acosta-Jamett G. [Echinococcus granulosus infection in humans and livestock in the Coquimbo region, north-central Chile](#) / S. Cleaveland, A.A. Cunningham, B.M. Bronsvoort, P.S. Craig // Vet Parasitol.– 2010. – Vol. 169(1–2). – P.10–14.

8 [Andresiuk M.V.](#) Echinococcus granulosus genotype G1 dominated in cattle and sheep during 2003 – 2006 in Buenos Aires province, an endemic area for cystic echinococcosis in Argentina / [F.P. Gordo](#), [M. Saarma](#), [M.C. Elissondo](#), [A. Taraborelli](#), [C. Casalongue](#), [G. Denegri](#), [U. Saarma](#) // [Acta Trop.](#) – 2013. – Vol. 127(2). – P. 136 – 42.

9 [Kassem H.H.](#) Prevalence of hydatid cysts in slaughtered animals in Sirte, Libya. / A.K. [Abdel-Kader](#), [S.A. Nass](#) // [J Egypt Soc Parasitol](#) – 2013. – Vol. 43 (1). – P. 33 – 40.

10 Neghina R. Epidemiology and epizootology of cystic echinococcosis in Romania 1862–2007 / R. Neghina, I. Marincu, I. Iacobiciu // Foodborne Pathog Dis. – 2010. – Vol. 7(6). – P. 613–618.

11 [Tünger Ö.](#) Epidemiology of cystic echinococcosis in the world / [Turkiye Parazitol Derg.](#) – 2013. – Vol. 37(1). – P. 47–52.

Ивашкевич О. П., доктор ветеринарных наук, доцент

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

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ АКУШЕРСКО-ГИНЕКОЛОГИЧЕСКОЙ
ПОМОЩИ ХОЗЯЙСТВАМ И НАУЧНЫЕ РАЗРАБОТКИ
В ЭТОЙ ОБЛАСТИ – ВАЖНЕЙШЕЕ НАПРАВЛЕНИЕ
ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ОТДЕЛА ПАТОЛОГИИ РАЗМНОЖЕНИЯ**

В настоящее время основным направлением развития молочного скотоводства является производство молока на основе новых высокотехнологичных комплексов. Технологией промышленного производства молока предусматривается равномерное распределение отёлов в течение года и ежегодное получение приплода от каждой коровы. Однако на протяжении многих лет приплод на 100 коров не превышает 79–84 телят. Ежемесячно первичное осеменение составляет в среднем 40–50%, а оплодотворяемость от первого осеменения – 35–40%. Выраженная весенне-летняя сезонность в осеменении скота отрицательно сказывается на экономике хозяйств, так как годовая молочная продуктивность коров при весенних отёлах на 10–12% ниже, чем при осенне-зимних. Многолетний мониторинг слагаемых яловости показал, что наибольший удельный вес занимают животные с удлинённым сервис-периодом (14,1–14,4%) и выбывшие нестельными в первом квартале года (6,0–6,6%).

Одной из причин вышеизложенной ситуации, на наш взгляд, является низкая устойчивость высокопродуктивных животных даже к незначительным нарушениям кормления, содержания, эксплуатации. Акушерско-гинекологическую патологию, что называется, «зашкаливает». Чаще всего регистрируется задержание последа – у 6,6–16,4%, субинволюция матки – 17,8–46,3% и эндометриты – у 27,4–35,0% отелившихся коров, а также функциональные нарушения яичников у длительно неприходящих в охоту животных (гипофункция – в 14,6–27,1% и наличие персистентного жёлтого тела – 10,6–24,5% случаев). В отдельных хозяйствах ветеринарные работники уже физически не справляются своевременно и полноценно лечить животных.

Ещё одна проблема, требующая постоянного внимания, – это состояние молочной железы. Проведенные нами исследования показали, что в настоящее время практически у половины лактирующих коров регистрируется патология вымени, в том числе: 1–2% – клинически выраженный мастит, 38–57% – скрытый и 7–10% – атрофия одной или двух четвертей вымени. При этом воспалительные процессы молочной железы у 74,2% коров отмечали по несколько раз в течение года (2 – 24,7%, 3 – 15,3%, 4 – 12,6%, 5

и более раз – 21,6%), что свидетельствует о хроническом воспалительном процессе в молочной железе. За период болезни и после выздоровления молочная продуктивность снижается при субклиническом мастите на 10–15%, а при клиническом – до 35% за лактацию. Выбраковка из-за атрофии долей вымени и гипогалактии в результате проявления различных форм мастита достигает 15–30%, что в целом ведет к снижению удоев и уменьшению срока хозяйственного использования животных. В технологическом плане молочное сырьё, полученное от больных коров, не пригодно к переработке и производству высококачественных продуктов.

Сложившаяся ситуация усугубляется еще и тем, что на современных молочных комплексах по различным причинам отсутствуют родильные отделения, стационары для лечения больных животных, наблюдается недостаточное обеспечение необходимым количеством стандартизированных кормов и высокопродуктивным дойным стадом, не хватает высококвалифицированных ветеринарных специалистов.

На наш взгляд, выполнение технологического регламента по увеличению количества получаемого приплода и качественной молочной продукции обеспечат три условия:

- жёсткий контроль со стороны предприятий, осуществляющих приём молочного сырья;

- материально-техническое обеспечение производства качественных кормов, приобретение кормовых добавок, медикаментов, моющих и дезинфицирующих средств, своевременная замена сосковой резины, на каждом молочном комплексе при строительстве или реконструкции оборудование ветеринарных блоков, имеющих стационар на 10% общего поголовья коров с механической подачей кормов, уборкой навоза, отдельной доильной установкой и навозохранилищем;

- включение в штат молочных комплексов профильных ветспециалистов (гинеколог, маммолог, ортопед, педиатр) и их закрепление на местах.

Решать проблему снижения бесплодия и мастита необходимо комплексно, включая технологический и врачебный пути, чтобы достичь оптимальной продолжительности сервис-периода (60–90 дней) и снижения заболеваемости коров клиническим маститом в течение месяца, не превышающей 1%, субклиническим – 5%, содержания соматических клеток в сборном молоке – не выше 250000 в 1 см³, бактериальной обсемененности – менее 300000 КОЕ/см³.

Отдел патологии размножения института в настоящее время сформировался не только как научный, но и как консультативно-методический центр, где работают два доктора и четыре кандидата ветеринарных наук.

История подразделения начинается с 60-х годов, когда в составе отдела по изучению незаразных болезней и обмена веществ с/х животных началась научно-исследовательская работа, связанная с бесплодием коров. В начале 70-х годов был создан отдел воспроизводства с/х животных (зав.

к.в.н. Чередков С.Н.). С 1987 по 1999 год отдел возглавлял к.в.н. Семёнов Б.Я., с 2000 года – к.в.н. Ботяновский А.Г. и с 2005г. по настоящее время – д.в.н. Ивашкевич О.П. В отделе ведется подготовка научных кадров высшей квалификации: защищены 5 кандидатских и 1 докторская диссертации. В данный период работают главный научный сотрудник Богущ А.А., ведущий научный сотрудник Иванов В.Е., старшие научные сотрудники Ботяновский А.Г. и Лиленко А.В., научный сотрудник Лемешевский П.В., младший научный сотрудник Курочкин Д.В.

Основные направления деятельности отдела патологии размножения:

- изучение этиологических факторов патологии воспроизводительной функции и мастита у сельскохозяйственных животных;
- разработка и совершенствование методов диагностики, терапии и профилактики акушерско-гинекологических болезней животных;
- разработка экологически безопасных лекарственных препаратов при эндометритах, мастите и функциональных нарушениях яичников у коров;
- оказание помощи хозяйствам республики в диагностике, разработке специальных мероприятий по профилактике мастита, бесплодия и яловости дойного стада.

В рамках пропаганды достижений и передового опыта за последние годы (2008–2012 гг.) опубликовано статей в журналах – 33, сборниках – 13, подготовлено рекомендаций, правил, инструкций – 15, монографий – 2, проведено курсов по подготовке техников искусственного осеменения животных – 14, проведено или принято участие в 41 республиканских, областных и районных совещаниях (семинарах), получено 8 патентов и подано 6 заявок на получение патента, выполнено рецензий – 228, дано консультаций – 205, прочитано лекций и докладов – 90, сделано выездов в хозяйства по оказанию методической и практической помощи – 147 с затратой 324 чел/дня. Разработано 6 ТНПА на ветеринарные препараты, которые выпускаются в достаточном количестве на предприятиях Белзоветснабпрома и производственном участке института. Среди них – эндокур, диоглихоксан, беломастин, фитодисульфат, ПФП, сапофор, альвеозан, отличающиеся высокой эффективностью и пользующиеся большим спросом.

Таким образом, учитывая вышеизложенное и сочетая научный и производственный потенциал, будут созданы предпосылки эффективной работы по снижению бесплодия, яловости и количества маститов дойного стада, что в итоге обеспечит продовольственную безопасность страны при снижении затрат валютных средств и увеличении доли импортозамещения.

Ивашкевич О. П., доктор ветеринарных наук, доцент
Ботяновский А. Г., кандидат ветеринарных наук

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

ЛЕЧЕНИЕ КОРОВ, БОЛЬНЫХ СКРЫТЫМ ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ

ВВЕДЕНИЕ

В решении проблемы бесплодия и яловости дойного стада серьезным препятствием является скрытый хронический эндометрит. По нашим наблюдениям 39,2% коров становятся стельными от первого осеменения и 60,8% животным для оплодотворения, по различным причинам требуется повторное осеменение (Ивашкевич О.П., 2005). Одной из причин, обуславливающих непродуктивное осеменение, может быть наличие скрытого хронического эндометрита. По данным Н.И. Полянцева (1986) и Ш.Р. Мирзахметова (2005) животные со скрытым эндометритом составляют в среднем 63–64,0% от общего количества бесплодных. А.К. Сеглиньш и др. (1974) достигли повышения оплодотворяемости на 15,5%, вводя в матку таких животных йодвисмутсульфамид. Для повышения оплодотворяемости многократно безрезультатно осеменяемых коров с успехом используются микробы-антагонисты – препараты молочнокислых бактерий. Внутриматочное введение биосана, лактобактерина, бифилакта-П и бифидумбактерина коровам, больным субклиническим эндометритом, способствовало повышению оплодотворяемости на 24,0–52,6% по сравнению с контрольным препаратом «Спермосан -3» (Шматко И.Я., 2001). Однако основным недостатком большинства пребиотиков является чувствительность к факторам внешней среды, что приводит к снижению активности этих препаратов.

В настоящее время развивается направление по получению пребиотических препаратов на основе продуктов жизнедеятельности микроорганизмов – их метаболитов. Особенностью этих препаратов является высокая биологическая активность, а также повышение срока хранения до одного года. Кроме того, они могут сочетаться с антибиотиками, сульфаниламидами, нитрофуранами и другими химиотерапевтическими препаратами, что и было учтено при разработке новых лекарственных средств.

Для выяснения ситуации по скрытым эндометритам нами проведено клиническое обследование многократно безрезультатно осеменяемых коров (3 и более раз). При этом установлено в цервикальной слизи наличие прожилков катарально-гнойного экссудата. Из первичной ветеринарной документации выяснено, что большинство животных переболели острым ката-

рально-гнойным эндометритом. Проводился соответствующий курс терапии, однако полного излечения не наступало и процесс приобретал хронический характер без видимых клинических признаков, за исключением обострения в период охоты, когда симптоматика проявлялась клинически.

Цель работы – определение эффективности препаратов для лечения коров, больных скрытым хроническим эндометритом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Опыты проводили на МТФ «Слобода» ЧУСП «Озерицкий-Агро» и МТФ «Жажелка» ГП «ЖодиноплемЭлитаАгро» Смолевичского района. По мере выявления больных животных во время охоты сформировали три группы. Коров первой группы лечили препаратом на основе бацинила, пропранолола гидрохлорида и новокаина. Животных второй группы обрабатывали препаратом «Белэндомаст», содержащим бацинил, тилозина тартрат, пропранолол гидрохлорид и новокаин. Препараты вводили внутриматочно однократно в дозе 15–20 мл через 12–24 часа после последнего осеменения.

Коровам третьей группы (контрольная) применяли йодофарм по аналогичной схеме. Оценку эффективности препаратов проводили по результатам оплодотворяемости коров, осеменённых в эту же охоту. При значительных гнойных выделениях животным проводили полный курс комплексной терапии по схеме, применяемой в хозяйстве. Критерием эффективности лечения коров являлось их плодотворное осеменение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные по результатам проведенных исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Эффективность различных препаратов при лечении скрытого хронического эндометрита у коров

Группа коров, МТФ	Количество обработанных животных, гол.	Из них			
		стали стельными		не оплодотворились	
		гол.	%	гол.	%
Первая					
«Слобода»	51	20	39,2	31	60,8
«Жажелка»	36	20	55,6	16	44,4
Всего:	87	40	46,0	47	54,0
Вторая					
«Слобода»	23	14	60,8	9	39,2
«Жажелка»	44	35	79,6	9	20,4
Всего:	67	49	73,1	18	26,8
Третья «Слобода»	13	5	38,4	8	61,6

В контрольной группе после применения йодофарма выздоровело и стало стельными 38,4% животных.

Установлено, что при использовании препарата на основе бацинила, пропранолола гидрохлорида и новокаина выздоровление наступило у 39,2% и 55,6% животных на молочно-товарных фермах «Слобода» и «Жажелка». После включения в его состав тилозина тартрата оплодотворяемость коров на указанных фермах повысилась соответственно до 60,8% и 79,6%, то есть эффективность лечения повысилась по сравнению с первой опытной группой на 21,6% и 24,0%.

Учитывая, что проблемные животные имели различные сроки бесплодия, мы посчитали целесообразным провести мониторинг эффективности терапии в разрезе продолжительности периода от отела до начала лечения.

В результате проведенного анализа установлено, что эффективность лечения увеличивается обратно пропорционально продолжительности воспалительного процесса (таблица 2). Так, у коров с периодом от отела до начала лечения 250–300 и более дней плодотворное осеменение наступило у 4 коров (57,2%), а при более коротком периоде (61–249 дней) – у 31 (83,8%) животных.

Таблица 2 – Зависимость эффективности терапии и оплодотворяемости коров, больных скрытым хроническим эндометритом, от срока её проведения

Группа	Количество животных, гол.	Период от отела до начала лечения, дни	Число осеменений	Плодотворно осеменено	
				гол.	%
1	4	60–99	13	3	75,0
2	10	100–149	24	8	80,0
3	11	150–199	34	10	90,9
4	12	200–249	34	10	83,3
5	2	250–299	4	1	50,0
6	5	300 и более	45	3	60,0
Всего:	44	60–300 и более	15	35	79,6

ВЫВОДЫ

1 Применение комплексного препарата на основе бацинила позволяет обеспечить клиническое выздоровление и плодотворное осеменение коров, больных скрытым хроническим эндометритом, в 39,2–55,6% случаев. Включение в его состав тилозина тартрата повышает терапевтическую эффективность до 60,8–79,6%, или на 21,6–24,0%.

2 Эффективность терапии скрытого хронического эндометрита у коров повышается на 26,6% при более ранней стадии выявления болезни и проведения своевременной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1 Ивашкевич, О.П. Состояние воспроизводства и профилактика бесплодия коров в хозяйствах Беларуси. Сельское хозяйство – проблемы и перспективы: сб. научных трудов УО «ГТАУ». – Гродно, 2005. – Т.4. – С.80–86.

2 Мирзахметов, Ш.Р. Лечение коров с хроническим гнойно-катаральным эндометритом и персистентным желтым телом. Ветеринария, 2005. – С.38–40.

3 Полянцев, Н.И. Практические советы по борьбе с яловостью у коров. М., Россельхозиздат, 1986. – 174 с.

4 Сеглиньш, А.К., Дзените А.Я., Емельянова М.В. Применение различных препаратов для лечения хронических эндометритов и повышения оплодотворяемости коров. Гинекологические заболевания и яловость сельскохозяйственных животных. Тезисы докладов на научно-методическом семинаре (г.Сигулда), Управление научно-технической информации, 1974. – С.121–127.

5 Шматко, И.Я. Использование микробов-антагонистов для повышения оплодотворяемости многократно безрезультатно осеменяемых коров. Зоотехническая наука Беларуси: Сб. научн. трудов БелНИИЖ. Мн.: Белорусское издательское товарищество «Хата» – 2000, Т. 35. – С. 98–103.

Неволько О.М., кандидат ветеринарных наук*

Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор

Дедок Л.А., главный специалист*

Литвинчук О.В., главный специалист*

Кравченко А.Л., аспирант*

Неволько И.О. врач-интерн*

**Государственный научно-исследовательский институт по лабораторной диагностике и ветеринарно-санитарной экспертизе, г. Киев
РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. Вышелеского»,
г. Минск*

СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ У ДИКИХ КАБАНОВ В УКРАИНЕ В 2005 – 2012 ГОДАХ

ВВЕДЕНИЕ

Классическая чума свиней (КЧС) (лат. – Pestis suum; англ. – Classical swine fever) – высококонтагиозное заболевание, которое характеризуется при остром течении лихорадкой, септициемией и геморрагическим диатезом, а при подостром или хроническом – крупозной пневмонией и крупозно-дифтеритическим воспалением толстого отдела кишечника. Болеют дикие и домашние свиньи [1].

Впервые заболевание описано в 1810 году в штате Теннесси (США). Позже в 1830 года вспышка зарегистрирована в штате Огайо. Во Франции подобное заболевание наблюдалось в 1822 г., в Германии – в 1833 г. В 60-х годах XIX столетия болезнь распространилась в большинстве стран Европы. В наше время данное заболевание регистрируется более чем в 60 странах. Заболевание регистрируется во многих странах Европы, Азии, Северной и Центральной Америки, Африки. В результате плановых противозооотических мероприятий, использования вакцин масштаб распространения КЧС резко сократился, но сохранились ограниченные эпизоотические вспышки [2,3].

Классическая чума свиней причиняет большой экономический ущерб свиноводческим хозяйствам, так как для борьбы с ней привлекается большое количество специалистов и материальных ресурсов. Кроме того, во время эпизоотий утрачиваются популяции свиней с особенно ценным генотипом. [5]

В Украине КЧС была почти полностью ликвидирована, однако в последнее время заболевание начало спорадически выявляться среди поголовья диких кабанов.

Изучение КЧС не утратило своей актуальности, так как в соседних с Украиной государствах (Россия, Германия, Румыния, Латвия) периодически регистрируются вспышки этого заболевания как среди домашних так и среди диких кабанов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение эпизоотической ситуации по КЧС на территории Украины осуществляли путем анализа и суммирования результатов лабораторных исследований, которые были проведены на базе научно-исследовательского вирусологического отдела Государственного научно-исследовательского института по лабораторной диагностике и ветеринарно-санитарной экспертизе (ГНИИЛДВСЭ) за период 2005–2012 гг.

Объектом исследования были сыворотки крови от диких кабанов, отстрелянных с диагностической целью в течение охотничьих сезонов 2005–2012 гг. Образцы сывороток отбирали в пробирки, замораживали и с сопроводительными документами доставляли в ГНИИЛДВСЭ для исследований.

Выявление специфических антител в сыворотках крови проводили методом иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием коммерческой тест-системы Classical Swine Fever Virus (CSFV) Antibody Test Kit фирмы IDEXX (США) и оборудования – иммуноферментного анализатора Sanofi R 2100, автоматического промывателя Sanofi PW40. Учет и интерпретацию полученных данных проводили с помощью программы xCHECK фирмы IDEXX (США). Постановку реакции ИФА осуществляли согласно наставления к тест-системе. Антитела к вирусу АЧС, которые содержатся в исследуемой сыворотке, препятствуют связыванию специфических моноклональных антител меченых пероксидазой хрона (конъюгат) с антигеном вируса КЧС, который покрывает дно лунок планшета. Визуально комплекс «антиген + антитело» выявляли с помощью субстратного раствора, после внесения которого в лунках планшета развивалось цветное окрашивание. Развитие интенсивного цветного окрашивания в лунке указывает на отсутствие антител к вирусу КЧС в исследуемом образце сыворотки, поскольку антитела конъюгата беспрепятственно связываются с антигеном возбудителя КЧС и наоборот, развитие слабого окрашивания указывает на наличие антител в исследуемом образце сыворотки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В Украине популяция дикого кабана, согласно данным Государственного агентства лесного хозяйства, насчитывает порядка 60 тысяч особей. Ежегодно охотники для отстрела дикого кабана получают в среднем около 5 тысяч лицензий. Согласно приказа Государственной Фитосанитарной службы Украины в стране ежегодно проводятся мониторинги по контролю особо опасных заболеваний в дикой фауне во время охотничьих сезонов.

Результаты серологических исследований сывороток крови от диких кабанов, полученные в течение 2005–2012 гг., представлены в таблицах 1, 2. Таблица 1 – Результаты серологических исследований сывороток крови от диких кабанов на наличие антител к КЧС на территории Украины в 2005–2012 гг.

№ п/п	Охотничий сезон	Количество исследованных сывороток		% положительных
		всего	положительных	
1	2005-2006	514	19	3,7
2	2006-2007	476	50	10,5
3	2007-2008	366	52	14,2
4	2008-2009	754	49	6,5
5	2009-2010	1034	96	9,3
6	2010-2011	939	48	5,1
7	2011-2012	910	36	4,0
	Всего	4993	350	7,0

В течение охотничьих сезонов 2005-2012 гг. было исследовано 4993 образца сывороток крови диких кабанов и получено 350 положительных результатов, что составляет 7,0%.

Динамика выявления серопозитивных к КЧС животных представлена на рисунке 1.

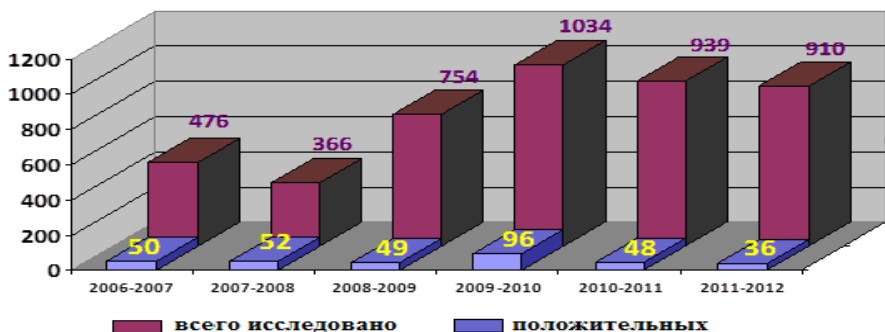


Рисунок 1 – Динамика выявления серопозитивных к КЧС диких кабанов исследованных на протяжении охотничьих сезонов 2005–2012гг.

За период исследования наибольшее количество позитивно реагирующих животных было выявлено в охотничий сезон 2009–2010 гг. – 96 случаев. Следует отметить, что наиболее информативными являются данные по процентному соотношению положительных проб к количеству исследованных (рисунок 2). Данные рисунка 2 свидетельствуют о том, что наибольший процент положительных результатов выявлен в период охотничьих сезонов 2007–2008 гг. – 14,2%

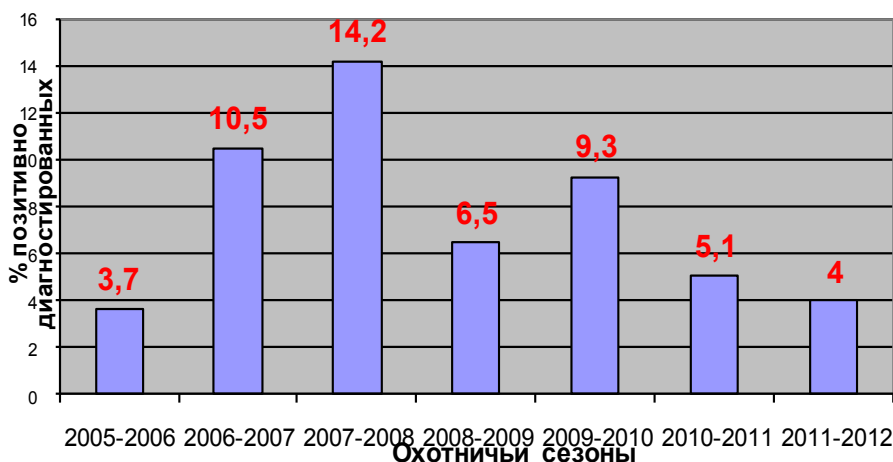


Рисунок 2 – Соотношение положительных проб образцов сывороток к КЧС к общему количеству исследованных образцов на протяжении 2005–2012 гг/

Таблица 2 – Количество серопозитивных к КЧС животных в 2005–2012 гг.

Область	2005-2006	2006-2007	2007-2008	2008-2009	2009-2010	2010-2011	2011-2012
АР Крым	–	–	–	3	4	–	–
Винницкая	4	3	–	–	4	–	–
Волынская	–	–	–	1	1	3	–
Днепропетровская	–	–	–	2	7	–	–
Донецкая	–	1	1	–	1	3	2
Житомирская	–	2	–	1	5	–	19
Закарпатская	–	–	–	–	3	–	–
Запорожская	–	–	–	1	2	–	–
Ивано-Франковская	–	–	–	–	–	–	–
Киевская	–	11	2	15	14	–	1
Кировоградская	5	–	–	–	–	–	–
Луганская	4	–	2	11	1	–	13
Львовская	–	10	–	–	–	2	–
Николаевская	–	–	–	–	–	–	–
Одесская	–	2	20	6	4	–	–
Полтавская	–	6	–	–	14	–	–
Ровенская	–	–	–	–	5	–	–
Сумская	–	–	–	3	6	–	1
Тернопольская	–	–	–	–	1	–	–
Харьковская	–	1	10	3	–	11	–
Херсонская	–	–	–	–	–	–	–
Хмельницкая	–	7	5	–	1	11	–
Черкасская	6	4	5	–	22	11	–
Черновицкая	–	–	4	–	–	–	–
Черниговская	–	3	3	3	1	–	–
ВСЕГО	19	50	52	49	96	48	36

Из представленных в таблице данных можно сделать вывод, что на территории Украины в течение упомянутого периода наблюдения выявляются положительно реагирующие животные. Почти ежегодно серопозитивных диких свиней выявляли в Киевской, Харьковской, Черкасской областях, периодически в АР Крым, Винницкой, Волынской, Днепропетровской, Донецкой, Житомирской, Закарпатской, Запорожской, Кировоградской, Луганской, Львовской, Николаевской, Одесской, Полтавской, Ровенской, Сумской, Черновицкой и Черниговской областях. В Ивано-Франковской и Херсонской областях положительно реагирующих животных в 2005–2012 гг. не выявляли.

ВЫВОДЫ

1 Наличие диких кабанов, у которых выявляются антитела к вирусу классической чумы свиней, свидетельствуют о его циркуляции в дикой фауне, что создает угрозу свиноводству и указывает на необходимость проведения вакцинации всего поголовья.

2 Проведение ежегодного мониторинга среди диких кабанов позволяет контролировать благополучие относительно вируса КЧС на территории Украины.

ЛИТЕРАТУРА

1 Инфекционные болезни животных / [Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вашутин, Е.С. Воронин и др.] под ред. А.А. Сидорчука. – Москва «Колос» 2007. – С. 362–372.

2 Вирусные болезни животных / [В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьёв, Н.В. Фомина]. – Москва, ВНИТИБП, 1998. – С. 111–133.

3 Прискока, В.А. Класична чума свиней (проблеми та перспективи) / В.А. Прискока, А.Ю. Собко, С.В. Аранчій // Київ: Дім, сад, город. – 2000. – С. 59–60.

4 Справочник по болезням свиней / [Собко А.И., Романенко В.Ф., Божко Г.К. и др.]; под ред. А.И. Собко. – [2-е изд.]. – К.: Урожай, 1988. – 360 с.

5 Каришева, А.Ф. Спеціальна епізоотологія: Підручник / Каришева А.Ф. – К.: Вища освіта, 2002. – 323 с.

Головко А.Н., доктор ветеринарных наук
Пинчук Н.Г., кандидат ветеринарных наук
Дмитриева Г.В., аспирант

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

**МОНИТОРИНГ СООТВЕТСТВИЯ ДЕЙСТВУЮЩЕЙ
НОРМАТИВНО - ЗАКОНОДАТЕЛЬНОЙ БАЗЫ В УКРАИНЕ
МЕЖДУНАРОДНЫМ РЕКОМЕНДАЦИЯМ ПО ОБЯЗАТЕЛЬНОМУ
ПЕРЕЧНЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ В СЫРЬЕ
И ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

ВВЕДЕНИЕ

Большое количество ветеринарных препаратов, внесенных в международные нормативные документы, свидетельствует о широком применении их в мире. Существуют данные, что их использование часто сочетается с увеличением доз препаратов, несоблюдением технологических регламентов использования или сроков выдержки животных перед убоем и сроков выдержки использования молока. По данным литературы, до 12% образцов мяса и мясных продуктов в Германии загрязнены остатками антибиотиков, в США – около 27% и во Франции – до 7,4%. Еще больше загрязнено мясо птицы[1,4,5,6].

В США больше 50 % антибиотиков используется в сельском хозяйстве. Такие масштабы их использования привели к тому, что 77,8% мяса и мясных продуктов, которые попадают на рынок, получают от животных, которым вводили антибиотики.[4]

В Голландии при исследовании тканей и органов, полученных от животных, установлено, у 12% крупного рогатого скота, 58% телят, 23% свиней обнаружили позитивные пробы по остаточному количеству антибиотиков. [6]

Качественная и более безопасная продукция отечественных производителей мяса и молока может сделать их привлекательнее как для потребителей, так и для потенциальных инвесторов, а также способствовать продвижению отечественной продукции на внешние рынки. Основным гарантом безопасности продуктов питания в Украине является контроль в сырье и готовых изделиях остаточных количеств ветеринарных препаратов, радионуклидов, пестицидов, токсичных веществ с помощью микробиологических, физико-химических и серологических методов исследования. Допустимые нормы показателей безопасности содержатся в ряде документов, часть которых была утверждена еще в Советском Союзе, то есть они являются

устаревшими и не отвечают современному уровню технической регуляции [2,3,4].

Целью нашей работы был анализ существующей нормативно-законодательной базы по контролю остаточных количеств противомикробных препаратов в продуктах животного происхождения в Украине и странах ЕС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом для исследования были международные и государственные стандарты, директивы, законы, научные статьи и государственные годовые отчеты по мониторингу остаточного количества противомикробных препаратов в продуктах животного происхождения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проанализировав существующую нормативно законодательную базу стран Европы и Украины, мы отметили существенную разницу между отечественными и международными стандартами. В государственных стандартах четко сформулированные требования к качеству безопасности для конкретной группы товаров [1,2,3]. А международные стандарты не являются стандартами в нашем понимании, поскольку в них сформулированы лишь методики определения содержимого определенных веществ в мясной продукции птицеводства, которыми обязаны пользоваться все предприятия-производители [2,7,8]. Медико-биологические требования по содержанию вредных веществ в мясе и показатели качества продукции животноводства сформулированы в Codex Alimentarius и Директивах ЕС. Следовательно, главное отличие – это разные подходы к методологической основе создания действующей нормативной документации:

1 В Украине используется сложная вертикальная система, то есть стандарты разрабатываются на каждую классификационную единицу продукции.

2 В международной практике используют горизонтальную систему нормативно-правовых актов (директив) для широкого круга продукции по принципам Codex Alimentarius.

В национальных стандартах ДСТУ 3136 – 95 и ДСТУ 3143 – 95 в мясе птицы по показателям безопасности определяют наличие: антибиотиков, гормональных препаратов, микотоксинов, радионуклидов, токсичных элементов, нитрозаминов, патогенных микроорганизмов. А в Codex Alimentarius рассматривают гигиену пищевых продуктов, маркировку продуктов, методы анализа и отбора проб, правила импортирования продуктов, сертифицированные системы проверки рыбы и рыбных продуктов, молока и молочных продуктов, загрязнители в пищевых продуктах, остатки ветеринарных медикаментов в пищевых продуктах и другое.

В мировом содружестве остатки антибиотиков определяют по

CAC/mrl – 02, а страны Евросоюза для определения этих показателей руководствуются Директивами № 2377 и № 1815/2001. В соответствии с МБТ 5061– 89 «Обязательный минимальный перечень исследований» остатки антибиотиков контролируют в свежем, охлажденном и замороженном мясе птицы. Общее количество препаратов, которое определяет настоящий документ, 3 (препараты тетрациклиновой группы, гризин и цинкбацитрацин). В отличие от национальных документов, в мировой практике определяют большее количество остатков ветеринарных препаратов:

- в соответствии с CAC/mrl 02 в мировом содружестве контролируют 49 ветеринарных препаратов;

- в соответствии с № 2377/90 и № 1815/2001 – вообще 124.

Нужно отметить, что антибиотиками, общими для контролирования по государственным и международным нормативным документам, являются лишь препараты тетрациклиновой группы. А гризин и цинкбацитрацин, который определен для контролирования по МБТ 5061 – 89 «Обязательный минимальный перечень исследований», в Европе вообще не контролируется. К тому же по МБТ – 5061 – 89 «Обязательный минимальный перечень исследований» невозможно понять, какие части убойных животных необходимо использовать в качестве образца для исследования: мясо, туши или органы. Единицы измерения, отмеченные в МБТ 5061– 89, отличаются от системы измерения в международной практике. Сравнительные данные отечественных европейских и международных документов по обязательному минимуму исследований по содержанию противомикробных препаратов, приведены в таблице 1, где видны представители основных групп противомикробных препаратов.

На сегодня в нашей стране нет скоординированной программы контроля за остаточными количествами антибиотиков, нет четко определенных и допустимых норм противомикробных препаратов в продуктах животного происхождения, а только на некоторые антибиотики (пеницилины, стрептомицин, тетрациклин, цинкбацитрацин).

Во-первых, единицы измерения остаточного количества антибиотиков в Украине отличаются от системы измерения в ЕС; во-вторых – в Украине определяют остаточное количество лишь бацитрацина (0,02 ОД/г), стрептомицина (0,5 ОД/г), левомецетина (0,01 мг/кг), тетрациклина (0,01 ОД/г), и бензилпеницилина (ОД/г), где в нормативной документации указываются допустимые концентрации данных антибиотиков в продуктах питания. А такие, как: триметоприм, амоксицилин, фуразолидон, цефазолин, сульфадиметоксин, неомицин, энрофлоксацин и другие, которые встречаются в отечественной и импортной продукции, не контролируются и не имеют критерия допустимых норм в продуктах питания. В международной документации сурово запрещается присутствие таких противомикробных препаратов, как хлорамфеникол (в Украине – 0,01 мг/кг).

УДК 619:616.371:616.98:[578.824.11:578.831.2:578.822.2]

Таблица 1 – Перечень противомикробных препаратов и их допустимых минимальных концентраций в продуктах животноводства стран Европы и Украины

Антибиотик	Допустимые концентрации антибиотиков в Европе			Допустимые концентрации антибиотиков в Украине		
	Название продукта	Вид жив.	Допустимая концентрация	Название продукта	Вид животного	Допустимая концентрация
Триметоприм	мясо, жир, печень, молоко	все	50 мкг/кг			
Амоксицилин	мясо, жир, печень, молоко	все	50 мкг/кг 4 мкг/кг			
Ампициллин	мясо, жир, печень, молоко	все	50 мкг/кг 4 мкг/кг			
Бензилпенициллин	мясо, жир, печень, молоко	все	50 мкг/кг 4 мкг/кг	молоко, масло	КРС, ДРС	0,01 ОД/г
Энрофлоксацин	мясо, молоко	КРС, ДРС, свинина, птица	100 мкг/кг			
Эритромицин	мясо, жир, печень, молоко, яйца	все	200 мкг/кг 40 мкг/кг 150 мкг/кг	мед	–	не допуск.
Тетрациклиновый ряд	мясо, жир, печень, молоко, яйца	Все	100 мкг/кг 300 мкг/кг 100 мкг/кг 200 мкг/кг	мед, мясо, жир, молоко, яйца	все	не допуск. 0,01 ОД/г
Гентамицин	мясо, жир, печень, молоко	КРС, свинина	50 мкг/кг 200 мкг/кг 100 мкг/кг			
Канамицин	мясо, жир, печень, молоко	все	100 мкг/кг 600 мкг/кг 150 мкг/кг			
Неомицин	мясо, жир, печень, молоко, яйца	все	500 мкг/кг 1500 мкг/кг 500 мкг/кг	мед	–	не допуск.
Стрептомицин	мясо, жир, печень, молоко	КРС, ДРС, свинина	500 мкг/кг 200 мкг/кг	мед, яйца, молоко, масло	все	не допуск. 0,5 ОД/г
Бацитрацин	молоко	КРС	100 мкг/кг	мясо, птица, жир, яйца	все	0,02 ОД/г
Цефазолин	молоко	КРС	50 мкг/кг			
Цефалексин	мясо, жир, печень, молоко	КРС	200 мкг/кг 100 мкг/кг			
Сульфаниламиды	мясо, жир, печень, молоко	все	100 мкг/кг			
Хлорамфеникол	все	все	не допуск.	мясо, птица, жир, яйца, молоко	все	0,01 мг/кг
Нитрофурановые	мясо, жир, печень	все	5 мг/кг			

Основные группы противомикробных препаратов (сульфаниламид, нитрофураны, аминогликозиды, бета лактамы и др.), которые часто используются в ветеринарной практике и встречаются в продуктах животного происхождения, оговорены в международных документах и утверждены их максимально допустимые концентрации в продуктах и субпродуктах.

В Украине не допускается наличие остаточных количеств стрептомицина, неомицина, эритромицина и тетрациклина в меде. Как известно обязательный минимальный перечень исследований сырья, продукции животного и растительного происхождения, комбикормового сырья, комбикормов, витаминных препаратов и др., которые следует проводить в государственных лабораториях ветеринарной медицины и за результатами которых выдается ветеринарное свидетельство (ф – 2), предусматривает определение в пчелином меде лишь двух антибиотиков: тетрациклина и стрептомицина. Это намного меньше количества загрязнителей, предусмотренных Директивами ЕС, которые подлежат обязательному контролю в Европе.

ВЫВОДЫ

По результатам проведенных исследований национальной и международной законодательной базы контроля качества и безопасности продукции животного происхождения было определено:

1 На текущий момент некоторые проработанные нормативные документы не согласованы между собой, нет логической последовательности мероприятий, четкой методики, относительно воссоздания надлежащей производственной среды в Украине;

2 Имеющиеся методические положения по контролю и оценке производства на соответствие требованиям по безопасности и качеству имеют общий характер, в них не описан детальный план действий и процедур такой работы;

3 В Украине нет целостной стратегии совершенствования системы качества и безопасности продукции;

4 Отечественные документы, в сравнении с европейскими и международными, содержат незначительное количество ветеринарных препаратов (в странах ЕС определяют 74 препарата, в Украине согласно нормативной документации – 4). Поэтому оптимизация отечественных показателей возможна по средствам расширения перечня противомикробных препаратов и приведения их норм и системы измерения в соответствие с международными требованиями.

ЛИТЕРАТУРА

1 Проект "Загальнодержавна цільова економічна програма здійснення моніторингу залишкових кількостей ветеринарних препаратів та забруднюючих речовин у тваринах, продуктах тваринного походження і кормах, а також харчових продуктах, підконтрольних ветеринарній службі на 2008 –

2013 роки."

2 ГОСТ Р 51600 – 2000: Молоко. Методы определения антибиотиков. Госстандарт России. Москва.– 2000.– № 127.

3 «Обов'язковий мінімальний перелік досліджень сировини, продуктів тваринного і рослинного походження, комбікормів, вітамінних препаратів та ін.» / Наказ Державного департаменту ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України від 18 листопада 2003 року N 87.

4 Бурыкина И.М., Гомзикова И.Д., Андреева Г.В. Качество и безопасность молочных консервов // Мол.пром. – 2003.– №11. – С. 15 – 16.

5 Ветеринарно-санітарний контроль якості молока і молочних продуктів за державними стандартами на ринках / В.І. Хоменко, Г.Ф. Риженко, А.І. Тютюн та ін.// Наук.вісник НАУ – Київ, 2000. – №28. – С. 39 – 44.

6 Ветеринарно-санітарний контроль харчових продуктів на ринках. Рекомендації. Львівська ДАВМ. – Львів, 2000. – 48 с

7 Comission Regulation (EEC) N675 /92 of amending Annexes 1 and 3 of Council Regulation (EEC) N 2377 / 90 laing down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Official journal of the European Communities N L 73/8. – 1992.

8 FAO Residues of some veterinary drugs in animals and food // Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) : Food and Nutrition Paper. – 1990. – N 41.

Яненко У. Н., кандидат ветеринарных наук

Гудзь Н. В., кандидат ветеринарных наук

Яненко В. М., научный сотрудник

Ничик С. А., доктор ветеринарных наук, профессор

Институт ветеринарной медицины НААН Украины, г. Киев

**АНТИЛИЗОЦИМНЫЕ И ТОКСИНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА
ВАКЦИННОГО ШТАММА ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ
*B. ANTHRACIS UA -07***

ВВЕДЕНИЕ

Сибирская язва, как заболевание общее для людей и животных, не теряет своей актуальности и сегодня. Анализ ведомостей Международного эпизоотического бюро свидетельствует о ее значительном распространении среди животных разных видов на всех континентах. Эпизоотическая ситуация в Европе по сибирской язве за 2012 год следующая: Азербайджан – 1 вспышка заболевания, Армения – 2, Украина – 2, Словакия – 2, Хорватия – 2, Италия и Германия по 1 вспышке. Как видим, случаи этого заболевания хоть и спорадические, но они продолжают регистрироваться.

Даже на фоне созданного благополучия, из-за специфичности возбудителя сибирской язви (длительное его сохранение в почве и т.д.) сохраняется постоянная угроза заболевания людей и животных вирулентными формами *B. anthracis*. Именно поэтому необходимо иметь эффективные средства и методы диагностики заболевания, которые позволят за достаточно короткий промежуток времени установить достоверный диагноз и своевременно провести профилактические и лечебные мероприятия по ликвидации очагов сибирязевенных инфекции. Поэтому получение новых знаний о биологических особенностях *B. anthracis* является актуальным и своевременным.

Ряд ученых (Terry H. Conger (2003г.), Бухарин О. В. (2000г.), Бран Л. Е. (1984г.)) приводят данные о резистентности возбудителя сибирской язви к ряду антибактериальных и дезинфицирующих препаратов. Одним из существенных признаков патогенности и способности к персистенции патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в макроорганизме является продуцирование бактериями субстанций, инактивирующих факторы неспецифической противoinфекционной защиты: лизоцима, комплемента, интерферона, а также специфической защиты – иммуноглобулинов т.д. [4]. Наличие у бактерий таких факторов, как лизоцимная активность, обеспечивает им селективные преимущества роста и размножения в живом организме. Исследование антилизоцимной активности (АЛА) позволяет определить

уровень патогенности *B. anthracis* по отношению к защитным силам организма. Поиск средств воздействия на этот фактор *B. anthracis* открывает большие перспективы в разработке средств профилактики и терапии.

Основной отличительной чертой возбудителя сибирской язвы *B. anthracis* (вирулентные, вакцинные штаммы) является способность во время развития *in vivo* и/или *in vitro* производить и выделять за пределы клеточной оболочки продукт своего метаболизма – экзотоксин, который вызывает формирование специфического иммунитета [5, 6, 7]. Продукт метаболизма вегетативной формы указанного микроба состоит из трех компонентов: протективный антиген (защитный; РА), эдематогенный фактор (отечный; ЕФ) и латентный (НФ) [8].

По силе своей токсичности и по количеству токсина, который продуцирует *B. anthracis*, полевые и вакцинные культуры резко отличаются. Полевые изоляты продуцируют экзотоксин в малых количествах, но он высоко агрессивен, 70 % его состава содержит латентный и отечный факторы и только 30 % – защитный. У вакцинных штаммов преимущество имеет протективная фракция, но и они отличаются между собой по интенсивности и количеству продуцированного экзотоксина [9].

Целью нашей работы является изучение уровня антилизосимной активности (АЛА) и определение титра токсиногенности референтной культуры *B. anthracis* UA-07.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали референтный спорообразующий безкапсульный штамм *B. anthracis* UA-07, который сеяли на МПБ + 10% раствор глюкозы. АЛА определяли микробиологическим методом, который разработан Бухариным О. В. и соавторами [10] и усовершенствован сотрудниками нашей лаборатории [11]. Суть метода: культуры микроорганизмов культивируют на питательной среде (МПА), которая содержит от 0,2 до 25 мкг/см³ лизоцима. Эффект инактивации лизоцима определяли по росту на питательной среде индикаторной культуры микрококка. Для определения токсинообразования использовали реакцию диск-преципитации (РДП) в модификации Завирюхи А. И., Степанюк О. П. [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе эксперимента были получены данные по определению АЛА у референтной культуры *B. anthracis* UA-07 после лиофилизации и через 3 месяца после пассажа ее на питательных средах, и заражения лабораторных животных. В это же время проводились наблюдения по токсиногенности данной культуры.

Так, *B. anthracis*, после освобождения от лиофильной защитной среды методом посева МПБ имеет достаточно высокий уровень АЛА – 15 мкг/см³ (рисунок 1).

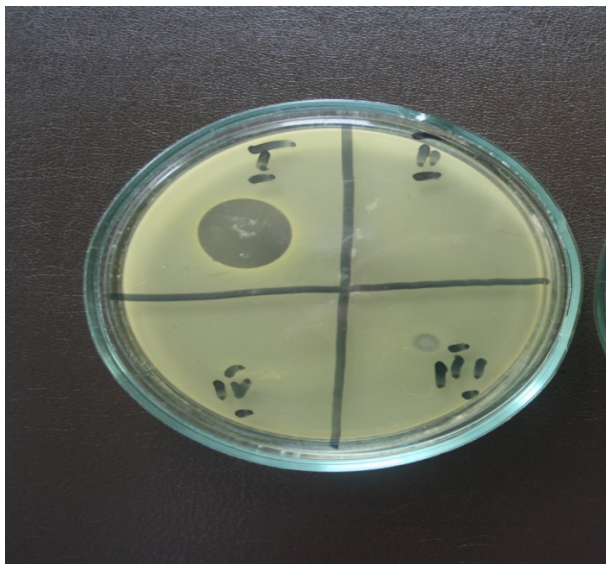


Рисунок 1 – I – *B. anthracis* UA-07, II–IV – антракоиды

После проведения пассажей культуры через питательные среды с добавлением глюкозы, а также на лабораторных животных (белых мышах, $n = 10$ и морских свинках, $n = 10$), указанный показатель персистенции *B. anthracis* UA-07 через 3 месяца увеличил свое значение до 26 мкг/см³. То есть АЛА исследуемой культуры возросла в 1,7 раз по сравнению с культурой освобожденной от лиофильной защитной среды.

Возрастание АЛА свидетельствует о повышении уровня патогенности *B. anthracis*, с которым возрастает и персистентность изучаемой культуры. Такие исследования необходимы для изучения устойчивости *B. anthracis* к антибиотикам и препаратам для дезинфекции.

В эти сроки помимо определения АЛА нами изучалась токсиногенность *B. anthracis* UA-07. Исследования показали, что у исследуемого штамма возбудителя сибирской язвы после лиофилизации в РДП уровень токсинов определялся в титре 1:16. Через три месяца культивирования исследуемого штамма титр увеличился до 1:68 (рисунок 2). То есть титр токсигенности данной культуры увеличивается в 4 раза.

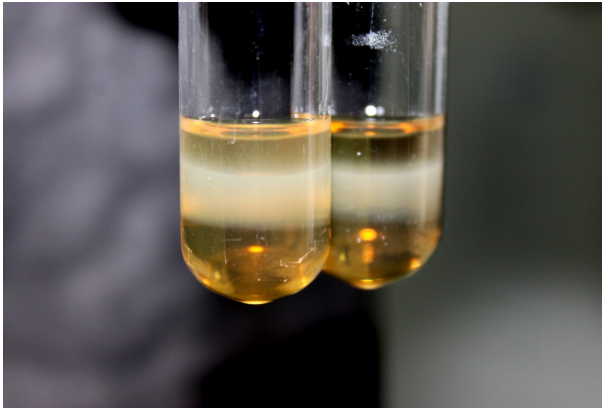


Рисунок 2– Реакция диск-преципитации для определения токсиногенности *B. anthracis UA*

ВЫВОДЫ

1 Для исследуемого штамма *B. anthracis UA-07* свойственен высокий уровень АЛА – 26 мкг/см³, который снижается при лиофилизации культуры, но при ее рекультивировании снова восстанавливается.

2 Титр токсиногенности референтной культуры *B. anthracis UA-07* повышается в 4 раза при культивировании, что является важным показателем для конструирования вакцин.

ЛИТЕРАТУРА

1 Бран, Л. Е. Бактериальная резистентность и чувствительность к химио-препаратам / Л. Е. Бран. – М.: Медицина.- 1984. – 272 с.

2 Бухарин, О. В. Персистенция патогенных бактерий: теория и практика/ О. В. Бухарин // Журн. микробиол. – 2000. – № 4. – С. 4–7.

3 Бухарин, О. В. Метод определения антилизоцимной активности микроорганизмов / О. В. Бухарин, Б. Я. Усвятцов, А. П. Малышкин, Н. В. Немцова // Журн. микробиол. – 1984.– № 2. – С. 27–28.

4 Гамалея, Н. Ф. Работы по изучению сибирской язвы / Гамалея Н.Ф. // Собрание сочин. – М.: Медгиз, 1956. – Том 1. – С. 97–136.

5 Завирюха, А. И. Метод ускоренной диагностики сибирской язвы / А. И. Завирюха, О. П. Степанюк // Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой. – М. – 1978. – С. 127–130.

6 Завирюха, Г. А. Відбір вакцинних штамів збудника сибірки: методичні рекомендації / Г. А. Завирюха, А. І. Завирюха, В. М. Бобильов та ін. // К.:

МВЦ «Медінформ», 2011. – 12 с.

7 Колесов, С. Г. Иммуитет. Сибирская язва / С. Г. Колесов, Г. В. Дунаев, Г. И. Романов // Москва: Колос, 1976. – С. 177–197.

8 Методичні рекомендації з вивчення антилізоцимної активності (АЛА) мікроорганізмів / В. Г. Скрипник, О. Є. Айшпур, Є. Г. Павлов, У. М. Яненко, В. М. Яненко та ін. – Київ. – 2010. – 16 с.

9 Сидорчук, Л. І. Антилізоцимна активність провідних збудників хронічного уретриту / Л. І. Сидорчук // Буковинський медичний вісник. – Чернівці, 2009. – Т. 13. – № 2. – С. 45–48.

10 Ушкалов, В. О. Результати комісійних досліджень вакцин проти сибірки тварин із штаму *Bacillus anthracis* Sterne 34 F2 / В. О. Ушкалов, О. В. Мачуський, М. Є. Романько [та ін.] // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту: Зб. наук.праць. – Біла Церква. – 2011. – Вип. 7 (83). – 102 с.

11 Terry, H. Conger Epizootiology and Ecology of Anthrax / Terry H. Conger, Susan A. Maroney, Patti R. Rosenfelder et. al. // USDA: Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS). Centers for Epidemiology and Animal Health. – 2003. – 44p.

12 Thorne, B. C. Production of toxin in vitro by *Bac. anthracis* and its separation into two components / B. C. Thorne, D. M. Molnar, R. E. Stronge // Journ. Bacteriol. – 1960. – Vol. 79. – №3. – P. 450–455.

Сусский Е.В., кандидат ветеринарных наук

Армавирская биофабрика, г. Армавир, Краснодарский край

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ БАКТЕРИЙ И ВИРУСОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНО-КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

ВВЕДЕНИЕ

При современном ведении промышленного животноводства наиболее острой проблемой являются респираторно-кишечные заболевания крупного рогатого скота, которые протекают по типу ассоциативных инфекций и обусловлены комплексом патогенных и условно-патогенных возбудителей вирусной и бактериальной природы. Практикой доказано, что именно бактериально-вирусные инфекции протекают тяжелее и сопровождаются значительными отбесами и массовой гибелью молодняка. Установлено также, что уровень опасности ассоциативных инфекций существенно возрастает в условиях крупных животноводческих комплексов [1,6].

В этиологической структуре респираторно-кишечных заболеваний вирусы ПГ-3, ИРТ, РС, ВД и некоторые другие занимают значительное место и в ассоциации с патогенами бактериальных инфекций (колибактериозом, сальмонеллезом, пастереллезом) вызывают, в особенности у молодняка крупного рогатого скота, респираторные заболевания, диарею, а у взрослых животных – бесплодие и поражение генитальных органов. Для профилактики и лечения респираторно-кишечных инфекций крупного рогатого скота рекомендуются антибиотики, иммуноглобулины, моно- и поливалентные сыворотки крови животных. Применение антибиотиков влечет за собой селекцию антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов, поэтому их использование наиболее оправдано лишь в период острых вспышек заболеваний животных [1,3].

При установленном диагнозе выраженным терапевтическим эффектом обладают моновалентные сыворотки крови. Однако для экстренной профилактики и лечения ассоциативных инфекций смешанной этиологии наиболее перспективны поливалентные сыворотки крови, применение которых имеет неоспоримые преимущества в плане сокращения количества лечебных и профилактических инъекций, снижения уровня аллергизации, повышения сохранности и продуктивности животных. Поэтому увеличение валентности и активности поливалентных сывороток крови за счет антивирусных антител, в частности против ПГ-3 и ИРТ, важно и экономически оправдано. Основные принципы и требования к производству и контролю

поливалентных сывороток крови животных против бактериальных и вирусных инфекций остаются, в основном, неизменными. Однако процессы подбора и селекции штаммов, оптимизации состава поливалентных антигенов, схемы гипериммунизации животных-продуцентов сывороток крови и технологических процессов производства и количественных методов контроля активности гипериммунных сывороток крови животных должны постоянно совершенствоваться с учетом технологического прогресса и требований практики, так как вопросы качества, себестоимости изготовления и конкурентноспособности лечебных препаратов на мировом рынке являются чрезвычайно актуальными [2,4].

Цель исследований – проведение подбора и характеристика штаммов бактерий и вирусов, используемых для производства поливалентной сыворотки для профилактики и лечения респираторно-кишечных инфекций крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в условиях Армавирской биофабрики. При реализации данной проблемы решались задачи подбора и оценки совместимости штаммов вирусов и бактерий. Получение сыворотки против пастереллеза, сальмонеллеза, эшерихиоза, парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

Для отбора и паспортизации штаммов бактерий и вирусов для гипериммунизации волов продуцентов сывороток крови, предназначенных для профилактики и терапии респираторно-кишечных инфекций крупного рогатого скота, предусматривался подбор и селекция штаммов бактерий и вирусов с выраженными антигенными свойствами, оптимизация состава поливалентного антигена и его эффективность при гипериммунизации животных-продуцентов. Основными требованиями, предъявляемыми к бактериальным и вирусным антигенам, предназначенным для гипериммунизации продуцентов, являются биологические свойства и антигенная структура микроорганизмов, изолированных от различных видов животных [3,5].

Для получения и контроля активных вирусных антигенов ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота в качестве клеточного субстрата изучена и предложена из коллекции ВНИИВВиМ сублиния клеток почки быка MDBK. Тест-культура паспортизована в соответствии с требованиями отечественных и международных стандартов и методом проточной цитометрии.

Культивирование клеток MDBK и производственных штаммов ПТК 45/86 и ТК-А/ВИЭВ вирусов ПГ-3 и ИРТ осуществляли в пластиковых бутылках (Rolle bottle Cellmaster) фирмы Greiner boi-one (Germany) на ролирной установке фирмы Weaton (USA) со скоростью 12 об/час. Посевная концентрация клеток и доза заражения составляли соответственно 120–150 тыс/см³ и 0,1–0,05 ТЦД₅₀/мл, а время культивирования вирусов ПГ-3 и ИРТ не превышало 72 и 48 часов при температуре (37)⁰С [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При выборе штаммов пастерелл и сальмонелл анализу были подвергнуты возбудители с выраженными антигенными свойствами, используемые при производстве лечебных и иммунобиологических препаратов.

В результате сравнительного изучения из 46 исследованных микроорганизмов были отобраны и дополнительно изучены штаммы *P. multocida* 8683 (серотипа А), 656 (В), Т80 (Д) и *P. haemolytica* 169 (А1), а также штаммы *S. typhimurium* 371 и *S. dublin* 373, морфология, антигенная структура, гемолитические свойства и вирулентность которых были типичными и соответствовали их видовому происхождению. Культуральные свойства штаммов пастерелл и сальмонелл также существенно не различались и были типичными как на жидких, так и на плотных питательных сред. Отмечено, что штамм *P. multocida* 8683 содержит соматический антиген липоидно-полисахаридно-полипептидного состава, капсульный антиген, продуцирует эндо- и экзотоксины. ЛД₅₀ для белых мышей составляет 100 микробных клеток. Штамм *P. multocida* типа В 656 содержит антигены аналогичного состава и продуцирует эндотоксины. ЛД₅₀ для белых мышей составляет 10 микробных клеток. Штамм *P. Multocida* типа Д Т80 содержит антигены аналогичного состава и продуцирует дерматонекротический экзотоксин. ЛД₅₀ белых мышей составляет 150 микробных клеток. Штамм *S. dublin* 373 содержит 01, 9 и 12-соматические (термостабильные) Н, g и р-жгутиковые (термолабильные) и К-поверхностный (капсульный антигены), Vi антиген вирулентности и М антиген (слизистый), холероподобный энтеротоксин и эндотоксин ЛПС. ЛД₅₀ для белых мышей составляет 7×10^3 микробных клеток. Штамм *Salmonella enteridis* 7 содержит 01, 9, 12-соматические (термостабильные), Н, g, m-жгутиковые (термолабильные) и К-поверхностный (капсульный) антигены, Vi антиген вирулентности холероподобный энтеротоксин и эндотоксин. ЛД₅₀ для белых мышей составляет 10^3 микробных клеток. Штамм *Salmonella choleraesuis* 370 содержит 06 и 7-соматические (термостабильные), Н, g, 1,5-жгутиковые (термолабильные) и К-поверхностный (капсульный) антигены, Vi антиген вирулентности, холероподобный энтеротоксин и эндотоксин. ЛД₅₀ для белых мышей составляет 80 микробных клеток. Штамм *Salmonella abortusovis* 372 содержит 01,2,12-соматические (термостабильные), Н, g, и 1,6-жгутиковые (термолабильные) и К-поверхностный (капсульный) антигены, Vi антиген вирулентности, холероподобный энтеротоксин и эндотоксин ЛПС. ЛД₅₀ для белых мышей составляет 2×10^5 микробных клеток. Штамм *Salmonella typhimurium* 371 содержит 01, 4, 5, 12-соматические (термостабильные), Hi,1, 2-жгутиковые (термолабильные) и К-поверхностный (капсульный) антигены, Vi антиген вирулентности и М антиген (слизистый), холероподобный энтеротоксин и эндотоксин. ЛД₅₀ для белых мышей составляет 1×10^3 микробных клеток. При выборе штаммов эшерихий учитывали факторы патогенности возбудителей сельскохозяйственных животных. Для изготовления поливалентного

антигена были отобраны и аттестованы штаммы *E. Coli* 355–37/13 (0,9:K30); 305–37/11 (078:K80); 115/2 (0115) – продуценты соматических и полисахаридных капсульных антигенов и штаммы 334–37/12 (0141:K87:K88); 453–37/17 (0115:K88); 454–37/17 (0141:K99); 397–37/14 (09:K103:987) и 398–37/14(0101:F41) – продуценты адгезивных антигенов (K88, K99, 987P, F41) в фосфатно-мочевинном буфере, термолабильного и термостабильного антигенов и вероанатоксина.

Общая характеристика морфологических, культуральных, антигенных, вирулентных свойств и антибиотикочувствительности штаммов эшерихий. Следует также отметить, что штаммы *E. Coli* ВГНКИ 305–37/11 (078:K80); ВГНКИ 355–37/13(09:K30) и 0115/2 (0115) являются, кроме того, активными продуцентами термостабильного токсина, который стабильно накапливается в бульоне Хоттингера в процессе периодического культивирования микроорганизмов. Индекс дилатации на изолированной петле кишечника кролика составлял: для штамма ВГНКИ №305–37/11 – 1,2–1,5; ВГНКИ №355–37/13 – 1,1–1,4 и ВГНКИ №398–37/14 – 1,0–1,2. Оптимальными условиями, при которых наблюдалось максимальное накопление термостабильного токсина в культуральной жидкости, являлись рН среды 8,0–8,5 и температура 36–36,5⁰С. Термостабильный токсин представлял собой низкомолекулярный белок и состоял из субъединиц с молекулярной массой 4400–5100 дальтон. В лиофилизированном препарате содержалось 93–94% белка, 4–5% липидов и 1–2% углеводов. Термостабильный токсин термостабилен и инактивировался при температуре 100⁰С в течение 15 минут. Изoeлектрическая точка термостабильного токсина при рН 10. Титр термостабильного токсина, содержащегося в среде культивирования, в РДП с моноспецифической антисывороткой (титр 1:16) составлял 1:4–1:8. Термолабильный и термостабильный анатоксины используются в поливалентном антигене для выработки сывороток крови гипериммунизированных волов-продуцентов антитоксических антител, нейтрализующих энтеротоксическое действие энтеропатогенных эшерихий.

Исследование чувствительности микроорганизмов к 18 наиболее широко используемых в практике антибиотикам показало, что все исследуемые штаммы были резистентны к тетрациклину, олеандомицину и ристомицину (за исключением *E. insidiosa*), новобиоцину, метициллину (за исключением *P. multocida*), бензилпенициллину, оксациллину и высокочувствительны к мономицину, неомицину, канамицину, гентамицину и левомицетину. К оставшимся антибиотикам штаммы проявляли, как правило, различную степень чувствительности или были устойчивы. Резистентность штаммов к антибактериальным веществам обусловлена плазмидами R и может быть перенесена от одного штамма к другому. Полученные данные показали, что исследованные штаммы обладают достаточно широким спектром устойчивости к антибиотикам. Это связано с массовым применением последних, при терапии и профилактике различных болезней животных, а

также в составе кормовых добавок. Следовательно, угроза распространения множественной лекарственной устойчивости микроорганизмов с расширением ассортимента антибактериальных веществ за счет новых препаратов не уменьшается, а, наоборот, возрастает. Поэтому лечение бактериальных инфекций с помощью антибиотиков в ряде случаев малоэффективно.

Для изучения антигенной активности поливалентного антигена использовали 3 вола-производителя (ВП) красной степной породы, которых предварительно обследовали, карантинировали и иммунизировали в соответствии с требованиями НД. Антигенные свойства препаратов оценивали на ВП в возрасте 3,5–4 года и массой выше 450 кг по следующей схеме (таблица 1). Антигены вводили подкожно в области шеи и верхней части туловища, но не ближе 10–15 см от заднего края лопатки.

Таблица 1 – Характеристика антигенных свойств бактериальных компонентов поливалентного антигена пастерелл, сальмонелл и эшерихий

№ п/п	Дни инъекций антигенов	Наименование антигенов					
		Пастереллез		Сальмонеллез		Эшерихиоз	
		Доза антигена см ³	ТА в РА	Доза антигена см ³	ТА в РА	Доза антигена см ³	ТА в РА
1	1	2	<1:10	4	<1:10	4	<1:10
2	5	4	1:10	8	1:10	8	1:20
3	9	6	1:12,5	12	1:12,5	12	1:20
4	13	8	1:16	16	1:25	16	1:50
5	17	10	1:32	20	1:50	20	1:100
6	21	12	1:64	24	1:100	24	1:200
7	25	15	1:128	30	1:200	30	1:400
8	29	20	1:256	40	1:400	40	1:800
9	33	25	1:512	50	1:800	50	1:1600
10	37	30	1:1024	60	1:1600	60	1:3200
	37	132	1:1024	264	1:1600	264	1:3200

Примечание – ТА – титр антител; РА – реакция агглютинации

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что отобранные и аттестованные в ВГНКИ штаммы пастерелл, сальмонелл и эшерихий характеризуются выраженными антигенными свойствами и позволяют в процессе гипериммунизации волов-производителей получать активные сыворотки против указанных выше инфекций.

В результате исследований установлено, что изолированные клетки тест-культуры не имели вирусной и микоплазменной контаминации, сохраняли морфологические и кариологические показатели и видовую принадлежность и обладали высоким ростовым потенциалом (ИП 3–5), что обусловлено как низкими значениями размеров ($18,6 \pm 3,65$ мкм) и гранулярности (МЕАМ 9387), так и более высокими показателями полиферирующих клеток, в том числе в фазах G-2+M (17,5%), S+G2+M (63,8%) и оптимальным соотношением G2/G1, равным 1,96.

Максимальное накопление вирусов ПГ-3 ($7,47 \pm 0,06$ lg ТЦД_{50/см³}) и ИРТ ($7,60 \pm 0,04$ lg ТЦД_{50/см³}) регистрировали соответственно через 72 и 48 часов культивирования. Постоянное использование стандартных по качеству ПС Игла МЕМ и клеточного субстрата явилось основой для эффективного производства стандартных антигенов ПГ-3 и ИРТ с активностью в пределах 6,67–7,5 и 7,0–8,9 lg ТЦД_{50/см³}. В предварительных исследованиях оценивали влияние активности культуральных антигенов ПГ-3 и ИРТ на уровень накопления вируснейтрализующих антител (ВНА) в СК волово-продуцентов. В качестве антигена на первом этапе использовали «Вакцину против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, сухую культуральную ассоциированную» - СТО 90482861-0016-2006 производства Ставропольской биофабрики с активностью антигенов ПГ-3 и ИРТ соответственно на уровне 5,0–5,5 lg ТЦД_{50/мл} и 5,33–5,5 lg ТЦД_{50/мл} и аналогичные штаммы ПТК 45/86 и ТК-А/ВИЭВ вирусов, репродуцированные в сублинии клеток MDBK-ECACC с активностью 7,0–7,33 lg ТЦД_{50/мл}. Гипериммунизацию ВП массой 450 кг проводили с интервалом 21 сут в дозе по 4 мл (таблица 2). Показано, что культуральные антигены ПГ-3 (7,0 lg ТЦД_{50/мл}) и ИРТ (7,33 lg ТЦД_{50/мл}) характеризуются более выраженными антигенными свойствами и после 2-хкратного применения обеспечивают в 3,5–4 раза более высокое накопление антител.

Таблица 2 – Влияние активности культуральных антигенов на эффективность гипериммунизации ВП против ПГ-3 и ИРТ

Характеристика антигена	Активность вирусов, lg ТЦД _{50/мл}	Активность СК, log ₂		Активность СК на 37 суток наблюдения, log ₂
		Сроки введения антигенов , сут		
		1	21	
Вакцина 1 - ПГ-3 - ИРТ	5,0 5,33	0 0	2,5 2,0	4,0–4,5 3,0–3,5
Культуральный антиген - ПГ-3 - ИРТ	7,0 7,33	0 0	4,0 3,67	6,0–6,5 5,0–5,67

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате исследований были подобраны высоко-иммуногенные штаммы пастерелл, сальмонелл и эшерихий и отработан роллерный метод репродукции вирусов ПГ-3 и ИРТ, позволяющие при иммунизации животных получать высокие титры антибактериальных и противовирусных антител.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Болезни сельскохозяйственных животных / П.А.Красочко М.В.Якубовский, А.И.Ятусевич и др./ Под ред. П.А. Красочко. Минск: Бизнесофсет, 2005. – 800 с.
- 2 Ковалев, Н.А., Красочко П.А. Вирусы и прионы в патологии животных и человека. / Минск, Беларуская навука, 2012. – 426 с.
- 3 Солонеко, А.А., Гласкович А.А., Алешкевич В.Н. Практикум по частной микробиологии. - Минск: РУП Изд-во "Ураджай", 2000. – С. 51–57.
- 4 Сюрин, В.Н., Вирусные болезни животных.//В.Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко [и др.] – М.: ВНИИТИБ., 1998. – 928 с.
- 5 Сюрин, В.Н. Диагностика вирусных болезней животных// Р.В.Белоусова, Н.В. Фомина [и др].–Справочник.–М.: Агропромиздат, 1991. – 528 с.
- 6 Частная эпизоотология: учеб, пособие для студентов высших учебных заведений / В.В. Максимович [и др.]; под ред. В. В. Максимовича. – Минск: ИВЦ Минфина, 2010.

Ломако Ю.В., кандидат ветеринарных наук, доцент

Новикова О.Н., кандидат ветеринарных наук

Гусев А.А., доктор ветеринарных наук, профессор

Пукшлис А.И., аспирант

Конончик Е.С., младший научный сотрудник

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭНТЕРОТОКСИГЕННЫХ СВОЙСТВ АДГЕЗИВНЫХ ШТАММОВ E.COLI, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ МОЛОДНЯКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

ВВЕДЕНИЕ

Энтеротоксигенные *Escherichia coli* (ETEC) являются патогенными микроорганизмами, вызывающими диарею у молодняка сельскохозяйственных животных. Почти все ETEC имеют на своей поверхности рецепторы адгезии (фимбрии) – K88 (F4), K99(F5), 987P(F6), F41[3]. Существует несколько серологических вариантов адгезинов K88 – K88ав, K88ас, K88ад [1].

ETEC в большинстве своем выделяют вирулентные факторы – термолabileный энтеротоксин (LT) и термостабильный энтеротоксин (ST).

LT энтеротоксин имеет молекулярный вес 86 кД, обладает выраженными антигенными свойствами, имеет биологическое и антигенное сходство с холерным токсином. LT энтеротоксин вовлечен в патогенез секреторной диареи путем активации аденилциклазы и повреждения интестинальных клеток кишечника[2].

ST энтеротоксин обладает относительно низкой молекулярной массой – до 10 кД, является гаптенем и не обладает иммуногенной активностью. В отличие от LT энтеротоксина ST энтеротоксин изменяет функциональную активность клеток интестинального эпителия посредством стимуляции клеточной гуанилатциклазы [3].

ETEC способны продуцировать как монотоксины LT или ST, так и оба энтеротоксина. Существует множество токсикологических и иммунологических тестов для фенотипизации LT и ST энтеротоксинов. С целью установления патогенетического значения ETEC проводят идентификацию LT и ST генов клеточного генома с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [4].

Фенотипическую идентификацию ETEC проводят с помощью серотипирования и установления вирулентносопутствующих факторов таких, как способность продуцировать LT, ST энтеротоксины и факторы колони-

зации желудочно-кишечного тракта [5].

Целью наших исследований было проведение генотипической и фенотипической идентификации ЕТЕС, выделенных от молодняка сельскохозяйственных животных из разных хозяйств Республики Беларусь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактерии. В работе использовали штаммы *E. coli* K99 (КМИЭВ – В102), *E. coli* K99 (КМИЭВ-В146), *E. coli* 987Р (КМИЭВ-В103), *E. coli* K88ac (КМИЭВ – В104), *E. coli* Att25:K99:K88 (КМИЭВ-В143) и эпизоотические штаммы *E. coli* K88ав; ac, *E. coli* K88ac(1), *E. coli* K88ac(2), изолированные из патологического материала, полученного от молодняка сельскохозяйственных животных.

Бактериальные среды. В работе использовали бактериальные среды: МПБ, МПА, среда Мюнделя.

Серотипирование ЕТЕС. Выявление адгезивных антигенов *E. coli* в реакции агглютинации с моноспецифическими диагностическими тест-сыворотками. Тест-сыворотки антиадгезивные *E. coli* F4 (K88), F5(K99), F6 (987Р), F41, A20 (Att25) изготовлены в РУП "Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеславского". Для постановки РА использовали суточную культуру *E. coli* (K88), F5(K99), F6 (987Р), F41 на МПА. В пробирки с бактериальной культурой *E. coli* K88 (F4), K99(F5), 987Р (F6), F41, вносили 2,0 мл стерильного физиологического раствора и с помощью бактериологической петли готовили бактериальную взвесь. Затем вносили по 0,05 мл тест-сыворотки на стекло и добавляли 0,050 мл бактериальной взвеси и перемешивали с тест - сывороткой. Реакцию учитывали в течение 5 – 7 минут при легком покачивании стекла при температуре 18 – 28⁰С. Контролем служили 0,05 мл испытуемой бактериальной культуры в смеси с 0,05 мл физиологического раствора.

Для определения фимбриальных вариантов *E. coli* K88ав, ac использовали метод непрямого иммуноферментного анализа (НИФА) [6]. Бактериальные штаммы *E. coli* K88 и *E. coli* K99 выращивали на МПА при температуре 37⁰С в течение 24 часов, получали бактериальную суспензию и доводили концентрацию микробных клеток до (3×10^9 м.т./мл). Фимбрии были извлечены из бактерий с помощью термошока (60⁰С в течение 30 минут). После тепловой обработки суспензию центрифугировали (6000g в течение 30 мин). Все последующие шаги проводили при температуре 4⁰С. Фимбрии K88 и K99 осаждали добавлением сульфата аммония 60% к объему. Преципитированные белки собирали центрифугированием (6000g в течение 45 минут) и ресуспендировали в ФБР.

Планшеты сенсibilизировали образцом фимбриального белка бактерий в ФБР в дозе 100 мкг/лунка при температуре 4⁰С в течение 18 часов. После каждой процедуры лунки промывали ФБР–Твин не менее 3 раз. Добавляли в каждую лунку 1% бычий сывороточный альбумин в ФБР в дозе

100 мкл/лунку, экспозиция составила 45 минут при температуре 37⁰С. Для специфического взаимодействия лунки обрабатывали поликлональными антителами барана к фимбриям *E. coli* K88ав (ab54090, Abcam), K88ас (ab53798, Abcam) и инкубировали 45 минут при температуре 37⁰С. Затем лунки обрабатывали вторичными бараными антителами с ферментной меткой (A3415, Sigma), экспозиция составила 60 минут при 37⁰С. В качестве субстрата добавляли р-нитрофенил фосфат (Ingenasa, Spain). Реакцию останавливали 3Н Na OH (100мкл/лунка). Результаты реакции учитывали с помощью спектрофотометра (Bio-Rad, модель 3550, Richmond, CA) учитывали на спектрофотометре при длине волны 405 нм и выражали в единицах оптической плотности.

Выявление *E. coli* LT энтеротоксина (качественная). Бактериальные клетки выращивали на среде Мюнделя 18 часов при температуре 37⁰С. Для отделения бактерий культуральную среду центрифугировали 10 минут при 6000 г/мин. Полученный надосадок пропускали через стерилизующие мембраны (0,22 мкм, Millex^R GP). Далее полученный стерилизат концентрировали с помощью центрифужных фильтров (Amicon Ultra 100K, Millipore corp.)

Реакцию агглютинации латекса (РАЛ) ставили с коммерческим набором для выявления *E. coli* LT энтеротоксина (TD0920A, Oxoid) в 96-луночных микропланшетах. Для этого 0,025 мл сенсibilизированного латекса соединяли с 0,025 мл пробы. Отрицательным контролем служил не-сенсibilизированный латекс в аналогичной постановке РАЛ.

Учет результатов РАЛ. Результаты РАЛ оценивали по 3-хбалльной системе. Резкоположительная реакция – (4+) – четкая агглютинация, крупные хлопья в прозрачной жидкости; положительная реакция – (2+) – четко видимая агглютинация диагностикума; отрицательная реакция (–) латекс оседает на дно лунки в виде компактной точки.

Постановка ПЦР. Для выявления LT и ST генов клеточного генома адгезивных штаммов *E. coli* использовали коммерческий ПЦР набор (DEC PCR Kit, Denmark). Все этапы *in vitro* диагностики проводили в соответствии с инструкцией по его применению.

На первом этапе осуществляли выделение ДНК бактерий *E. coli*, далее следовала постановка амплификации и учет результатов реакции. Контроль амплификации и Контроль выделения – отрицательные; Контроль 1 и Контроль 2 – положительные.

Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия Стьюдента (t).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При серотипировании изучаемых бактериальных штаммов *E.coli* с моноспецифическими сыворотками в РА подтверждено наличие адгезивных антигенов K88, K99, 987P, Att25(A20).

Таблица 1– Результат постановки РА с тест - сыворотками

Наименование штамма	Тест сыворотка антиадгезивная				
	F4 (K88)	F5 (K99)	F6 (987P)	F41	FY (Att25)
E. coli K99 (КМИЭВ-В102)	–	+	–	–	–
E. coli K99 (КМИЭВ-В146)	–	+	–	–	–
E. coli 987P (КМИЭВ-В103)	–	–	+	–	–
E. coli K88 (КМИЭВ-В104)	+	–	–	–	–
E. coli Att25:K99:K88 (КМИЭВ-В143)	–	–	–	–	+
E. coli K88ав ас	+	–	–	–	–
E. coli K88ас (1)	+	–	–	–	–
E. coli K88ас (2)	+	–	–	–	–

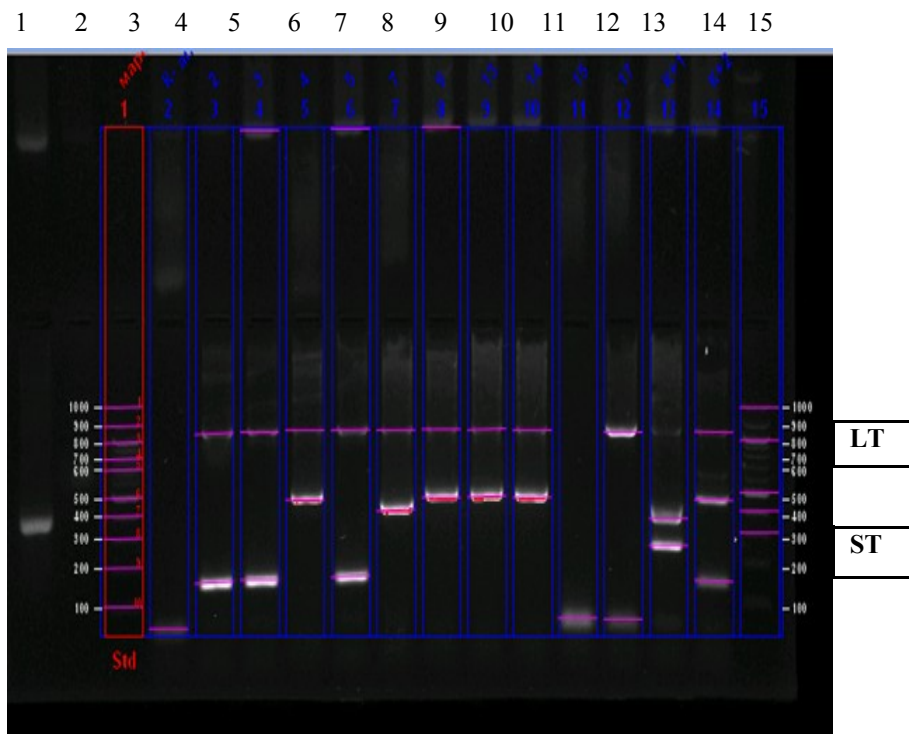
Идентификацию фимбриальных вариантов E. coli K88 осуществляли с помощью НИФА. Определены сероварианты E.coli K88 ав, ас. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2– Результат постановки НИФА

Наименование штамма	Антитела	
	Анти E. coli K88ав	Анти E. coli K88ас
	Оптическая плотность	
E. coli K88ас (КМИЭВ-В104)	0,364±0,078	0,652±0,057*
E. coli K88ав; ас	0,635±0,051*	0,723±0,067*
E. coli K88ас (1)	0,374±0,078	0,663±0,097*
E. coli K88ас (2)	0,338±0,063	0,628±0,065*
E. coli K99 –отрицательный контроль	0,199±0,041	0,178±0,058

Примечание – * при $p < 0,01$

При испытании штаммов E. coli в ПЦР на наличие генов LT и ST выявило наличие LT+ штаммов: E. coli K88 (КМИЭВ-В104), E. coli K88ав ас, E. coli K88ас(1), E. coli K88ас(2) (Электрофореграмма. Образцы 5, 8, 9, 10). Выявлено наличие ST+ штаммов: E. coli K99 (КМИЭВ – В102), E. coli 987P (КМИЭВ – В103), E. coli K99 (КМИЭВ – В146) (рисунок 1, образцы 3, 4,6).



Примечание – 1 – маркеры; 2 – отрицательный контроль; 13, 14 – положительный контроль; 5 – LT+ *E. coli* K88ac (КМИЭВ-B104); 8 – LT+ *E. coli* K88 ав,ac; 9 – LT+ *E. coli* K88 ac(1); 10 – LT+ штаммы *E. coli* K88ac(2); 3 – ST+ *E. coli* K99 (КМИЭВ-B102); 4 *E. coli* 987P (КМИЭВ-B103); 6 – *E. coli* K99 (КМИЭВ-B146); 11– (LT–, ST–) *E. coli* Att25:K99:K88 (КМИЭВ-B143)

Рисунок 1 – Электрофореграмма белковых комплексов адгезивных штаммов *E. coli*

Таким образом, по результатам испытаний 7 из 8 исследуемых штаммов содержали LT+ либо ST+ гены. Штамм *E. coli* Att25:K99:K88 (КМИЭВ - B143) не содержал в своем геноме LT, ST генов (рисунок 1, образец 11).

Выявление способности адгезивных штаммов продуцировать LT энтеротоксин в культуральную среду осуществляли с помощью РЛА. Положительная РЛА (2+) наблюдалась в образцах центрифугата, полученных при культивировании штаммов *E. coli* *E. coli* K88 (КМИЭВ B104), *E. coli* K88ав: ac, *E. coli* K88ac(1), *E. coli* K88ac(2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучены генотипические и фенотипические особенности ЕТЕС штаммов *E. coli*, выделенных от молодняка сельскохозяйственных животных из разных хозяйств Республики Беларусь.

ЕТЕС обладали адгезивными антигенами K88, K99, 987P, Att25. Определены фимбриальные варианты штаммов *E. coli* K88 ав, ас. Отмечено преобладание фимбриального варианта K88ас.

Изучение генотипа адгезивных штаммов *E. coli* в ПЦР выявило наличие как LT+ штаммов (*E. coli* K88ас (КМИЭВ – В104), *E. coli* K88ав ас, *E. coli* K88ас(1), *E. coli* K88ас(2)), так и ST+штаммов *E. coli* K99 (КМИЭВ-В102), *E. coli* 987P (КМИЭВ – В103), *E. coli* K99 (КМИЭВ – В146). В геноме бактериального штамма *E. coli* Att25:K99:K88 (КМИЭВ – В143) не выявлено генов, отвечающих за токсинообразование.

В научной литературе имеются данные о том, что ЕТЕС, содержащие в своем геноме LT или ST. гены не всегда фенотипически проявляют токсинообразующие свойства. В этой связи с целью формирования заключительного вывода о степени вирулентности адгезивных штаммов *E. coli* необходимо было установить наличие энтеротоксина в культуральной среде роста бактерий с помощью иммунологических тестов (РАЛ, ИФА) либо биопробы на лабораторных животных. В нашей серии экспериментов изучены токсинообразующие свойства адгезивных штаммов *E. coli* K88 с помощью РАЛ. Установлена корреляция LT+ генома и фенотипического проявления LT+ токсинообразующих свойств у всех 4-х штаммов *E. coli* K88ас (КМИЭВ В104), *E. coli* K88ав ас, *E. coli* K88ас(1), *E. coli* K88ас(2), что дает основание сделать заключение о патогенетическом значении этих штаммов для молодняка сельскохозяйственных животных и необходимости их дальнейшего изучения для разработки средств специфической профилактики.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Guinée, P A M, Jansen W H. Behavior of *Escherichia coli* K antigens K88ab, K88ac, and K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion, and haemagglutination. // *Infect Immun.* – 1979. – Vol. 23. –P. 700–705.
- 2 Moon, H.W. Pathogenesis of enteric diseases caused by *Escherichia coli*//*Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* – 1978. – Vol. 172 – P.293 – 307.
- 3 Field, M., Rao, M. C. & Chang, E. B. Intestinal Electrolyte Transport and Diarrheal Disease//. *New England Journal of Medicine.* – 1989. – Vol. 321. – P. 879–883.
- 4 Sjöling, A., Wiklund, G., Savarino, S. J., et. al. Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factors.//*J Clin Microbiol.* – 2007 – Vol. 45(10). – P.3295 – 3301.
- 5 Mullaney, CD, Francis DH, Willgohe JA. Comparison of seroagglutination, ELISA, and indirect fluorescent antibody staining for the detection of K99, K88, and 987P pilus antigens of *Escherichia coli*. // *J Vet Diagn Invest.* – 1991. – Vol.3 – P. 115 – 118.
- 6 Vazquez F., González E.A. Development and evaluation of an ELISA to detect *Escherichia coli* K88 (F4) fimbrial antibody levels.//*J Med Microbiol.* – 1996. – Vol.44 (6). – P.53–63.

Ушкалов В. А., доктор ветеринарных наук
Ковтун В. А., младший научный сотрудник
Мачуский А.В., научный сотрудник

Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов (ГНКИБШМ), г. Киев

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА

ВВЕДЕНИЕ

Листериоз (*Listeriosis*) является зооантропонозным заболеванием, которое протекает в форме септицемии с поражением центральной нервной системы, абортами, метритами, маститами, а также в виде бессимптомного носительства [3, 8, 17, 18].

Болезнь имеет синонимы: листереллез, невреллез, гранулематоз новорожденных, болезнь реки Тигр [6, 9]. В соответствии с «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» (2009) род *Listeria* принадлежит к семейству *Listeriaceae* и включает шесть видов (*L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri*, *L.innocua* и *L.grayi*, ранее обозначенный седьмой вид *L.murrayi* рассматривают как подтип *L.grayi*), из которых два являются патогенными: *L.monocytogenes* – патогенная для людей, а *L.ivanovii* и *L.monocytogenes* – для животных [11]. Также имеется информация о патогенности *L.ivanovii* и *L.seeligeri* для людей [8, 12, 18]. В последние годы к роду *Listeria* отнесены еще четыре вида: *marthii*, *rocourtiae*, *fleischmannii*, *weihenstephanensis* [13, 14, 15, 16].

Несмотря на довольно основательное изучение вопросов эпизоотологии, биологии и диагностики возбудителя, проблема листериоза привлекает все больше внимания ветеринарных и медицинских работников.

Это связано с широким распространением листерий в природе (почва, вода, канализация, растения, пыль), увеличением количества больных листериозом людей, высокой летальностью, бессимптомным листерионосительством, значительными экономическими убытками от заболеваемости, аборт, снижения производительности, гибели сельскохозяйственных животных и затрат на профилактические мероприятия [3].

Цель работы – определить степень распространенности листериоза в мире, исследуя ежегодные отчёты международных организаций, а также разработать и испытать набор тест-штаммов *Listeria spp.* для проведения CAMP – test и контроля качества питательных сред.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ эпидемиологической и эпизоотической ситуации проводили используя ежегодные отчеты FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization), FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/United States Department of Agriculture), CDC/FoodNet (Centers for Disease Control and Prevention/Foodborne Disease Active Surveillance Network), CDC/MMWR (Centers for Disease Control and Prevention/Morbidity and Mortality Weekly Report), EFSA/ECDC (European Food Safety Authority/European Centre for Disease Prevention and Control) и другие нормативно-правовые акты, которые регулируют вопросы контроля распространения листериоза среди людей и животных.

Для разработки набора тест-штаммов *Listeria spp.* для проведения CAMP- test и контроля качества питательных сред использовали изученные и депонированные нами штаммы листерий: *Listeria seeligeri* 0811s, *Listeria ivanovii* 0811i, а также культуры из Национального центра штаммов микроорганизмов: *Listeria monocytogenes* 92U002, *Listeria monocytogenes* Mon02, *Listeria innocua* 92U005, *Staphylococcus aureus* KV25, *Rhodococcus equi* 1, *Escherichia coli* Esi 5 [1]. Перед началом исследований все вышеуказанные штаммы проверяли на соответствие паспортным характеристикам.

Культуральные, морфологические, биохимические и гемолитические свойства исследовали по общепринятым методикам [2,4]. Постановку CAMP – test проводили согласно ДСТУ ISO 11290 «Горизонтальный метод выявления та підрахування *Listeria monocytogenes*. Частина 1. Метод виявлення» с некоторыми изменениями: добавлена культура *Listeria seeligeri* 0811s к контрольным штаммам и продлен срок культивирования с 24 до 48 часов [4].

Для проверки качества питательных сред использовали *Listeria monocytogenes* 92U002 (положительный контроль) и *Escherichia coli* Esi 5 (отрицательный контроль), исследования проводили в соответствии с ДСТУ ISO 11133 «Настанови щодо готування та вироблення поживних середовищ. Частина 2. Практичні настанови щодо випробування культуральних середовищ» [5]. Все исследования проводили в пяти повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате анализа ежегодных отчётов международных организаций, контролирующих распространение опасного заболевания человека и животных, установлено, что листериоз встречается во всех странах мира. В 1960 году диагноз на листериоз человека был редкостью. В течение 1960 – 1982 гг. сообщалось уже о более 10000 случаев заболевания в мире. По данным ВОЗ в 1990 г. всего сообщено о 1167 случаев листериоза среди людей, подтвержденного выделением возбудителя. В странах Европы наблюдалось 818 случаев, в Северной Америке – 197, Южной Америке – 17, Океании – 65, Азии – 69, в Африке – 1. Смертность была в пределах от 5 до 33 %. Ле-

тальность среди детей до 2-хмесячного возраста составила 24,8% а у лиц старше 60 лет 34,9%. Следует учитывать, что обнаруживают и регистрируют далеко не все случаи листериоза у людей [7].

В США в 1991 году было зарегистрировано более 1000 вспышек листериоза, связанного с употреблением контаминированных продуктов питания [8]. По данным отчетов FSIS/USDA (Washington, 2010) каждый год в США регистрируется приблизительно 2500 случаев листериоза среди людей, 2300 с которых требуют госпитализации а в 500 случаях наступает смерть[10].

Анализ отчетов EFSA/ECDC Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotics Agents and Foodborne Outbreaks in European Union указывает, что за период 1999–2011 г. наибольшее количество зарегистрированных случаев заболевания людей листериозом на территории Европейского Союза наблюдали в Германии – 3853, в Объединённом Королевстве и Франции их количество было 2516 и 3425 соответственно. Наименьшее – на Кипре, Мальте, Исландии по 4, 3 и 6 соответственно. В трех странах ЕС наблюдали от 0 до 10 случаев, в восьми странах – от 10 до 100 случаев, в 16 странах – от 100 до 1000, в трех странах – больше тысячи, и только в одной стране листериоз не регистрировался (Лихтенштейн) (рисунок 1).

Наблюдается увеличение количества случаев листериоза среди жителей Евросоюза, вызванных пищевым заражением: в 2001 году зарегистрировано 910 случаев, в 2005 и 2006 – 1427 и 1583 случаев соответственно [10].

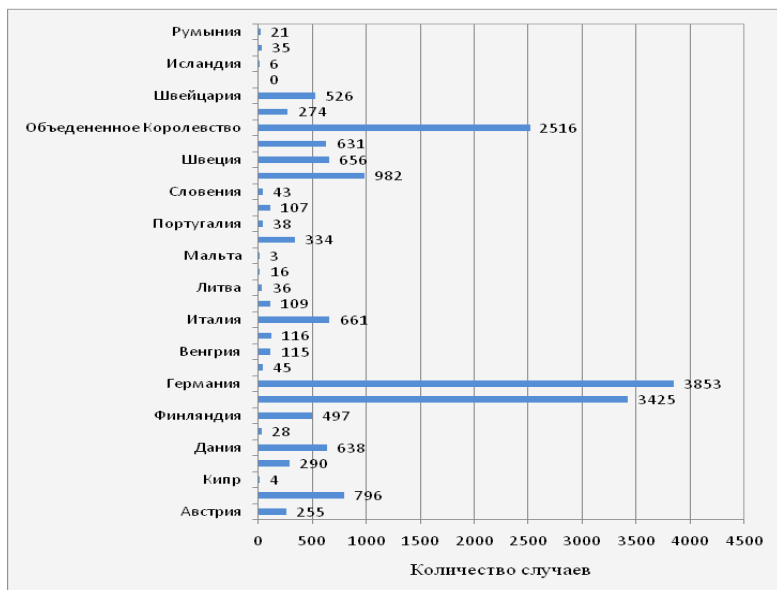


Рисунок 1 – Интенсивность эпидемической ситуации по листериозу 1999 – 2011 года

Что касается эпизоотической ситуации по листериозу животных, в систематических ежегодных отчетах отсутствует информация по отдельно взятым странам. Так, к примеру, по данным EFSA и ECDC в 2006 году было исследовано 35034 образца на наличие листерий, из которых от овец – 6468 (позитивных – 121 (1,87%)), коз – 932 (позитивных – 33 (3,54%)), от КРС – 20623 (позитивных – 235 (1,14%), свиней – 4271 (позитивных – 11 (0,26%)), кур – 2740 (позитивных – 6 (0,22%)) [19].

Интересной является некая зависимость: листериоз регистрируется в странах, где имеется система мониторинга данного заболевания. Из этого не следует, что страны, где не диагностированы случаи листериоза и которые не отчитываются, свободны от этой болезни. Проблема может быть в отсутствии системы отчетности о данном заболевании или в недостатках диагностики, это имеет большое значение для создания эффективной системы по устранению, профилактике и предупреждению листериоза.

Для усовершенствования национальной системы мониторинга листериоза одним из важных моментов является разработка отечественных диагностических систем с использованием штаммов, которые циркулируют на территории конкретного нозоареала (страны).

В результате анализа паспортных данных было установлено, что для решения поставленной задачи на территории Украины в набор могут быть включены: *Listeria seeligeri* 0811s, *Listeria ivanovii* 0811i, *Listeria monocytogenes* 92U002, *Listeria innocua* 92U005, *Staphylococcus aureus* KV25, *Rhodococcus equi* 1 и *Escherichia coli* Esi 5.

Культуры *Listeria spp.* в МПБ и на МПА через 24 – 48 часов культивирования давали типичный рост. Результаты исследования ферментативных свойств культур приведены в таблице 1.

Результаты изучения гемолитических свойств для дифференциации патогенных видов *Listeria spp.* в постановке CAMP – test приведены в таблице 2. При этом установлено, что проявление гемолитической активности штаммов *Listeria monocytogenes* и *Listeria ivanovii* отмечается независимо от питательной среды и достаточно 24 часов культивирования, а для штамма *Listeria seeligeri* срок культивирования необходимо продлить до 48 часов. Следует отметить, что более контрастные и достоверные результаты отмечаются при использовании стандартизованного колумбийского агара с 5 % крови.

Таблица 1 – Ферментативные свойства штаммов-кандидатов в набор для проведения CAMP-test и контроля качества питательных сред

Углевод Штамм	<i>L.monocytogenes</i> 92U002	<i>L.ivanovii</i> 0811i	<i>L.seeligeri</i> 0811s	<i>L.innocua</i> 92U005
глюкоза	+	+	+	+
лактоза	+	+	+	+
мальтоза	+	+	+	+
манит	–	–	–	–
сахароза	+ –	+ –	–	+ –
сорбит	–	–	–	–
дульцит	–	–	–	–
инозит	–	–	–	–
ксилоза	–	+	+	–
рамноза	+	–	–	–
манноза	+ –	+ –	+	–
арабиноза	–	–	–	–

Примечание – «+» – ферментация; «+ –» – слабая ферментация; «–» – отсутствие ферментации

В CAMP – test культура *L.monocytogenes* 92U002 имела позитивную реакцию с небольшой зоной гемолиза возле *S.aureus* KV25 (также небольшая зона гемолиза наблюдалась и возле *Rh.equi* 1), *L.ivanovii* 0811i давала позитивную реакцию с *Rh.equi* 1 в виде широкой зоны гемолиза.

Таблица 2 – Гемолитические свойства штаммов *L.monocytogenes* 92U002, *L.ivanovii* 0811i, *L.seeligeri* 0811s в CAMP – test, (n=5)

Среда Штамм	<i>L.monocytogenes</i> 92U002		<i>L.ivanovii</i> 0811i		<i>L.seeligeri</i> 0811s	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
Кровяной агар +5% крови	+	+	+	++	–	(+)
+10% крови	+	+	+	++	–	(+)
Двухслойный кровяной агар +5% крови	+	+	+	++	(+)	+
+10% крови	+	+	+	++	(+)	+
Колумбийский агар с 5% крови	+	+	+	++	(+)	+

Примечание – «+» – позитивная реакция, «–» – отсутствие реакции, «++» – широкий гемолиз, «(+))» – незначительная реакция

Культура *L.seeligeri* 0811s имела позитивную реакцию возле штриха *S. aureus* KV25, образуя небольшое расширение зоны гемолиза возле

штриха, которое становилось более явным при культивировании в течение 48 часов. Культура *L. innocua* 92U005 давала негативную реакцию (рисунок 2).

Использование набора тест-штаммов для проведения контроля качества питательных сред проводили в соответствии с ДСТУ ISO 11133. В качестве негативного контроля использовали *Escherichia coli* Esi 5, в качестве позитивного – *Listeria monocytogenes* 92U002. При этом на средах наблюдался рост испытуемой культуры *Listeria monocytogenes* 92U002, а рост *Escherichia coli* Esi 5 отсутствовал.

Полученные результаты исследований послужили основанием для формирования нормативной документации на «Набор тест-штаммов *Listeria* spp. для проведения CAMP – test и контроля качества питательных сред» и проведения процедуры государственной регистрации.



Рисунок 2 – Результаты постановки CAMP – test с опытными штаммами

Полученные результаты анализа мирового распространения листериоза соответствуют результатам исследований других ученых в этой области (Гаркавенко Т.А., Красовский В.В.), а также указывают на необходимость научно-методического усовершенствования системы выявления, оценки и контроля рисков на всех этапах пищевой цепи и комплексной системы диагностики.

Для внутриродовой дифференциации листерий существуют множество экспресс-методов, но основным является бактериологический «золотой стандарт». К нему относится биохимический, а также гемолитический тест. Ведущую роль при этом имеет CAMP – test, с помощью которого можно определить гемолитические патогенные виды листерий.

Ранее в Украине для проведения CAMP-test использовали набор тест-штаммов, который включал *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* и *Rhodococcus equi*. Все больше проявляется сообщений о *L.seeligeri* как возбудителе листериоза у людей. Поэтому авторами был разработан набор из штаммов *Listeria seeligeri* 0811s, *Listeria ivanovii* 0811i, *Listeria monocytogenes* 92U002, *Listeria innocua* 92U005, *Staphylococcus aureus* KV25, *Rhodococcus equi* 1 и *Escherichia coli* Esi 5, с помощью которых можно проводить дифференциацию возбудителей листериоза бактериологическим методом и контроль качества питательных сред.

ВЫВОДЫ

1 Проблема распространения листериоза обуславливает необходимость научно-методического усовершенствования системы выявления, оценки и контроля за их рисками на всех этапах пищевой цепи, а также комплексной системы диагностики заболевания;

2 Разработан и зарегистрирован набор из штаммов *Listeria seeligeri* 0811s, *Listeria ivanovii* 0811i, *Listeria monocytogenes* 92U002, *Listeria innocua* 92U005, *Staphylococcus aureus* KV25, *Rhodococcus equi* 1 и *Escherichia coli* Esi 5, с помощью которых можно проводить дифференциацию возбудителей листериоза бактериологическим методом и контроль качества питательных сред;

3 Определены оптимальная питательная среда содержащая кровь и срок культивирования для штамма *Listeria seeligeri*;

4 Перспективным представляется использование данного набора тест-штаммов для оценки контроля бактериологических исследований на листериоз, а также в тест-системе для выделения и идентификации листерий в полимеразной цепной реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1 Ковтун, В. А. Порівняльне вивчення ізолятів роду *Listeria* з референтними штамами Бельгійської колекції культур / В. А. Ковтун, В. О. Ушкалов, Л. М. Виговська // Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин і держ. н.-д. контр. ін-ту ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів, 2012. – Вип. 13 (№ 3,4). – С. 195–201.

2 Лабораторна діагностика лістеріозу тварин : методичні рекомендації / Т. О. Бондар [та ін.]. – К., 2007. – 32 с.

3 Литвин, В. Ю. Патогенные бактерии, общие для человека и растений: проблемы и факты / В. Ю. Литвин, Е. Н. Емельяненко, В. И. Пушкарева // Микробиология. – 1996. – № 2. – С. 76–83.

4 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та підрахування *Listeria monocytogenes*. Частина 1. Метод виявлення : ДСТУ ISO 11290-1:2003 (ISO 11290-1:2003) – Увед. вперше ; чинний від 2003 – 10–02. – К. : Держспоживстандарт України, 2005. – IV, 18 с., включ. обкл.: табл.; 29 см. – (Національний стандарт України).

5 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Настанови щодо готування та вироблення поживних середовищ. Частина 2. Практичні настанови

щодо випробування культуральних середовищ: ДСТУ ISO/TS 11133-2:2006 (ISO/TS 11133-2:2003, IDT) – Увед. вперше ; чинний від 2006 –06 – 29. – К. : Держспоживстандарт України, 2008. – IV, 22 с., вкл. обкл. : табл. ; 29 см. – (Національний стандарт України).

6 Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине : справоч. пособ. / А. Н. Головкин [и др.] ; за ред. А. Н. Головкин. – Х. : НТМТ, 2007. – С. 365 – 372.

7 Руководство по инфекционным болезням. Часть 1./ за ред. Ю. В. Лобзина. – СПб.: Фолиант, 2000. – С. 60 – 63.

8 Сапронозні інфекційні хвороби тварин / Л. Є. Корнієнко [та ін.] ; за ред. Л. Є. Корнієнко, В. О. Бусол. – Біла Церква : БДАУ, 2009. – С. 89–117.

9 Шувалова, Е. П. Инфекционные болезни / Е. П. Шувалова. – Л. : Медицина, 1982. – С. 410–418.

10 Andreoletti, O. Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness / O. Andreoletti [et al.] // The EFSA J. – 2007. – № 599. – P. 1–42.

11 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / P. De Vos [et al.]. – 2-nd ed. – [London, New York] : Springer, 2009. – Vol. 3. – P. 244–257.

12 Goldfine, H. *Listeria monocytogenes*: pathogenesis and host response / H. Goldfine, H. Chen. – New York : Springer science, 2007. – 287 p.

13 Halter, L. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond / L. Halter, K. Neuhaus, S. Scherer // Intern. J. of systematic and evolutionary microbiol. – 2013. – Vol. 63, № 2. – P. 641 – 647.

14 *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese / D. Bertsch [et al.] / International Journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2013. – Vol. 63, № 2. – P.526–532.

15 *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest / L. M. Graves [et al.] // Intern. J. of systematic and evolutionary microbiol. – 2010. – Vol. 60. – P. 1280–1288.

16 *Listeria rocourtiae* sp. nov. / A. Leclercq [et al.] // Intern. J. of systematic and evolutionary microbiol. – 2010. – Vol. 60. – P. 2210–2214.

17 Molla, B. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail meat and milk products / B. Molla, R. Yilma, D. Alemayehu // Microbial food safety in animal agr. – Iowa, 2003. – P. 221 – 232.

18 Parker, J. N. The Official Patient's Sourcebook on Listeriosis: A Revised and Updated Directory for the Internet Age / J. N. Parker, Ph. M. Parker. – San Diego : Printed in the United States of America, 2002. – 160 p.

19 The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006 // The EFSA J. – 2006. – Vol. 94. – P. 134–150.

Ковалев Н.А., доктор ветеринарных наук, академик
Бучукури Д.В., кандидат ветеринарных наук

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

ПЕРСПЕКТИВЫ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ БЕШЕНСТВА

Одно из ведущих мест в инфекционной патологии занимает бешенство, которое является исключительно опасным, абсолютно смертельным заболеванием всех теплокровных животных и человека. Заболевание бешенством имеет широкое распространение во многих странах мира, в т.ч. и в Беларуси. Причем напряженность эпизоотической ситуации по этой инфекции вследствие ее природно-очагового характера, несмотря на проводимые профилактические мероприятия, практически не снижается. В республике ежегодно заболевает до 0,9 – 1,5 тыс. животных.

Эпизоотия бешенства создает реальную угрозу здоровью и жизни людей, так как обращаемость населения в связи с укусами, оцарапываниями и ослонениями животными, в том числе и бешеными, в последние годы возросла до 28000 случаев в год.

Одной из основных мер борьбы с бешенством была и остается антирабическая вакцинация. Вакцинопрофилактика бешенства имеет вековую историю. Созданная впервые Л.Пастером мозговая вакцина в свое время сыграла большую роль в борьбе с бешенством. Однако она имела ряд существенных недостатков, главные из которых: наличие в препарате большого количества мозговой «балластной» ткани и жизнеспособного вируса – источников поствакцинальных осложнений, а также необходимость многократных инокуляций вакцины, что побуждало исследователей на поиски новых путей совершенствования препарата. За прошедшие годы появилось много различных модификаций антирабических вакцин, авторы которых стремились повысить их иммуногенные свойства с одной стороны путем отбора новых вакцинных штаммов и повышения стабильности вакцины при хранении, с другой – путем изыскания иных систем (кроме мозга) культивирования вируса бешенства, а также способов очистки вируса от сопутствующих балластных веществ и инактивации инфекционности входящего в состав вакцин вируса [1].

Однако следует отметить, что существующие вакцины не всегда являются эффективными, а способы их изготовления трудоемкие и требуют длительного времени. Поэтому разработка новых вакцин и усовершенствование существующих является актуальной проблемой.

Быстроразвивающимся направлением усовершенствования специфической профилактики инфекционных заболеваний, в т.ч. бешенства, в

настоящее время является использование для конструирования высокоэффективных вакцин нанотехнологий [3, 5].

Нанотехнология – это современное научное направление по созданию очень маленьких частиц, которые применяются в различных областях науки и техники, в том числе и биотехнологии. В области биотехнологии и биопромышленности они применяются как в диагностических целях, так и в качестве носителя для доставки лекарственных средств в организме наночастицы в 10–10000 раз меньше, чем клетка человека, однако обладают большой поверхностью и могут сорбировать различные биомолекулы для доставки. Они по форме могут быть в виде нанотрубок, наносфер, наночастиц, нанокристаллов, нанооболочек, дендромеров и др. Указанные наночастицы могут конъюгироваться с протеинами, антигенами, антителами, с ДНК или с лекарственными средствами. Биопрепараты, созданные на основе наночастиц для ветеринарии, уже существуют и проходят испытания в различных странах.

В качестве основных задач, стоящих перед наноконструированием вакцин, можно выделить следующие: усиление иммуногенности – снижение эффективной дозы антигена; использование консервативных (слабо меняющихся в процессе антигенного дрейфа молекул) антигенов; фенотипическая коррекция генного контроля иммунного ответа; эффективная вакцинация у лиц с иммунодефицитными состояниями; контролируемое управление иммунным ответом; усиление иммунной памяти – отсутствие необходимости в частых ревакцинациях; создание вакцинирующих препаратов, эффективных как для профилактики, так и для лечения; преодоление различных биологических барьеров; адресная доставка антигена [2].

Кроме того, на основе наночастиц сегодня широко представлен иммуностимулирующий комплекс ISCOM, который представляет собой шарики диаметром около 40 нм, синтезированные из сапона и холестерина для доставки антигена и стимуляции иммунитета в качестве адъюванта. В настоящее время в Швеции успешно испытана вакцина против бешенства на основе ИСКОМ и получены хорошие результаты [4,7].

В качестве платформы для вакцин успешно испытаны наночастицы золота.

Приготовленные наночастицы золота имеют различные формы и размеры: сферические от 20- и 40 нм, стержневые 40*10 и кубические 40*40*40. Они используются в качестве адъюванта, на котором сорбирован антиген. У привитых мышей таким препаратом наивысший уровень специфических антител оказался со сферическими наночастицами, потом стержневыми (50% от сферических), а у кубических титры были незначительные. Однако макрофаги и дендритные клетки больше вырабатывались при применении стержневых наночастиц также стимулировали выработку цитокинов, интерлейкина 1в и интерлейкина 18 [8]. Весьма перспективным является генно-инженерные или ДНК – вакцины.

В настоящее время доказано, что для выработки в организме хозяине иммунного ответа против вирусной инфекции не нужен целый вирус, достаточно наличия одного или нескольких белков, которые расположены на его поверхности. Это и обеспечивают ДНК – вакцины. Они обычно представляют собой фрагмент ДНК, содержащий определенный ген, на котором в организме происходит синтез необходимого белка-антигена. Таким образом, вводится не белок-антиген, а продуцирующая его машина - ДНК. Конечный же результат тот же: появление в организме белка приводит к образованию белков-антител, направленных на его уничтожение.

Это направление называют "генетической иммунизацией", с ним связывают революционные изменения в вакцинации ближайшего будущего. Для переноса ДНК в клетки с целью вакцинации нужны соответствующие переносчики (векторы), в качестве которых используются вирусы и бактерии. Апробировано уже более 20 различных ДНК- и РНК-содержащих вирусов, а также бактерий, в которые встраивают гены других опасных вирусов, а потом переносят в организм человека и животных. Для этой цели используется вирус оспо-вакцины, особенно ослабленный его вариант Анкара, а также вирусы fowlpox и сапагурох, которые обладают способностью инфицировать клетки человека, но размножаться там не могут. Попадая в клетку, рекомбинантный вирус обеспечивает работу вирусного гена, который он в себе несет. Организм в ответ на новый вирусный белок продуцирует соответствующие антитела. В результате создается защита против опасного вируса, который в организме не был, но ген которого присутствовал в безопасном вирусе – векторе.

Еще один вариант ДНК-вакцинации состоит в том, что небольшое число ДНК, кодирующей вирусные белки, без всякого вектора помещается на крошечные металлические частички-носители, которые выстреливаются "генетической пушкой", пробивающей кожу. Какое-то количество таких частиц при этом попадает в специальные дендритные клетки, расположенные под кожей. В них происходит синтез чужеродного вирусного белка, что приводит к появлению иммунной реакции организма на инфекционный агент.

Особенность "генетической иммунизации" заключается в том, что, используя в качестве действующего агента ДНК, можно легко регулировать уровень антигена, продолжительность и силу его действия. При обычной вакцинации антиген вводится в организм сразу в большой дозе и существует относительно недолго. В случае ДНК-вакцинации небольшие количества антигена синтезируются в организме внутриклеточно на протяжении длительного времени. Использование ДНК-вакцин может снять некоторые потенциальные недостатки старого поколения вакцин, изготовленных на основе живого ослабленного вируса – возможность патогенной инфекции и наличие побочных эффектов, связанных с хронической иммуностимуляцией. [1,11,56].

В опытах на животных было показано, что с помощью ДНК-вакцины возможно выработать не только антитела (гуморальный иммунитет), но и специфический цитотоксичный ответ (клеточный иммунитет), который ранее считался достижимым только с помощью живых вакцин.

ДНК-вакцины могут быть получены в большом количестве, они стабильны и лишены инфекционности. К настоящему времени на животных изучено более 40 вирусных, бактериальных, грибковых и паразитарных вакцин (в том числе против вируса СПИД, гриппа, бешенства, лимфоцитарного хориоменингита, гепатитов В и С, простого герпеса, папилломы, а также возбудителей малярии, лейшманиоза, туберкулеза).

Однако в опытах на добровольцах до сих пор удовлетворительного иммунного ответа получено не было. Также при использовании ДНК-вакцин существует несколько неясных моментов: неизвестны сроки, в течение которых клетки организма будут вырабатывать антигенный белок, не все ясно с безопасностью ДНК-вакцин: необходимо исключить онкогенную опасность. Еще недостаточно изучено, может ли вводимая ДНК встраиваться в геном клетки человека и вызывать риск развития рака.

Образование антигена в организме может продолжаться длительное время (до нескольких месяцев), это может привести к развитию различных форм иммуносупрессии и других патологических явлений.

Чужеродная ДНК может вызвать образование анти-ДНК-антител, которые способны индуцировать различные формы аутоагрессии и иммунопатологии.

Сам образующийся антиген может обладать побочным биологическим действием. Меньше вопросов вызывает использование живых векторов – непатогенных микроорганизмов (оспа-вакцина, вирусы птичьей оспы, аденовирусы), продуцирующих вакцинный антиген. К настоящему времени создано около 60 таких вакцин, 40 из них проходят испытания, в том числе рекомбинантная антирабическая вакцина на основе вируса оспы [12,101].

В наших опытах на енотовидных собаках и песцах проводившихся совместно с французской фирмой «Рон-Мерье», изучалась эффективность рекомбинантной антирабической вакциной «Коровья оспа – бешенство» из штамма вируса бешенства VRG-187 XP, произведенной фирмой Рон-Мерье». Было установлено, что указанная вакцина является безвредным препаратом и индуцирует иммунитет высокой напряженности к вирусу бешенства как при парентеральном, так и пероральном применении [9,12].

В Канаде ученые в качестве вектора используют живой аденовирус, на основе которого уже разработана антирабическая вакцина для перорального применения ONRAB, которая успешно прошла лабораторные и полевые испытания [9,12].

Рекомбинантная антирабическая ДНК – вакцина разработана также в Индии. Изготовленные образцы вакцины успешно были испытаны

ны на мышах и приматах. Выработка высокого уровня защитных антител отмечалась у 50 – 80% животных. Все животные были защищены от контрольного заражения уличным вирусом бешенства. Разработанная вакцина содержит плазмиду ДНК, кодирующую поверхностный гликопротеин вируса бешенства в клетках животных.

Кроме того, там была разработана комбинированная антирабическая вакцина CRV (Combinatio rabies vaccine), включающая плазмиду ДНК и инаktivированную культуральную антирабическую вакцину. Одна доза такой комбинированной вакцины содержит ДНК (100µг) и 1/50 дозы инаktivированной культуральной вакцины бешенства на основе культуры клеток VERO. Испытания разработанной вакцины на животных подтвердили удовлетворительные результаты по выработке вируснейтрализующих антител к контрольному заражению вирусом бешенства [10, 11].

Вакцина на базе рекомбинантного вируса парагриппа 5, экспрессирующего гликопротеин вируса бешенства, изготовлена в США.

Сконструированная вакцина была испытана на мышах орально, интраназально и внутримышечно с последующим заражением контрольным вирусом CVS 24 (50 LD₅₀ интрацеребрально). При этом были получены следующие результаты. Мыши, вакцинированные орально одной дозой рекомбинантной вакцины, содержащей гликопротеин вируса бешенства (rPIV5-RV-G), получили 100%-ную защиту от контрольного заражения вирусом бешенства, вакцинированные внутримышечно – 90 – 100%-ную защиту. Это первое сообщение по поводу векторной антирабической вакцины орального применения [5].

Отдельное направление исследований посвящено разработке синтетических пептидных вакцин.

Идея использования синтетических пептидов в качестве вакцин родилась при изучении клеточных и молекулярных механизмов развития иммунитета.

В 1974 г. М.Села впервые описал искусственно полученный пептид, вызывающий образование антител к белку лизоциму. При определенных условиях синтетические пептиды могут обладать такими же свойствами, как и естественные антигены, выделенные из возбудителей инфекционных заболеваний.

Синтезированы и испытаны полисахариды, аналогичные естественным антигенам возбудителей различных заболеваний.

Экспериментальные синтетические вакцины получены против гепатита В, гриппа, ящура, клещевого энцефалита и других инфекций. Разрабатываются такие вакцины и против бешенства.

У синтетических пептидов нет недостатков, характерных для живых вакцин (возврат патогенности, остаточная вирулентность, неполная инаktivация и т.п.). Синтетические вакцины обладают высокой степенью стан-

дартности, обладают слабой реактогенностью, они безопасны и в то же время индуцируют иммунитет высокой напряженности.

Революционным направлением в современной вакцинологии является разработка вакцин на основе трансгенных растений, в геном которых был встроен соответствующий фрагмент генома патогенного микроорганизма.

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о широкой перспективе в разработке и практическом использовании таких вакцин. Оральный способ иммунизации является самым безопасным и доступным. Ассортимент пищевых источников растительных вакцин не ограничен. Немаловажное значение имеет высокая экономичность растительных вакцин с учетом того, что по прогнозам многих специалистов стоимость существующих вакцин будет возрастать, а цена многих вновь разрабатываемых вакцин будет выше стоимости применяемых в практике вакцин.

Первая такая вакцина была получена в 1992 году: трансгенное растение табака стало продуцировать "австралийский" антиген. Полученный из растений и частично очищенный антиген, введенный мышам, вызывал мощный иммунный ответ подобно вакцине против гепатита В.

В 1998 году с помощью картофеля, продуцирующего В-субъединицу холерного анатоксина, была получена выраженная защита у поедавших его мышей при заражении их холерой. Аналогичная вакцина против кори была получена на табаке.

В том же 1998 году 10 из 11 добровольцев, получивших по 100 гр сырого картофеля, продуцирующего антигены энтеропатогенной кишечной палочки, начали вырабатывать в слизистой кишечника антитела к этому возбудителю. Сейчас испытываются "картофельные" вакцины к вирусу Ньюарк (возбудителю диареи) и гепатиту В с обнадеживающими результатами. На животных испытываются вакцины против бешенства, выращенные на помидорах.

С учетом необходимости использования этих вакцинных продуктов в "сыром виде" ведутся исследования по выращиванию вакцин на растениях, которые не требуют термического приготовления, например, на бананах.

Существует однако немало опасений и сомнений в отношении "съедобных вакцин":

- иммунный ответ на пищевые продукты;
- сохранность антигена в кислой среде желудка;
- время "созревания" вакцин;
- способность переносить хранение;
- оптимальное дозирование

Комплексные вакцины – одна из актуальных проблем современной вакцинологии их разработка даёт возможность иммунизации против нескольких инфекций. Вакцинировать против всех инфекций с помощью од-

ной инъекции препарата – требование к идеальной вакцине.

Трудности создания многокомпонентных вакцин заключаются в:

- физико-химической несовместимости некоторых антигенов, стабилизаторов, консервантов, адъювантов и пр.;
- различной длительности приобретенного иммунитета к отдельным компонентам комплексной вакцины и сроков ревакцинаций.

Нами на протяжении ряда лет велись исследования по разработке комплексных вакцин для профилактики бешенства и других распространенных вирусных болезней плотоядных животных, включающие инаktivированные возбудители заболеваний. Были разработаны вакцины против бешенства и парвовирусного энтерита плотоядных «Парвовак»; против бешенства, парвовирусного энтерита и чумы плотоядных; против бешенства, парвовирусного энтерита, чумы и вирусного гепатита плотоядных. Указанные препараты содержат смешанные в равных объемах вирусы бешенства, штамм КМИЭВ -94 в титре 6,8–7,0 lg, выращенный на культуре клеток ВНК-21, вирус парвовирусного энтерита собак КМИЭВ-14 в титре 7,0–8,0 log₂ выращенный в культуре клеток StFK, вирус чумы плотоядных, штамм КМИЭВ12В в титре 4,5ТЦД₅₀/мл, выращенный в культуре клеток вего, вирус гепатита плотоядных в титре 5,0 lg, выращенный в культуре клеток.

В качестве инаktivатора вирусов использовали теотропин в 0,15 %-ной концентрации, в качестве адъюванта – гидроксал в концентрации 10 об%.

Вакцины вводятся плотоядным животным двукратно с интервалом 14 – 21 день и индуцирует у них иммунитет ко всем выше перечисленным инфекциям продолжительностью до года. Интерференция между антигенами, как показали исследования, не происходит. Вакцины зарегистрированы в Республике Беларусь и производится в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского».

ЛИТЕРАТУРА

1 Ковалев, Н.А. Вирус и прионы в патологии человека// Н.А. Ковалев, П.А. Красочко // Беларуская навука, 2012. – 524 с.

2 Ковалев, Н.А. Изучение иммунологической эффективности и безвредности антирабических вакцин из цельновирioнного штамма 71 БелНИ-ИЭВ-ВГНКИ и рекомбинантной из штаммаVRG-187 XP в опытах на енотовидных собаках /Ковалев Н.А., Бучукури Д.В., Усеня М.М., Шапью Ж., Сулье М.//Ветеринарная медицина Беларуси, 2005.№1. С. 9–11.

3 Петров, Р.В. Нановакцины и аллерготропины. Р.В Петров, Р.М. Хайтов, А.И. Мартинов// ГП ГНЦ «Институт Иммунологии ФМБА России».

4 An immune stimulating complex (ISCOM) subunit rabies vaccine protects dogs and mice against street rabies challenge Vaccine Volume 10, Issue 3,

1992. Pages 192–198.

5 Chen Z. A. novel rabies vaccine based on a recombinant parainfluenza virus 5 expressing rabies virus glycoprotein //Zhou M, Gao X, Zhang G, Ren G, Gnanadurai CW, Fu ZF, He B. Source Department of Infectious Disease, University of Georgia, Athens, GA, USA. J Virol. 2013 Mar;87(6):2986–93. doi: 10.1128/JVI.02886–12. Epub 2012 Dec 26.

6 Cupillard L, Impact of plasmid supercoiling on the efficacy of a rabies DNA vaccine to protect cats.// Juillard V, Latour S, Colombet G, Cachet N, Richard S, Blanchard S, Fischer L. Mérieux, 69007 Lyon, France. Vaccine. 2005 Mar 14;23(16):1910–6.

7 Taralad Nandedkar Dr. International Journal of Pharma and Bio Sciences Vol. 3/Issue 2/April – June 20 International Journal of Pharma and Bio Sciences NANOTECHNOLOGY A PATH TO NANOVACCINE National Institute for Research in Reproductive Health (Indian Council of Medical Research), Parel, Mumbai, 400012, India .

8 Kenichi Niikura , Gold Nanoparticles as a Vaccine Platform: Influence of Size and Shape on Immunological Responses in Vitro and in Vivo// Kenichi Niikura , Tatsuya Matsunaga , Tadaki Suzuki , Shintaro Kobayashi , Hiroki Yamaguchi , Yasuko Orba , Akira Kawaguchi , Hideki Hasegawa , Kiichi Kajino , Takafumi Ninomiya , Kuniharu Ijio , and Hirofumi Sawa . Hokkaido University, Sapporo 060–0818, Japan ACS Nano, 2013, 7 (5). P. –392–393.

9 Ludvik Prevec A Recombinant Human Adenovirus Vaccine against Rabies// James B. Campbell, Brian S. Christie, Larry Belbeck and Frank L. Graham. The Journal of Infectious Diseases Volume 161, Issue 1 P. – 27–30.

10 Rabies DNA Vaccines: Current Status and Future
PDF (Size:198KB) PP. 36–45 DOI: 10.4236/wjv.2012.21005 WJV> Vol.2 No.1, February, 2012.

11 Rai N, Development of rabies DNA vaccine using a recombinant plasmid.//Kaushik P, Rai A.National Biotechnology Center, Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar, Bareilly–243122, U.P., India

12 Rabies Vaccine, Live Adenovirus Vector (AdRG1.3 baits), Trade Name: ONRAB – Environmental Assessment For Public Release June, 2012. – Canadian Centre for Veterinary Biologics.

13 Rai N, Development of rabies DNA vaccine using a recombinant plasmid //Rai A. Kaushik P,National Biotechnology Center, Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar, Bareilly–243122, U.P., India Acta Virol. 2005;49 (3):207–10.

Гусев А. А. профессор, доктор ветеринарных наук

Лемиш А.П. кандидат ветеринарных наук

Красникова Е. Л. научный сотрудник

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

ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ, БОЛЕЗНИ АУЕСКИ И ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ И СТРАНАХ БЛИЖНЕГО И ДАЛЬНЕГО ЗАРУБЕЖЬЯ

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время до 81,7% валового производства свинины в Республике Беларусь осуществляется на 107 крупных промышленных свино-комплексах [1]. Высокая концентрация животных и интенсификация производства порой приводят к значительным экономическим потерям, возникающим в связи с заносом и персистенцией возбудителя инфекции в стаде.

Так, например, из-за перенесенных болезней органов дыхания до убоя не доходит почти каждый четвертый поросенок. В свиноводческих хозяйствах респираторная патология составляет 30–35% и более.

Около 40% поросят переболевают желудочно-кишечными болезнями. Переболевшие животные не могут в положенные производственные сроки достичь товарных кондиций и, в итоге, теряют от 5 до 20 % продуктивности. Кроме того, ряд заболеваний свиней, обуславливающих репродуктивную патологию (репродуктивно-респираторный синдром, парвовирусная инфекция и др.), приводит к недополучению приплода и прохолостам, а также к снижению эффективности проводимых ветеринарных мероприятий.

Персистенция парвовируса в хозяйстве может уменьшать среднее число поросят до 3,6, а отход молодняка свиней при возникновении болезни Ауески достигает 90%.

Кроме того, широко развитая в последние годы международная торговля племенными животными и животноводческой продукцией привела к заносу опасных инфекционных заболеваний (африканская чума свиней, ящур, губкообразная энцефалопатия и т.п.) в странах с благополучной эпизоотической ситуацией. [1,2,3]

Мониторинговые исследования и сравнительная оценка статистических данных по заболеваемости и смертности животных позволяют не только отслеживать вспышки особоопасных инфекций, но и контролировать

распространение так называемых экономически значимых болезней (репродуктивно-респираторный синдром, парвовирусная инфекция, болезнь Ауески и др.), а, следовательно, прогнозировать возникновение новых неблагополучных очагов и разрабатывать комплекс мероприятий по недопущению и профилактике снижая тем самым экономический ущерб[3,4].

Целью наших исследований стало изучение эпизоотической ситуации в мире и Республике Беларусь (РБ) по африканской чуме (АЧС), болезни Ауески (БА) и парвовирусной инфекции свиней (ПВИС).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Статистический анализ данных проводили исходя из материалов официальных источников путем сравнительной оценки. Для проведения работы использовались данные:

– официального сайта международного эпизоотического бюро (МЭБ) [5];

– официального сайта россельхознадзора [6];

– статистические данные (Nadis, SPC, и т. п.);

Для оценки эпизоотической ситуации в республике Беларусь использовались:

– данные ветеринарной отчетности по формам 4вет и 12вет Минсельхозпрода Республики Беларусь;

– данные отчетной документации Белорусского государственного ветеринарного центра и результаты собственных исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Согласно статистическим данным МЭБ из 45 объектов (страна/инфекция), ежегодно контролируемых по инфекционным заболеваниям, за период с 1991 по 2005 гг. выявлено 29 положительных и 16 отрицательных результатов при соотношении 2.23 к 1 (индекс надежности). Серопревалентность варьировала от единичных случаев до 70%. Наибольшее эпизоотическое неблагополучие ситуаций выявлено по парвовирусной инфекции (Испания, Италия, Хорватия), и болезни Ауески (Испания, Италия, Чехия, Словения, Восточная Германия). Представляет интерес обнаружение серопозитивности кабанов по африканской чуме свиней на уровне 10% в период до 2005 г. в Испании в ходе эрадикации болезни.

Проводимая более поздняя оценка эпизоотической ситуации в мире 2005 – 2013 гг. свидетельствует о циркуляции возбудителей болезни Ауески (более чем в 47 странах мира), парвовирусной инфекции (более чем в 32 странах мира) и африканской чумы (в странах не только африканского континента, но и Евразии). Ниже приводятся данные по эпизоотической ситуации каждого из инфектов в отдельности [5].

Таблица 1. Систематический обзор результатов серологического скрининга распространенных и некоторых контролируемых эпизоотических инфекций животных в популяциях диких свиней в европейском регионе
(Giovanni et al., 1988; Laddomada et al., 1994; Muller et al., 1998; Albina et al., 2000; Vicente et al., 2002, 2005; Vengust et al., 2005; Roie et al., 2005; Ruis-Fons et al., 2006; Ebani et al., 2003; Lari et al., 2006; Lelesius et al., 2006; Sedlak et al., 2008; Kukushkin et al., 2008)

Период об- следования (годы)	Объемы выборки (голов)	Результаты скрининга	ПВИС*	БА*	СЦВ*	КЧС*	Грипп (H1)	ВБД*	ТГЭС*	Ящура	РПСС*	ВБС*	Lepto- spira	Eryzi- pelotrix	Salmo- nella	Bru- cella
1991-2005	20-4752	Число стран: обследованных / в т.ч. серопревалентных	4/4	6/5	2/2	4/2	2/1	1/1	1/1	2/0	8/0	3/0	2/2	1/1	1/1	3/2
		% серопозитивности	2-70	0-60	43-52	0-11	4	1	1	0	0	0	5-12	5	4	0-30

* ПВИС – парвовирусная инфекция свиней, БА – болезнь Ауески, СЦВ – свиной цирковироз-2, КЧС – классическая чума свиней, ВБД – вирусная диарея КРС, ТГЭС – трансмиссивный гастроэнтерит свиней, РПСС – репродуктивный и респираторный синдром свиней, ВБС – везикулярная болезнь свиней.

Парвовирусная инфекция свиней (ПВИС)

Парвовирусная инфекция свиней (ПВИС) относится к заболеваниям списка D (экономически значимые инфекции), согласно данным AVHILA (Англия) и SPC, широко распространена во многих странах мира.

Впервые зарегистрированная в 1966 г. в Англии, диагностируется во всех странах с развитым промышленным свиноводством, в том числе Польше, Франции, Германии и Дании, странах бывшего Советского Союза, Израиле, Китае, Вьетнаме и Японии, в Великобритании и США.

По данным МЭБ 32 страны мира неблагополучны по ПВИС.

В странах африканского региона инфекция выявляется реже, что связано с отсутствием интенсификации свиноводства [5].

В России наличие инфекции впервые было установлено в 1982 году путем выделения парвовируса из плодов абортировавших свиноматок. В настоящее время эта болезнь широко распространена в различных регионах Российской Федерации и в странах ближнего зарубежья.

Проведенными исследованиями НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского (Орлянкин Б.Г.) установлено, что в 95% обследованных свиноводческих хозяйствах различных регионов Черноземья в 68% случаев у исследованных свиноматок, хряков и поросят, поросят-сосунов, обнаруживают антитела в сыворотке крови в РНГА в титрах 1:64 до 1:4096, что указывает на широкую циркуляцию парвовируса среди поголовья. При этом отмечается постоянная тенденция к увеличению количества неблагополучных хозяйств по этому заболеванию [3,7].

Исследованиями, проводимыми на территории Республики Беларусь, установлено ежегодное увеличение количества проб привозимых на исследование. Так, за последние несколько лет количество проведенных исследований составило 20,0%, а количество выделений увеличилось на 75,0%, или в 2,2 раза и 2,75 раза соответственно (сравнительно 698/164 положительных в 2009 г и 1538, 450 импорта/451 положительных).

Однако количество проводимых диагностических исследований составляет менее 1% от общего поголовья свиней, что не позволяет оценить общую эпизоотическую ситуацию в республике по данной инфекции. Так, по полученным нами результатам исследований в отдельных хозяйствах республики серопозитивность поголовья ПВИС составляет до 100%. Причем территориальная география разнообразна – «Брестплемпредприятие» из 55 проб исследованных 55 положительных в РТГА (реакции торможения гемагглютинации), «Заднепровский» – 151/151 соответственно, «Борисовский 68/64», СГЦ «Западный» 17/12, СГЦ «Василишки 17/12».

Оценка инфицированности дикими изолятами вируса осложнена обязательной вакцинацией, однако, постоянное выявление в течение последних 10 лет до 50% Гродненская область – 48/24 2005, Гомельская – 6/3 2006, Гродненская 50/18 2010 – серопозитивных поросят – безмолозивников доказывает циркуляцию эпизоотических изолятов в стаде.

Болезнь Ауески (БА)

Болезнь Ауески или псевдбешенство также относится к заболеваниям списка В, контролируемым МЭБ, регистрируется с 1902 г., первый случай зафиксирован в Венгрии, в настоящее время встречается во всех странах мира. В Беларуси болезнь впервые описана Э. Я. Мазелем и В. И. Нестеровым в 1935г [4].

По данным МЭБ с 2005 по 2013 гг. болезнь регистрируется более чем в 47 странах мира, в том числе Аргентине, Армении, Беларуси, Бельгии, Боливии, Бразилии, Болгарии, Китае, Конго, Хорватии, Кубе, Сальвадоре, Югославии, Македонии, Венгрии, Испании, Ирландии, Италии, Японии, Казахстане, Корее, Люксембурге, Латвии, Мексике, Молдове, Черногория, Папуа Новая Гвинея, Филиппинах, Польше, Португалии, Сербии, Румынии, России, Украине и других странах мира.

Необходимо отметить, что список неблагополучных стран включал и такие развитые государства, как США, Германия, Франция, Нидерланды, Япония и т. д.[5].

Таблица 1 – Распространение болезни Ауески в отдельных регионах (согласно данным МЭБ 1996-2004 гг.)

		Belarus	Poland	Russia	Ukraine	Latvia
1996	вспышек	13		15	6	
	случаев	299		600	818	
	падежа	117		400	598	
1997	вспышек	7		19	4	
	случаев	186		1200	564	
	падежа	96		564	189	
1998	вспышек	10	3	10	11	
	случаев	262	45	128	1385	
	падежа	204	23	113	637	
1999	вспышек		14	18	8	
	случаев		288	843	999	
	падежа		18	536	361	
2000	вспышек	3	25	2	4	
	случаев	120	672	230	206	
	падежа	20	0	94	60	
2001	вспышек	1	17	9	13	
	случаев	26	65	701	873	
	падежа		40	619	812	
2002	вспышек	2	10	2	15	1
	случаев	276		24	1871	33
	падежа	170		14	922	17
2003	вспышек	3	17	5	5	
	случаев	95		33	385	
	падежа	3		22	13	
2004	вспышек		21	7	8	
	случаев		571	40	554	
	падежа			29	530	

Из таблицы 1 видно, что в Беларуси и близлежащем зарубежье в период с 1996 по 2004 гг. наблюдалось до 25 вспышек БА в год. За период с 1996 по 2003 годы количество вспышек на территории Республики Беларусь значительно снизилось с 13 в 1996 до 3 в 2003, такая же тенденция прослеживается и в России (с 15 в 1996 до 7 в 2004), тогда как в Польше количество ежегодно регистрируемых случаев начиная с 1998 года увеличилось в 7 раз (соответственно 1998 – 3/2004 – 21).

На карте распространения БА (рисунок 1) видно, что наибольшее количество стран, где зафиксированы вспышки БА, сосредоточено в Европе.

Причем в США, Испании, Италии, Польше, Китае, Португалии случаи обнаружения БА регистрируются на протяжении последних 8 лет, а в Бельгии, Хорватии и на Кубе болезнь зарегистрирована и не ограничивается только одной зоной.

Начиная с 2005 по 2008 гг. в России, Польше и Украине наблюдалось устойчивое неблагополучие по данной инфекции, однако с 2009 года ситуация изменилась, и на сегодняшний момент ежегодно регистрируется не более 19 вспышек болезни в 18 субъектах Федерации. Причем регистрируются только вспышки в манифестной форме, а во втором квартале 2012 года вспышки БА не регистрировались в течение последних 6 месяцев [8].

В Украине в последние 18 месяцев вспышек данного заболевания не обнаружено.

Польша ежегодно подтверждает наличие инфицирующего агента на территории своего государства.

В Литве, начиная с 2009 г., подтверждаются единичные вспышки БА в манифестной форме.

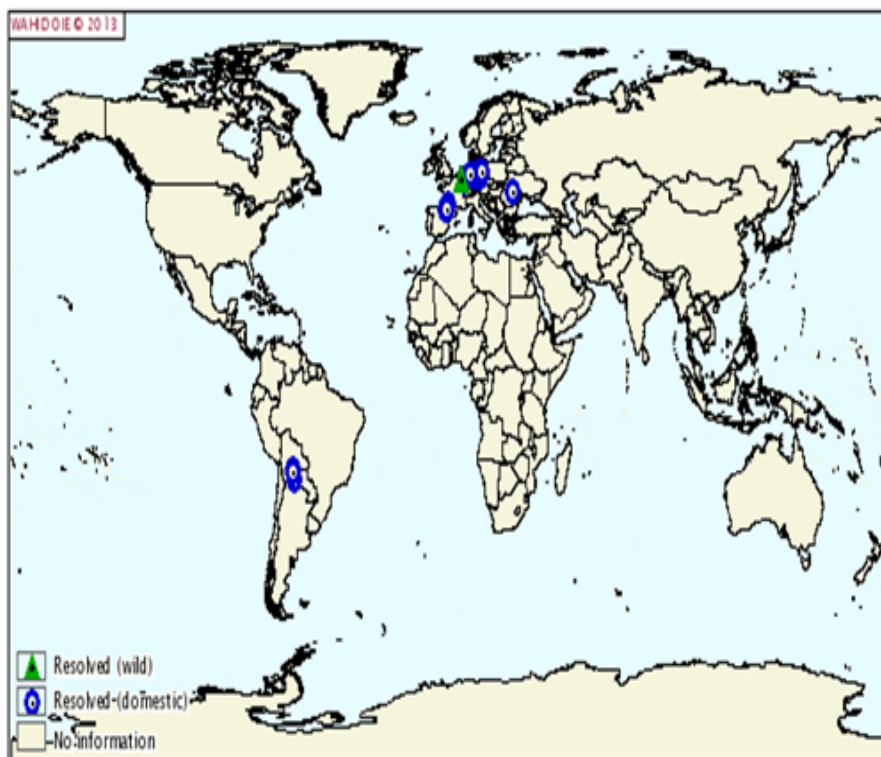


Рисунок 1— Карта распространения БА по данным МЭБ в мире с 2005 – 2013 гг

Ежегодно, в Республике Беларусь регистрируется от 2 до 10 неблагополучных пунктов по этой болезни. Так, из 1349 исследованных проб, в том числе 607 импортных, выявлено 313 серопозитивных проб в 2009 г. и за 9 мес. 2010 г. из 1821 исследованных, из них 918 импортных / 44 серопозитивных проб. Соответственно, количество исследованных проб увеличилось всего на 25,9%, количество выделений снизилось в шесть раз.

Экономический ущерб от данной инфекции значителен и складывается из падежа (отход молодняка свиней может достигать до 90%), вынужденного убоя, снижения прироста массы животного, потери племенных качеств, выбраковки туш, аборт, затрат на ликвидацию, общую и специфическую профилактику болезни, кроме того инфекция является зооантропонозом. Наша республика соседствует со странами с неблагополучной ситуацией по данной инфекции (Литва, Россия), поэтому следует более тщательно проводить мониторинг по БА в рамках разработки программы по борьбе с БА на территории республики.

Африканская чума свиней (АЧС)

Впервые зарегистрированная на территории Южной Африки в 1903 г., проникла в Европу в 1957 – 1960 гг. через Испанию и Португалию. Относится к списку А и контролируется МЭБ. Согласно данным международного эпизоотического бюро за период с 2005 по 2013 гг. по африканской чуме в мире неблагополучны более 32 страны, в том числе, Россия (2007 г), Чечня, Италия (Сардиния), Азербайджан, Грузия (с 2007 г), Беларусь (2013).

Так, за период с 1996 по 2004 годы неблагополучие по АЧС наблюдалось только в странах африканского региона и в отдельных областях Италии [5,9].

Таблица 2 – Эпизоотическая ситуация в отдельных государства (согласно данным МЭБ 2000–2004 гг.)

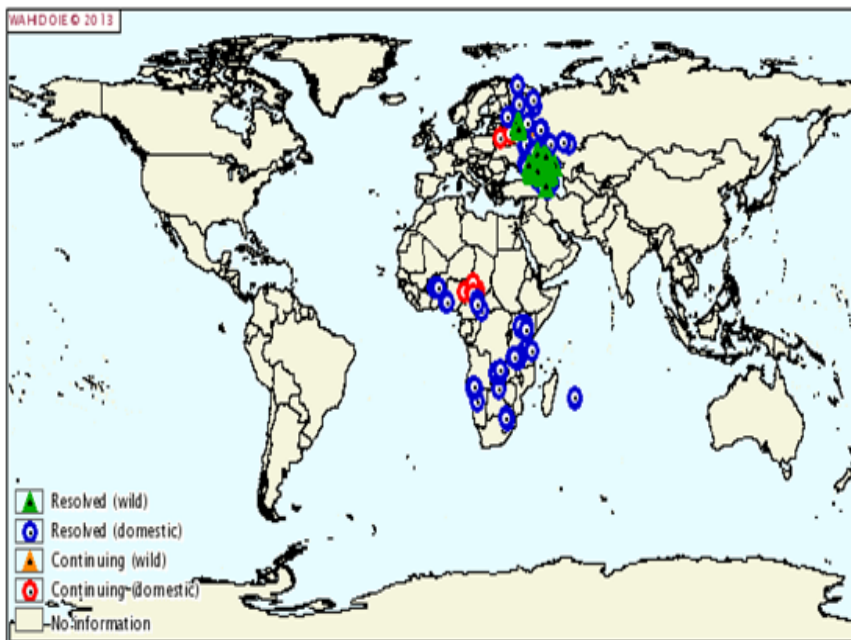
годы		Африка	Италия
2000	вспышек	154	11
	пало	18000	96
2001	вспышек	286	11
	пало	81376	13
2002	вспышек	454	11
	пало	35768	5
2003	вспышек	333	12
	пало	33427	72
2004	вспышек	425	248
	пало	30000	375

Из таблицы 2 видно, что ежегодно в африканском регионе регистрируется до 200 – 400 вспышек АЧС, при которых погибают до 80000 животных, так, в 2001 году от АЧС в Африке пало 81376 свиней.

Наиболее крупные вспышки АЧС в Италии зарегистрированы в 1996 и 2004 годах, падеж составил 139 и 375 голов свиней соответственно.

За период с 2005 по 2013 гг. наблюдались единичные вспышки африканской чумы в странах бывшего СССР – Азербайджане в 2008 году и в Армении 2007 – 2008 гг., а также в 2010–2011 годах.

Исходя из данных карты (рисунок 2), 24 государства африканского региона на протяжении последних 8 лет неблагоприятны по африканской чуме. Причем, если в странах африканского региона поражение фиксируют в основном у домашних свиней, то в Европе наблюдается еще и значительное инфицирование диких кабанов (Северная Осетия и другие части кавказского региона)[1, 9,10].



**Рисунок 2 – Карта распространения АЧС в мире 2005-2013 гг.
(по данным МЭБ)**

В Украине АЧС диагностирована 30 июля 2012 года в с. Камышуватка Запорожской области: в личном хозяйстве был зафиксирован падеж 5 свиней [9,11]. Кроме того, уничтожению подлежали 170 свиней, а также свиньи личных подсобных хозяйств мариупольского региона, граничащего с Россией [12].

В Грузии 4 июня 2007 г. референтная лаборатория МЭБ в Пербрайте (Великобритания) выявила в пробах патологического материала вирус АЧС с помощью тестов «золотого стандарта». Вирус АЧС «Грузия 2007» был отнесен к наиболее распространенному генотипу II, изоляты которого выделялись в 1993–2002 гг. в регионах юго-восточной Африки

(Мозамбик, Замбия, Мадагаскар), реже в западной, центральной Африке и на Сардинии. Неблагополучными оказались сразу 11 пунктов (деревенские и частные фермы) по всей республике, от приморских портовых районов Абхазии и Аджарии до восточных территорий вблизи границ с Азербайджаном. После марта 2008 г. о новых вспышках более не сообщалось.

Единственная зарегистрированная в Азербайджане вспышка АЧС возникла 28 января 2008 г. в деревне Ник в районе Габала северо-запад страны, около 180 км от границы с Грузией.

В Армении первая вспышка зарегистрирована в северном районе республики, граничащем с Грузией 6 августа 2007 г. Большинство вспышек зарегистрировано в тех же северных районах вблизи границ с Грузией. Последняя официально подтвержденная вспышка болезни произошла в 2010 – 2011 гг. [2,9,10].

Наиболее неблагоприятная ситуация по африканской чуме, на сегодняшний момент, сложилась в российской федерации. Так с 2007 года, по данным Россельхознадзора, наблюдалось 548 вспышек АЧС, в том числе 328 вспышек среди домашних свиней, 191 вспышка среди диких кабанов, 29 инфицированных объектов. Только в 2013 году зарегистрировано 144 вспышки АЧС: 76 среди домашних свиней, 63 среди диких кабанов и 5 инфицированных объектов. Вспышки зарегистрированы в Краснодарском крае, Тверской, Новгородской, Астраханской, Волгоградской, Воронежской, Московской, Смоленской, Ярославской, Псковской, Ростовской и Тульской областях, в Республиках Калмыкия и Карелия, С. Осетия [6].

Таблица 3 – Эпизоотологические данные по АЧС среди домашних животных в отдельных регионах РФ

Республика, край, область	Количественные данные (поголовье)						Индексы (%)			
	Экспонировано	Заболело	Потери				Заболелость*	Смертность**	Летальность	Потерь***
			Пало	Уничтожено	Убито	Всего				
Всего	84900	4250	3360	34650	18700	56710	4.9	3.95	79	67
Северная Осетия	25900	2050	2020	19000	9700	30720	7.8	7.9	99	120
Ставропольский	9000	700	460	2850	4200	7510	7.7	7.7	64	83
Краснодарский	12400	400	330	5400	300	6030	3.2	2.6	82	50
Ростовская	33650	530	400	6600	4400	11400	1.5	1.2	75	34

*в данном случае показатель регистрируемого распространения болезни в популяции риска (экспонированных, или подозреваемых в заражении животных), выражаемый отношением числа заболевших к ее общей численности.

** показатель тяжести влияния болезни на популяцию животных, выражаемый отношением числа павших к численности популяции риска. Одновременно это может косвенно свидетельствовать об экстренности принимаемых мер.

*** показатель потерь, выражаемый отношением общего числа павших, уничтоженных и убитых к экспонированным, также косвенное свидетельство полноты реализации политики стемпинг аут.

Как видно из данных таблицы 3, индексы заболеваемости и смертности не превышают 8 %. Наиболее высокая смертность наблюдалась в регионах Северной Осетии и Ставропольском крае (7,9/7,7% соответственно), при этом индексы летальности и потерь доходили до 99 и 120% в зависимости от региона (64% Ставрополье, 99% Северная Осетия и соответственно индекс потерь 34% Ростовская область, 120% Северная Осетия).

Всего за семилетний период экономический ущерб составил 30 млрд. рублей [13].

Несмотря на комплекс предпринятых в Республике Беларусь мер, 21 июня 2013 года Белорусским государственным ветеринарным центром в патологическом материале, полученном от трупа свиньи, принадлежащей жителю деревни Чапунь Ивьевского района Гродненской области, выявлен генетический материал возбудителя африканской чумы свиней.

25 июня 2013 года министром сельского хозяйства Республики Беларусь Леонидом Зайцем был подтвержден [14] факт заражения АЧС поголовья свиней в Ивьевском [15], Новогрудском, Кореличском, Столбцовском и Воложинском районах.

4 июля 2013 года Департамент ветеринарного и продовольственного надзора Минсельхозпрода Республики Беларусь подтвердил [16] факт обнаружения вспышки африканской чумы свиней на свиноводческом комплексе "Лучеса" ОАО "Витебский комбинат хлебопродуктов" в агрогородке Копти. Общее число павших животных в этих случаях составило 27 голов (без учета вынужденноубитых животных).

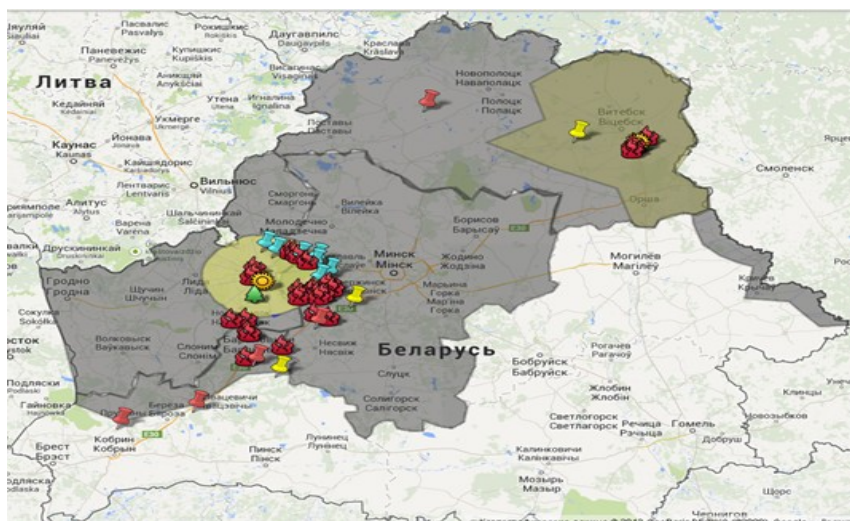


Рисунок 3 – Карта распространения АЧС в Республике Беларусь

Как видно на карте (рисунок 3), в Республике Беларусь существует 2 официально признанных очага АЧС, кроме того, с целью недопущения разноса инфекции проведено массовое уничтожение свиноголовья личных подсобных хозяйств на 13 объектах Воложинского района, 4 – Ивьевского, 1 – Дятловского, 5 – Барановичского, 12 – Столбцовского, 4 – Витебского, 2 – Новогрудского. Вынужденное уничтожение свиноголовья личных подсобных хозяйств предпринимается в Барановичском, Ивацевичском, Ляховичском, Рогачевском и Пружанском районах [17].

ВЫВОДЫ

1 Согласно данным международного эпизоотического бюро за период с 2005 по 2013 гг. по африканской чуме в мире неблагополучны более 32 стран в том числе Россия (2007г.) Чечня, Италия (Сардиния), Азербайджан, Грузия с 2007 г., Беларусь (2013).

Всего за период с 2007 по 2013 годы на территории России выявлено 548 вспышек африканской чумы, из них 328 вспышек среди домашних свиней и 191 вспышка среди диких кабанов, на территории Украины зарегистрирована 1 вспышка африканской чумы в селе Комишеватка Приморского района Запорожской области.

В Республике Беларусь официальный диагноз на африканскую чуму установлен 21 июня 2013 года в д. Чапунь Ивьевского района, на сегодняшний момент официально диагностировано 2 очага АЧС в д. Чапунь и а/г Копти.

2 Согласно данным AVHLA (Англия) и SPC парвовирусная болезнь свиней относится к заболеваниям списка D (экономически значимые инфекции) и распространена во многих странах мира – Венгрии, Польши, Франции, Германии и Дании) и бывшего Советского Союза, Израиля, Китая, Вьетнама и Японии.

Ежегодно в Республике Беларусь диагностируется от 3 до 10 % животных, положительно реагирующих на парвовирусную инфекцию, при обследовании менее 1% общего поголовья свиней в РБ.

3 За период 2005–2013 год по данным МЭБ болезнь Ауески зафиксирована в 47 странах мира, причем в основном это страны Европы. Болезнь Ауески диагностируется, в том числе, в России и ежегодно выявляется от 2 до 10 случаев заболевания в Республике Беларусь.

Приведенные нами данные, указывающие на персистенцию возбудителей парвовирусной болезни свиней и болезни Ауески в хозяйствах Республики Беларусь, а также наличие официально зарегистрированных вспышек африканской чумы свиней, коррелируют с данными стран ближнего зарубежья (Россия, Украина, Польша) и указывают на необходимость проведения более глубокого мониторинга по этим инфекциям. Проведение подобных сравнительно-аналитических исследований по вышеописанным и другим инфекциям позволяет прогнозировать возникновение инфекции и своевременно принимать меры по ее возникновению и распространению.

Проведенные нами исследования указывают на необходимость пересмотра устаревшей системы эпизоотологического мониторинга и создание «прозрачной информационной системы» в рамках ветеринарной службы республики. Однако, несмотря на такие недостатки, ветеринарная служба республики способна своевременно реагировать на возникновение вспышек особо опасных инфекций и предупреждать их распространение на обширных территориях.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Сельское хозяйство республики Беларусь// статистический сборник– Минск, 2011.
- 2 Бакулов, И. А. Проблемы современной эволюции африканской чумы свиней / И. А. Бакулов, В. В. Макаров // Вестник с.-х. науки. – 1990. – № 3.
- 3 Орлянкин, Б.Г. Парвовирусная болезнь свиней / Б.Г. Орлянкин, В.А. Сергеев, В.А. Седов // Ветеринария. 1987. – №8.
- 4 Уласов, В. Болезнь Ауески свиней / В. Уласов, А. Ольшанская // Болезнь Ауески свиней: сб. науч. работ. Владимир, 2001.
- 5 Официальный сайт World Animal Health Information Database (WAHID) – Version: [Copyright © World Organisation for Animal Health \(OIE\)](http://www.oie.int) . [Electronic resource].–2013. – Mode of access <http://www.oie.int>,
- 6 Официальный сайт Россельхознадзора . [Electronic resource]. – 2013.– Mode of access: <http://www.fsvps.ru>
- 7 Орлянкин, Б.Г., Парвовирусные инфекции и их влияние на продуктивность животных / Б.Г. Орлянкин, В.А. Сергеев, С.П. Качанова // ВНИИТЭИСХ, М., 1985.
- 8 Борьба с болезнью Ауески у свиней// информационный портал промышленного свиноводства.– [электронный ресурс].–2010.– режим доступа: http://piginfo.ru/perspektivnoe_zhivotnovodstvo/veterinariya/borba-s-boleznyu-aueski-u-sviney
- 9 Макаров, В.В. Африканская чума свиней// официальный сайт Россельхознадзора.– [электронный ресурс].–2013.– режим доступа: http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/news/asf/asf_makarov/asf_makarov.pdf
- 10 Макаров, В. В. Комментарий к современной ситуации по АЧС / В. В. Макаров // Ветеринарный консультант. –2007.– № 12. – С. 4–6.
- 11 АЧС в Украине //ООО "Издательство Агрорус" (Группа компаний «iArt.– [электронный ресурс].–18.10.2012.– режим доступа: <http://www.agroxxi.ru/zhivotnovodstvo/sobytiya/achs-v-ukraine.html>
- 12 В Украине обнаружена смертельная африканская чума// новости происшествия. – [электронный ресурс].–2.08.2012.– режим доступа: <http://www.dailysmi.net/news/149806/>
- 13 Африканская чума свиней заставила Украину усилить контроль на границе со странами Таможенного союза// ukrday.com. –[электронный ресурс].– 29.08.2013. – режим доступа: <http://ukrday.com/novosti.php?id=85059>
- 14 Эксперты о чуме свиней: в угрожаемую зону вошли части Ивьевского, Новогрудского, Кореличского, Столбцовского и Воложинского районов// onliner.by. – [электронный ресурс].–26.06.2013.– режим доступа: <http://dengi.onliner.by/2013/06/26/svin-4/>
- 15 Африканская чума свиней в Беларуси. Меры по ликвидации заболевания// agrolive.by.–[электронный ресурс].–30.06.2013.–режим доступа:<http://www.agrolive.by/selwest/article523>
- 16 Госветслужба подтвердила вспышку АЧС в Витебской области// бизнес новости. – [электронный ресурс]. – 04.07.2013. – режим доступа: <http://doingbusiness.by/gosvetzluzhba-podtverdila-vspishku-achs-v-vitebskoi-oblasti>
- 17 Всех свиней ликвидируют еще в четырех районах Беларуси// euroradio.fm. – [электронный ресурс]. – 01.08.2013. – режим доступа: <http://euroradio.fm/ru/vseh-sviney-vyrezhut-eshche-v-chetyreh-rayonah-belarusi>

Ероховец Н.Ф., научный сотрудник
Гусев А.А., доктор ветеринарных наук, профессор
Згировская А.А., кандидат биологических наук
Ломако Ю.В., кандидат ветеринарных наук
Конончик Е.С., младший научный сотрудник

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

К ВОПРОСУ О СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКЕ БОЛЕЗНИ АУЕСКИ СВИНЕЙ

Болезнь Ауески (псевдобешенство, инфекционный бульбарный паралич, зудящая чума, бешеная чесотка) – остро протекающая болезнь сельскохозяйственных животных всех видов, пушных зверей и грызунов. Вирус у свиней локализуется в миндалинах, слизистых оболочках дыхательных путей. Характерный признак болезни — обильное пенистое слюноотделение. Поросята до 4-дневного возраста в течение 1 ч впадают в состояние гипогликемической комы и через 3 – 4 ч погибают без каких-либо специфических клинических признаков. У поросят до 10-дневного возраста наблюдается паралитическая форма: в начале заболевания поросята возбуждены, затем следует паралич задних конечностей. Животные ложатся на один бок и переворачиваются. Если их перевернуть на другой бок, они немедленно принимают прежнее положение.



Рисунок 1 – Поросята с нервной клиникой
(<http://archive.defra.gov.uk>)

Болезнь у свиноматок и подсвинков старше 5-месячного возраста проявляется в форме доброкачественного гриппоподобного синдрома (кашель, признаки ринита и конъюнктивита) или пневмонии, сопровождающиеся обильным слюнотечением. Признаки поражения ЦНС проявляются редко. Супоросные матки могут abortировать, а в случае переболевания за 10 – 12 суток до опороса отмечается высокий процент мертворождаемости; у подсосных свиней болезнь сопровождается гипоагалактией. Летальность свиней от болезни Ауески (БА) находится в прямой зависимости от возраста и составляет практически 100% среди новорождённых, 40% – среди свиней до двухмесячного возраста, 1 – 3% – в трёхмесячном возрасте и старше [10].



Рисунок 2 – Вспышка болезни Ауески (<http://www.nadis.org.uk>)

Для правильного выбора средств специфической профилактики этого заболевания необходимо помнить некоторые особенности патогенеза и биологических свойств вируса БА свиней.

Во-первых, это **нейротропизм** вируса. При попадании вируса на слизистую носоглотки он проникает в периферическую нервную систему, а затем распространяется прямым нейролимфогенным путём по обонятельному, тройничному и языкоглоточному нервам, достигая через 48 часов центральной нервной системы, где размножается. Во второй фазе болезни вирус распространяется лейкоцитами через кровеносную и лимфатическую системы по всему организму. Генерализация процесса длится примерно 7 дней [1,3]. На 8-й день вирус исчезает из ЦНС, в это время в крови появляются вируснейтрализующие антитела.

При проникновении через кожу вирус быстро размножается в месте внедрения – в соединительной и мышечной тканях, затем лимфогенным и гематогенным путями распространяется по всему организму.

В течение последних 30 лет в Европе у свиней отмечают выраженный

пневмотропизм вируса, то есть он преимущественно размножается в легких. Это связано с тем, что штаммы с низкой патогенностью не вызывают клинического проявления заболевания у взрослых животных, а репродукция вируса происходит в месте его внедрения.

Вирус начинает выделяться на 2 – 5 день после инфицирования, его можно выделить в высоких титрах из носовых секретов, эпителия миндалин, вагинальных и препуциальных секретов, молока или мочи в течение более 2 недель. Одной из отличительных особенностей вируса БА является его способность вызывать длительное **вирусоносительство** у переболевших животных. Длительность вирусоносительства у свиней колеблется в зависимости от возраста животных от 130 до 180 дней, а слабовирулентные штаммы, обладающие относительно низким нейротропизмом, могут быть вирусоносителями до 12 месяцев и более.

У выздоровевших свиней БА переходит в **латентную** форму, при которой вирус может пожизненно персистировать в ЦНС (тройничном ганглии), миндалинах и лимфоузлах, и начать выделяться после стрессовых воздействий: опорос, скученность, транспортировка. Установлено, что кортикостероидные инъекции (dexamethasone, 2 mg/kg, IM) в течении 5 последовательных дней вызывают повторную вспышку болезни. Экспериментально доказана реактивация *in vivo* и *in vitro* латентного вируса у поросят, полученных от вакцинированных свиноматок [17, 18, 20, 21, 23, 24, 27].

Кроме этого, вирус БА оказывает выраженное **иммуносупрессивное** действие на организм инфицированных свиней – в стаде таких свиней часто отмечают вспышки бактериальных болезней, вызываемых *Streptococcus suis* 2, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis* и/или *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Одним из главных звеньев в комплексе ветеринарно-санитарных мероприятий в борьбе против болезни Ауески является применение вакцин, обладающих способностью вызывать у свиней в короткие сроки выработку стойкого и длительного иммунитета [11].

Для специфической профилактики БА применяются инактивированные, цельновирионные живые (из аттенуированных штаммов), субъединичные и генно-инженерные (делетинированные) вакцины.

Живые вакцины – это, как правило, искусственно ослабленные посредством культивирования или природные авирулентные либо слабовирулентные иммуногенные штаммы вируса, при серийных пассажах которых на естественно восприимчивых животных была минимизирована способность к горизонтальной передаче. Аттенуированные в чужеродном организме вирусы приобретают множественные мутации в геноме, препятствующие реверсии вирулентных свойств [12]. По мнению многих исследователей [25] они обладают менее выраженной инвазивностью, чем их вирулентные предшественники. Репликация вакцинных штаммов в организме легче подавляется естественными неспецифическими защитными механизмами.

Основным преимуществом живых вакцин считается активизация всех звеньев иммунной системы, вызывающая сбалансированный иммунный ответ (системный, локальный, иммуноглобулиновый и клеточный). Кроме того, они создают раннюю неспецифическую защиту, развивающуюся уже через один-два дня после введения вируса благодаря явлению гомологичной интерференции, сводя до минимума нежелательные эффекты, что, наряду с клеточным иммунитетом, особенно актуально при БА свиней. Применять такие вакцины в неблагополучных и угрожаемых хозяйствах можно 1–2-дневным поросётам. Однако следует помнить, что у поросят от вакцинированных свиноматок молозивные антитела сохраняются до 11 недель, поэтому необходима двукратная вакцинация. При применении живой вакцины необходимо учитывать ряд недостатков, снижающих её безопасность: имеется зависимость между степенью аттенуации вакцинного штамма и иммуногенностью препарата; она индуцирует более слабый материнский иммунитет, чем инактивированные препараты, вакцинный вирус может передаваться посредством прямого контакта другим животным и иногда он обладает остаточной вирулентностью для отдельных видов животных.

В республике применяют сухую культуральную вакцину против болезни Ауески из штамма ВГНКИ российского производства и вакцину живую из авирулентного штамма «КМИЭВ V-106» вируса болезни Ауески свиней отечественного производства. Рекомендуется использовать эти вакцины в неблагополучных и угрожаемых по БА хозяйствах, продолжительность иммунитета после вакцинации 12 – 18 месяцев.

Инактивированные вакцины более безопасны и безвредны. Они демонстрируют стабильность основных биологических свойств. При их применении возможна стандартизация дозированного введения специфического антигена и при этом в крови создаются высокие концентрации антител, которые через молозиво передаются потомству. Кроме того, есть возможность успешного применения в поливалентном или ассоциированном варианте [7]. Однако клеточный иммунитет от инактивированных вакцин активируется в меньшей степени, чем от живых. Они обладают недостаточной эффективностью, так как при контроле на овцах, подсвинках, пушных зверях, кроликах и морских свинках защита установлена у 80 – 90 % животных [2]. К недостаткам инактивированных вакцин следует отнести часто встречающиеся локальные реакции в месте введения вакцины. Кроме этого, инактивированные вакцины могут приводить к появлению реакции гиперчувствительности [1, 4, 16, 22].

Выпускаются ассоциированные вакцины российского производителя – ЗАО НПО Нарвак: против БА, парвовирусной инфекции и лептоспироза (ПЛА); против БА, парвовирусной инфекции, лептоспироза, РРСС и хламидиоза (ПЛАХ); против БА, парвовирусной инфекции, лептоспироза, РРСС и рожи (ПЛАРР). Вакцины используют только для взрослых свиней, продолжительность иммунитета – 6 месяцев. Этим же производителем выпускают-

ся две инактивированные вакцины против болезни Ауески, которые применяются и для поросят старше 45 дней: вакцина инактивированная концентрированная эмульгированная против БА (БАК) и вакцина против рожи и БА свиней. Продолжительность иммунитета 6 месяцев.

В последние годы выражена тенденция к разработке и широкому внедрению вакцин нового поколения, это **субъединичные и генно-инженерные вакцины**. К ним относятся **маркированные** вакцины против БА. При их производстве используют вирусные штаммы, имеющих делецию генов, кодирующих один из гликопротеинов вируса – gE, gC, gG или синтез фермента тимидинкиназы (ТК), не являющиеся существенными для размножения вируса. При иммунизации такими вакцинами у животных не образуются антитела против отсутствующего гликопротеина - «маркера», а при инфицировании животных полевыми вирусными штаммами антитела против такого гликопротеина присутствуют. Таким образом, можно дифференцировать инфекционный и вакцинный иммунитет. В настоящее время в качестве таких дискриминирующих тестов используется система на основе блокирующего иммуноферментного анализа с применением моноклональных антител, как правило, зарубежного производства («Laboratories HIPRA» или «INGENASA» Испания, «Chekit - ИФА» фирма Bommeli-IDEXX и др.) [14].

Такого рода вакцины по сравнению с традиционными обладают следующими преимуществами: индуцируют биологически полноценный иммунитет, не уступающий постинфекционному; лишены инфекционного начала, тем самым снимается вопрос о генетическом загрязнении биосферы при массовом их применении [5, 6, 8, 9, 13, 15, 19]. Поэтому применение маркированных вакцин является основным пунктом в программе по контролю и искоренению этого заболевания.

Если принимается решение об оздоровлении хозяйства от БА свиней, то наряду с другими санитарными мерами необходимо будет выполнить 3 обязательных условия: во-первых, провести серологическое и вирусологическое обследование поголовья для выявления наличия циркуляции эпизоотических штаммов вируса, латентно инфицированных животных; во-вторых, в соответствии с полученными результатами выбрать маркированную вакцину и проводить 1 раз в 4 месяца массовую вакцинацию всего поголовья (или только свиноматок и хряков); в-третьих, вакцинацию сочетать с серологическим обследованием поголовья и отбраковкой зараженных животных-вирусоносителей [6].

В настоящее время выпускается большое количество маркированных вакцины различных зарубежных производителей для специфической профилактики БА. В таблице 1 приведены данные о делеции генов в выпускаемых вакцинах.

Таблица 1– Маркированные штаммы вируса БА в вакцинах разных производителей

Производитель, страна и торговое название	Живые вакцины (штамм, делеция гена)	Инактивированные (штамм, делеция гена)
HIPRA, Испания AUSKIPRAGN	« Bartha K61 » gE (–)	«Bartha K61 » gE (–)
Schering-Plough , США	«S-PRV-155 Iowa» gE, или gG,(–)	–
Merial , Франция AKIPOR		«Bartha K61 » gE (–)
Boehringer Ingelheim , Германия INGELVAK AUJESZKY MLV	« Bartha K61 » gE (–)	–
Fort Dodge , США Suvaxyn PrV gpl	« Bartha K61 » gE (–)	–
Intervet, Нидерланды PORCILIS	«Begonia» gE , (–) TK(–)	«Phylaxia » gE (–)
VETERINA , Хорватия	« Bartha K61 » gE (–)	«53p2» gE (–)
Ceva , Франция	« MNC+/10a » gE (–)	–
The Upjohn Co, США	«Rice», TK-, gG	
SyntroVet Inc, США	Iowa S-62, TK (–), gG, gE	Iowa S–62, gG
SmithKline Beecham Norden Laboratories, США	Bucharest , gE	Bucharest , gE
Tech America Fermenta A.H.	Bucharest, TK(–), gC	
Pfizer, США PR-VAC Plus	Bucharest, gE	–
ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия Вирусвакцина против болезни Ауески свиней и овец и вакцина против болезни Ауески эмульгированная	БК gE(–)	БК gE(–)

Из данных таблицы 1 следует, что наиболее распространенный штамм, применяемый для изготовления вакцин – Bartha K61. У него отсутствуют гены, кодирующие экспрессию гликопротеина gE (gI).

Также делегированы по этому гену штаммы Begonia, Phylaxia, 53p2, S-PRV-155 Iowa, ВК. Штамм MNC+/10a получен из исходного штамма Bartha K61 [13].

В РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» разработаны две отечественные маркированные по gE вакцины – живая против болезни Ауески свиней и РРСС и инактивированная против болезни Ауески из штамма «КМИЭВ V-106А».

К большому сожалению, в ряде свиноводческих комплексов применяют маркированную вакцину против болезни Ауески свиней без проведения предварительного серологического и вирусологического обследования для выявления латентно инфицированных животных, а ведь от результатов этих исследований принимается решение о вакцинации только племенного стада или всего поголовья. Не проводится серологическое обследование вакцинированных животных с помощью дискриминирующих тестов для выбраковки латентно инфицированных животных.

Прививки затрудняют, но не предотвращают инфицирование поголовья и распространение вируса среди свиней. Применение вакцин приводит к сокращению экономических потерь, числа вирусоносителей и больных животных. Ликвидация БА в этой системе возможна лишь за счет уничтожения серопозитивных животных при постоянном контроле популяции животных на фермах [13].

В хозяйствах с широким распространением латентной инфекции для защиты от неё необходимо применять маркированные вакцины без удаленного гена тимидинкиназы (ТК) и с преимущественно интраназальным способом введения.

Фермент ТК необходим вирусу для размножения в ЦНС, при его помощи происходит прикрепление вируса к TG сайтам на слизистой носовых ходов и поскольку он удален, остаются свободными естественные пути передвижения и дальнейшего размножения эпизоотического вируса в организме свиней. Имеются экспериментальные данные, что аттенуированный ТК-негативный вирус может обуславливать реактивированную латентную инфекцию у свиней [10, 23].

Кроме того, интраназальная вакцинация почти не вызывает вмешательства материнских антител, тогда как при внутримышечной вакцинации происходит вмешательство большого числа материнских антител на начальном этапе, что может стать причиной неудачной вакцинации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимо отметить, что даже правильно организованная и строго выполняемая схема вакцинации может привести к снижению циркуляции вируса на ферме или в районе, но не к искоренению полевого вируса. Только комплексная Национальная программа контроля и искоренения БА может привести к оздоровлению свиноводческих хозяйств республики от

этого заболевания.

В сложившейся эпизоотической ситуации, когда разработаны и выпускаются отечественные средства для специфической профилактики и доступен широкий арсенал диагностических средств, настало время разработать такую программу и приступить к её выполнению.

ЛИТЕРАТУРА

1 Болезнь Ауески: обзор /П.В.Малярец, Е.В.Гусева, Т.А.Ануфриева. Владимир : ФГУ «ВНИИЗЖ», 1993. – 72 с.

2 Инактивированные вакцины против болезни Ауески / А.И.Дудников [и др.] // Журн. Ветеринария. – 1993. – № 10. – С. 21–23.

3 Инфекционная патология животных: в 2 т./ Под редакцией А.Я. Самуиленко [и др.]. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006.– Т.1.–1911с.

4 Ильясова, Г.Ф. Иммунобиологическая характеристика инактивированной гамма - лучами вакцины «ГАММАВАК-ВНИВИ» против болезни Ауески /Г.Ф. Ильясова [и др.]// Актуальные проблемы инфекционной патологии животных: материалы Междунар. науч. конф., посвященной 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ 30–31 октября 2003 г. – Владимир, 2003. – С. 420–421.

5 Константинов, А.В. Специфическая профилактика болезни Ауески свиней вирусвакциной из маркированного штамма «ВК» / А.В. Константинов[и др.]// Актуальные проблемы инфекционной патологии животных: материалы Междунар. науч. конф., посвященной 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ 30–31 октября 2003 г. – Владимир, 2003. – С. 126–129.

6 Магсумов, Р.З. Разработка технологии изготовления радиоинактивированной вакцины "Гаммавак-ВНИВИ" против болезни Ауески (псевдобешенства) и изучение ее эффективности в производственных условиях: Дисс. ... канд. ветер. наук : 16.00.03 / Р.З. Магсумов. – Казань, 2004. – 144 с.

7 Мищенко, В.А. Эмульсионная инактивированная концентрированная вакцина против болезни Ауески (технология изготовления, лабораторное и производственное испытание): автореф. дис. ...д-ра ветер. наук : 16.00.03 / В.А. Мищенко; Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН. – Харьков, 1997. – 39 с.

8 Моренков, О.С. Болезнь Ауески: иммунологическая характеристика гликопротеинов gE и gB вируса и разработка методов серологической диагностики болезни и контроля “маркированных” вакцин: Дисс. ... д-ра биол. наук: 16.00.03/ О.С. Моренков – М., 2001. – 254 с.

9 Моренков, О.С. Маркированные вакцины и дискриминирующие тесты —основа программ искоренения болезни Ауески / О.С. Моренков, Ю.А. Собко // Журн. Аграрная Россия. – 2002. – №2. – С. 48–52.

10 Никитин, М.Г. Болезнь Ауески/ М.Г. Никитин, П.М. Базылев// М.:Колос, 1967.

11 Ольшанская, А.А. Методы борьбы с болезнью Ауески / А.А. Ольшанская, В.И.Черемашенцев// Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2011. – №1. – С. 36–38.

12 Сергеев, В. А. Вирусные вакцины / В. А. Сергеев – Киев: Урожай, 1993. – 367 с.

13 Шевцов, А.А. Некоторые аспекты эпизоотического проявления / А.А.

Шевцов[и др.] классической, африканской чумы свиней и болезни Ауески // Информационно-аналитический обзор – ФГУ «ВНИИЗЖ» Информационно-аналитический центр, Владимир, 2008. – 47 с.

14 Яснева, Е.А. Оптимизация условий постановки непрямого варианта иммуноферментного анализа для определения антител на штаммы «БК» и «К» вируса болезни Ауески в сыворотках крови свиней P51–55/ Е.А. Яснева, А.В. Константинов// Журн. Ветеринарная патология. – 2007. – №4 – С. 51–57

15 Alvarez, E. Biological characterization of a recombinant pseudorabies virus / E. Alvarez, C. Prieto, F.J. Martinez-Lobo// Span. J. Agr. Res. – 2008. – Vol.6, N4. – P. 521–530.

16 Analysis of protective immunity against PRV infection in pigs using attenuated and inactivated PRV vaccines /E.M.A. van Rooij, M.G.M. de Bruin, Y.E. de Visser// J. Vet. Res.–2000.– Vol.31, N 1.– P.135–135.

17 Barragry, T. B. Pig diseases and modern vaccines/ T. B. Barragry //Irish Vet. News. – 1991. – V. 13, №3. – P. 28–33.

18 Cowen, P. Reactivation of latent pseudorabies virus infection in vaccinated commercial sows / P. Cowen [et al.] // Amer. J. Vet. Res. – 1990.– Vol. 51, N 3.–P. 354–358.

19 Gómez-Sebastián, S. DIVA diagnostic of Aujeszky's disease using an insect-derived virus glycoprotein E / S. Gómez-Sebastián [et al.] // Journal of Virological Methods. – 2008. – Vol. 153, № 1. – P.29–35.

20 Lokensgard, J. R. Pseudorabies virus latency: restricted transcription // J. R. Lokensgard, D. G. Thawley, T. W. Molitor //Arch. Virol. 1990. – Vol. 110, N 1/2. – P. 129–136.

21 Lokensgard, J. R. Enzymatic amplification of latent pseudorabies virus nucleic acid sequences / J. R. Lokensgard, D. G. Thawley, T. W. Molitor // J. Virol. Meth.– 1991. – V.34, N 1. – P.45–55.

22 Meini, A. Serological field responses in fattening pigs treated with different inactivated Aujeszky vaccines in Italy / A. Meini, P. G. Pozzi // 12th Int. Pig Vet. Soc.– Netherlands, 1992. – Proc. 1. – P. 75.

23 Mengeling, W. L. Virus reactivation in pigs latently infected with a thymidine kinase negative vaccine strain of pseudorabies virus// Arch. Virol. – 1991. –Vol.120. – P. 67–70.

24 Mengeling, W. L. The effect of vaccination on shedding, latency and reactivation of virulent pseudorabies virus / W. L. Mengeling [et al.] // 12th Int. Pig Vet. Soc. – Netherlands, 1992. – Proc. 1. – P. 60.

25 Mettenleiter, T.C. Molecular biology of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus / T.C. Mettenleiter // Com. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. – 1991. – Vol. 14, N. 2 – P. 151–163.

26 Pseudorabies (Aujeszky's Disease) and its eradication: A review of the U.S. experience // USDA, Technical Bulletin [Electronic resource]. –2008, № 1923. – Mode of access:http://www.aphis.usda.gov/publications/animal_health/content/printable_version/pseudo_rabies_report. Date of access : 15.12.2010.

27 Rziha, H.-J. Herpesvirus (pseudorabies virus) latency in swine: Occurrence and physical state of viral DNA in neural tissues / H.-J. Rziha, T. C. Mettenleiter, V. Ohlinger // Virology.– 1986. – Vol.155, N 2. – P. 600–613.

Кухтын Н. Д., доктор ветеринарных наук*

Перкий Ю. Б., кандидат ветеринарных наук*

Крушельницкая Н. В., младший научный сотрудник**

**Тернопольская государственная сельскохозяйственная опытная станция
Института кормов и сельского хозяйства Подолья НААН Украины,
г. Тернополь*

***Государственный научно-исследовательский контрольный институт
ветеринарных препаратов и кормовых добавок Украины, г. Львов*

ВЛИЯНИЕ ТРИПСИНА НА МИКРОБНЫЕ БИОПЛЁНКИ, СФОРМИРОВАННЫЕ БАКТЕРИЯМИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ С ДОИЛЬНОГО ОБОРУДОВАНИЯ И МОЛОКА СЫРОГО

ВВЕДЕНИЕ

Молоко и молочные продукты составляют основную часть рациона для большинства людей. Однако, высокое качество молочной продукции зависит от качества и безопасности молока сырого. Микробиологический фактор является одним из основных, влияющих на качество и безопасность молока сырого. Наиболее важным источником микробного обсеменения молока сырого является доильное оборудование и молочный инвентарь [1, 3]. Более 40% пищевых отравлений людей вызываются микроорганизмами, которые поступают в сырье и готовые продукты с технологического оборудования [7]. Результаты последних научных исследований указывают, что микроорганизмы на технологическом оборудовании выживают благодаря способности формировать биопленки [9, 10]. Биопленка – это живая совокупность одного или нескольких видов или родов бактерий, которая постоянно обновляется, прикреплена к биогенной или абиогенной поверхности и окружена полисахаридной матриксом [6]. Матрикс – смесь экзополисахаридов, белков, нуклеиновых кислот и других неорганических веществ, он защищает бактерии от факторов окружающей среды [8].

Таким образом, способность бактерий к формированию биопленки на поверхности доильного оборудования является важным условием их выживания и, соответственно, источником поступления в молоко. Исследованиями установлено, что бактерии в биопленке являются устойчивыми к действию антимикробных препаратов, моющих и дезинфицирующих средств [5]. Согласно требованиям международного законодательства к пищевым продуктам производители сырья и готовых продуктов должны использовать такие средства санитарной обработки технологического оборудования при применении которых образование биопленки было бы

минимальным [2].

Целью работы было изучение влияния протеолитического энзима – трипсина на деградацию микробных биоплёнок, которые образуются на поверхности доильного оборудования и выделенные нами с доильного оборудования и молока сырого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для эффективной борьбы с микробными биопленками на доильном оборудовании мы изучали влияние на них протеолитического энзима – трипсина в условиях *in vitro*. Использовали энзим немецкой фирмы Merck, оптимальное действие которого происходит при температуре 35 ± 2 °C, pH 7,5 $\pm 0,2$ ед. С целью изучения влияния различной концентрации трипсина на уже сформированные микробные биопленки мы выращивали биопленки мезофильных бактерий в МПБ в стерильных пластиковых чашках Петри (d – 5 см) при температуре 37 °C в течение 24 часов, психротрофных – при температуре 20 °C в течение 24 часов. Затем сливали среду, биопленки промывали один раз фосфатным буфером и вносили в чашки Петри раствор трипсина различных концентраций в объеме 5 см³. На каждую концентрацию трипсина использовали три чашки Петри со сложившейся биопленкой микроорганизмов. Время действия энзима составляло 1 час. После этого энзим сливали и чашки трижды промывали фосфатным буфером, высушивали, фиксировали спиртом и окрашивали образовавшиеся биопленки кристаллическим фиолетовым. Затем в чашки вносили 2,5 см³ спирта и оставляли на 30 мин до полного отмыывания красителя. Плотность биопленок оценивали по оптической плотности промывных спиртовых растворов биопленок по сравнению с контролем. Контролем были чашки с биопленками, на которые не воздействовали энзимом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЯ

Результаты исследований влияния различной концентрации трипсина на уже сформированные микробные биопленки приведены в таблице 1

Как видно из данных таблицы 1, наиболее плотные биопленки (1,80–2,11 ед.) кокковых форм микроорганизмов (*Streptococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*) подвергались разному разрушению при действии протеолитического энзима трипсина в течение 1 часа. Действие трипсина в концентрации 25 мг/дм³ снижало плотность биопленки в 1,4–2,2 раза, а концентрация 75,0 мг/дм³ — в 1,6–2,4 раза по сравнению с контролем. Последующее увеличение концентрации до 100 мг/л уже не имело такого дозозависимого эффекта, плотность биопленки уменьшалась в 1,7–2,2 раза. При воздействии на биоклетку сформированных кишечной и синегнойной флорой также установлен дозозависимый эффект трипсина, когда с увеличением концентрации энзима произошло более сильное разрушение биопленки, а при концентрации трипсина 75–100 мг/дм³ разрушение биопленки было

практически такое же. Эти данные указывают на то, что в состав матрикса биопленок этих микроорганизмов входит примерно до 50 % белковых компонентов, которые разрушал трипсин.

Биопленки психротрофных бактерий вида *P. fluorescens* и рода *Alcaligenes* полностью разрушались при действии энзима трипсина в концентрации 50 мг/дм³ и более. Вероятно, биопленки этих микроорганизмов, в основном, состоят из белков, или адгезивные связи между биопленкой и поверхностью очень слабые и трипсин их быстро разрушает.

Таблица 1 – Влияние различной концентрации протеолитического энзима трипсина на биопленки, сформированные микроорганизмами, выделенные из доильного оборудования и молока сборного, ед., М ± m, n = 45

УДК 619:616.33:616.8:617.5:636.22/28

Безбородов П.Н., кандидат биологических наук, доцент

Род, вид бактерий	Оптическая плотность промывных растворов биопленок после воздействия различной концентрации трипсина мг/дм ³ в МПБ				
	контроль	25	50	75	100
<i>Streptococcus (uberis, agalactiae)</i>	1,45 ±0,132	1,33 ±0,128	1,12 ±0,089*	0,92 ±0,098**	0,85± 0,087***
<i>Micrococcus spp.</i>	2,11 ±0,176	1,50 ±0,123**	1,35 ±0,129**	1,15 ±0,121**	1,05± 0,081***
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,87 ±0,141	1,60 ±0,137	1,41 ±0,127*	1,18 ±0,121**	1,03± 0,071***
<i>Escherichia coli</i>	1,52± 0,137	1,24 ±0,131*	1,10 ±0,102*	0,80± 0,076***	0,63± 0,055***
Грамположительные палочки	1,41 ±0,117	1,35 ±0,115	1,28 ±0,103	1,18 ±0,106	0,75± 0,067**
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,80 ±0,131	0,83± 0,071***	0,87± 0,013***	0,74± 0,065***	0,80± 0,077***
<i>P. fluorescens</i>	1,24 ±0,101	0,32± 0,033***	0,12± 0,002***	0,13± 0,002***	0,12± 0,002***
<i>P. aeruginosa</i>	1,68 ±0,111	0,89 ±0,081**	0,80± 0,072***	0,78± 0,070***	0,81± 0,069***
<i>Alcaligenes spp.</i>	0,56 ±0,031	0,24± 0,021***	0,21± 0,020***	0,19± 0,017***	0,19± 0,011***

Примечание – * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001 по контролю

Таким образом, результаты данного опыта указывают, что у микроорганизмов, выделенных доильного оборудования и молока сырого, матрикс биопленки разрушается на 50 % и более протеолитическим энзимом трипсина. Концентрация трипсина 75 мг/дм³ оказалась оптимальной для разрушения биопленки в течение 1 часа.

С целью определения оптимального времени воздействия энзима трипсина на образовавшиеся микробные биопленки, изучали его влияние в концентрации 75 мг/дм³ в течение разного времени. Результаты исследований приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние энзима трипсина в концентрации 75 мг/дм³ на сформированные биопленки в течение разного времени, ед., $M \pm m$, $n = 45$

Род, вид бактерий	Оптическая плотность промывных растворов биопленок после действия трипсина				
	конт-роль	5 мин	15 мин	30 мин	45 мин
<i>Streptococcus (uberis, agalactiae)</i>	1,49 ±0,129	1,40 ±0,127	1,08 ±0,110*	0,96 ±0,089**	0,91 ±0,095**
<i>Micrococcus spp.</i>	1,72 ±0,146	1,65 ±0,148	1,60 ±0,142	1,45 ±0,141*	1,31 ±0,135**
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,80 ±0,151	1,62 ±0,142	1,51 ±0,148*	1,49 ±0,132*	1,43 ±0,130*
<i>Escherichia coli</i>	1,50 ±0,135	1,37 ±0,129	1,18 ±0,113*	1,14 ±0,111*	1,10 ±0,108*
Грамположительные палочки	1,45 ±0,121	1,38 ±0,115	1,29 ±0,117	1,25 ±0,120	1,23 ±0,120
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,73 ±0,139	1,60 ±0,142	1,32 ±0,131*	1,28 ±0,127*	1,13 ±0,118**
<i>P. fluorescens</i>	1,33 ±0,134	0,82 ±0,071**	0,52± 0,033***	0,33± 0,031***	0,29± 0,018***
<i>P. aeruginosa</i>	1,70 ±0,147	1,25 ±0,115	0,85 ±0,077	0,84 ±0,079	0,87 ±0,079
<i>Alcaligenes spp.</i>	0,63 ±0,034	0,34 ±0,023*	0,26± 0,015***	0,22± 0,013***	0,21± 0,014***

Примечание – * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ по контролю

Как видно из данных таблицы 2, действие трипсина на биопленки кокковых форм микроорганизмов, кишечную и синегнойную палочки в течение 5 мин было очень слабым. Через 15 мин наблюдали снижение плотности биопленки у кокковых форм микроорганизмов и *E. coli* в 1,2–1,4 раза, а в синегнойной палочки в 2,0 раза. При воздействии трипсина в течении 30 – 45 мин. на биопленку кокковых форм бактерий её плотность уменьшилась незначительно по сравнению с действием энзима в течение 15 мин.

Наиболее оптимальный период воздействия энзима на биопленки психротрофных бактерий вида *P. fluorescens* и рода *Alcaligenes* 15 – 30 мин.

Проведенные исследования указывают на то, что для разрушения белковых микробных биопленок на доильном оборудовании с помощью трипсина наиболее оптимальным является использование его в концентрации 75 мг/дм³ в течение 15–30 мин.

ВЫВОДЫ

Установлено, что у бактерий, выделенных с доильного оборудования и молока сырого, матрикс биоплёнок деградируется в среднем на 50 % протеолитическим энзимом трипсина в концентрации 75 мг/л в течении 15–30 минут.

ЛИТЕРАТУРА

1 Дегтярев, Г.П., Жайкин, В.В. Повышение качества заготавливаемого молока // Молочная промышленность. – 2003. – №4. – С.33 – 34.

2 Дж. Хола Очистка и дезинфекция. Режим доступа: <http://baker-group.net/frozen-food/723-cleaning-and-disinfection.html>.

3 Кухтин, М. Д. Теоретичне обґрунтування ветеринарно-санітарних нормативів і розроблення системи контролю виробництва молока коров'ячого незбираного охолодженого: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. вет. наук: спец.16.00.06 “Гігієна тварин та ветеринарна санітарія” / М. Д. Кухтин. — Львів, 2011. — 40 с.

4 Кухтин, М.Д. Формування микробних біоплівок на поверхнях різних матеріалів мікроорганізмами, які виділені з технологічного устаткування / М.Д. Кухтин, Ю.Б. Перкій, Н.В. Крушельницька // Ветеринарна біотехнологія. – Випуск 22. – Ніжин «ПП Лисенко М.М.». – 2013. – С. 292 – 297 с.

5 Мошкевич, И. Р. Микробные биопленки при смешанных инфекциях: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 03.00.07 «Микробиология» / И. Р. Мошкевич – Санкт-Петербург, 2007. – 19 с.

6 Costerton, J. W. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections / J.W. Costerton, R. Veeh, M. Shirtliff // J. Clin. Invest. – 2003. – Vol.112(10). – P. 1466–1477.

7 Haeghebaert, S. Food poisoning incidents in France in 1998 / S. Haeghebaert, F. Le Querrec, V. Vaillant, ED. Astagneau, P. Bouvet // Bull Epidemiol Hebdomad. – 2001. – P. 65–70.

8 Kolter, R. Microbial sciences: the superficial life of microbes / R. Kolter, EP. Greenberg // Nature. – 2006. – Vol.441. – P. 300–302.

9 Lequette Yannick Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry / Yannick Lequette, Gauthier Boels, Martine Clarisse, Christine Faille // Biofouling. – 2010. – Vol.26, №4. – P. 421–431.

10 Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review / F. Pe'rez-Rodríguez, A. Valero, E. Carrasco and other // Trends Food Sci. Technol. – 2008. – P. 131–144.

Финогенов А.Ю., кандидат ветеринарных наук
Финогенова Е.Г., кандидат ветеринарных наук
Зубовский Д.К., кандидат медицинских наук*
Шимко О.В., кандидат ветеринарных наук

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

**Учреждение образования «Белорусский государственный университет физической культуры», г. Минск*

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ СПОРТИВНЫХ ЛОШАДЕЙ ПРИ ФОНОФЕРЕЗЕ ХОНДРОПРОТЕКТОРОВ

ВВЕДЕНИЕ

Незаразные болезни лошадей наносят значительный экономический ущерб коневодству. Неправильно организованный тренировочный процесс, высокая степень эксплуатации животных, несбалансированное кормление, и т.д. без должной компенсации могут приводить к развитию «профессиональных» болезней лошадей [2].

Так называемые «профессиональные» болезни лошадей – воспалительные и дегенеративные болезни суставов, связок, мышечной ткани, сердечно-сосудистой системы – создают серьезные трудности в эффективной эксплуатации этих животных и представляют собой большую проблему в спортивном коневодстве [5]. Сам характер этих болезней предполагает длительное и интенсивное лечение, освобождение больных животных от соревнований и отсутствие уверенности в возможности полного восстановления двигательных функций лошади [3]. В связи с этим, достижение высоких результатов часто невозможно без применения специальных средств.

Одной из самых распространенных причин нетрудоспособности лошади является хромота [8]. Причины появления хромоты могут быть самые разнообразные, но наиболее часто она связана с поражением суставов, связок и сухожилий [9]. Артрозу у лошадей наиболее подвержены суставы запястья, скакательный и венечный суставы. Основные причины – неправильная постановка конечностей (козинец, саблистость и др.) и неадекватные нагрузки при тренинге, особенно в молодом возрасте.

При лечении заболеваний суставов наряду с широким использованием стероидных и нестероидных противовоспалительных препаратов, противомикробных препаратов, гомеопатических средств, усиливающих местное кровообращение, хирургическим вмешательством, физиотерапией в настоящее время создаются средства, способные замедлить прогрессирование остеоартроза. Эти препараты называются

структурно-модифицирующими, их роль заключается в способности предотвратить, замедлить, стабилизировать или подвергнуть обратному развитию остеоартритический процесс не только в хряще, но и во всем суставе [1].

Одним из таких хондропротективных препаратов является хондроитин сульфат. Это препарат со среднемолекулярным строением обладает противовоспалительной активностью, воздействуя в основном на клеточный компонент воспаления, стимулирует синтез гиалуроновой кислоты и протеогликанов и угнетает действие протеолитических ферментов.

Фонофорез – это эффективная и безболезненная процедура, в ходе которой происходит введение фармакологических препаратов через кожный покров с помощью ультразвука. Данный терапевтический метод имеет ряд преимуществ перед обычным введением препаратов в организм с помощью инъекций или орально, потому что дает возможность вводить препарат непосредственно в проблемное место. Препарат не оказывает токсического воздействия на весь организм, поскольку не попадает в кровоток и позволяет избежать возникновения побочных эффектов от его применения [7, 4].

Таким образом, ультразвук и хондроитин сульфат по отдельности представляют большой интерес в лечении дегенеративно-дистрофических заболеваний. Известно, что фонофорез лекарственных препаратов усиливает местный кровоток, вызывает проникновение через кожу лекарственных препаратов непосредственно в зону применения, т.е., туда, где это действительно необходимо, не рассеиваясь по всему организму [7, 4]. Имеются работы, в которых показана высокая терапевтическая эффективность воздействия ультрафонофореза с хондроитин сульфатом (мазь Хондроксид) [6].

Однако данные работы носят единичный характер и большинство из них посвящены исследованиям на человеке. Работ, посвященных определению эффективности применения фонофореза хондропротекторов у спортивных лошадей, так же как и предлагаемых для этих целей препаратов практически не встречается. Поэтому изучение влияния фонофореза хондропротекторов на организм лошадей является актуальным.

Исходя из вышеизложенного материала, **целью** работы является изучение влияния фонофореза хондроитина сульфата на показатели крови лошадей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе ГУ «Республиканский центр олимпийской подготовки конного спорта и спортивного коневодства», УО «Белорусский государственный университет физической культуры» и РУП «Институт экспериментальной ветеринарии».

Для определения влияния фонофореза хондроитина сульфата на показатели крови лошадей была сформирована опытная группа спортивных лошадей с нарушением функции опорно-двигательного аппарата из 12 го-

лов.

До начала опыта от всех животных была отобрана кровь для исследования по гематологическим, биохимическим и иммунологическим показателям. Затем всем лошадям проводили курс фонофореза согласно инструкции к прибору. В качестве хондропротектора использовали разведенный хондроитин сульфат.

После завершения курса проводили контрольное взятие крови от всех лошадей и проводили сравнения полученных данных до фонофореза и после фонофореза.

Гематологические исследования проводили на гематологическом анализаторе Medonic CA 620 который проводит исследование крови по 9 основным показателям: количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гемоглобина, гематокрит, средний объем тромбоцитов, средний объем эритроцитов, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, среднеклеточный гемоглобин.

Определение лейкоцитарной формулы проводили унифицированным методом морфологического исследования форменных элементов крови с дифференциальным подсчетом лейкоцитарной формулы.

Биохимические исследования сыворотки крови проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Avtolyser (Австрия) с использованием наборов производства фирмы Кормэй-Диане. Биохимическое исследование проводили по 20 показателям аланинаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, амилаза, аспартатаминотрансфераза, прямой билирубин, общий билирубин, кальций, холестерин, креатининкиназа, креатинин, железо, гамма-глутамилтрансфераза, глюкоза, мочевая кислота, лактатдегидрогеназа, магний, фосфор, триглицериды, общий белок, мочевины. Иммунологические исследования включали в себя проведение электрофореза сыворотки крови для определения процентного соотношения белковых фракций.

Электрофорез белков сыворотки крови проводили с диагностическим набором для электрофоретического разделения белков сыворотки крови на агарозе CORMAY GEL PROTEIN 100.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты гематологического исследования до начала курса и после окончания курса фонофореза хондроитина сульфата приведены в таблице 1.

При сравнении гематологических показателей лошадей до и после проведения фонофореза достоверные изменения наблюдаются в содержании эритроцитов, которое увеличилось с $6,01 \pm 0,16 \cdot 10^{12}/л$ до $6,41 \pm 0,13 \cdot 10^{12}/л$, т.е. на 6,6%. Также у отдельных лошадей было отмечено снижение содержания лейкоцитов в пределах нормы, что может быть связано с уменьшением воспалительного процесса в суставе.

Таблица 1 – Гематологические показатели лошадей до и после проведения курса фонофореза с хондроитином сульфатом

Взя- тие кро- ви	Эрит- роци- ты 10х1 2	Тром- боци- ты 10х9	Ге- мо- гло- бин г/л	Гема- то- крит %	MPV мкм ³	Лей- ко Ци- ты 10х9	MCV мкм ³	МСН ммол ь/л	МС Н f мол ь
До опы- та	6,01 ±0,16	155,7 ±10,0	10,9 ±0,2 5	0,28 ±0,01	7,52 ±0,13	7,45 ±0,7 0	46,9 ±0,72	39,13 ±0,24	1,84 ±0,0 3
Пос- ле опы- та	6,41* ±0,13	139,0 ±4,51	11,0 ±0,2 0	0,28 ±0,01	7,36 ±0,10	7,20 ±0,4 4	47,3 ±0,61	39,44 ±0,23	1,86 ±0,0 2

Примечание – * $P \leq 0,05$, MPV – средний объем тромбоцитов, MCV – средний объем эритроцитов, МСНС – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, МСН – среднеклеточный гемоглобин

Лейкоцитарная формула крови лошадей до и после курса применения фонофореза приведена в таблице 2.

Таблица 2 – Лейкограмма крови лошадей до и после применения фонофореза с хондроитином сульфатом

Взя- тие кро- ви	Лейкограмма, %						
	Базо- филы	Эозино- филы	Нейтрофилы			Лим- фо- циты	Мо- но- циты
			Юные	Палочко- ядерные	Сегменто- ядерные		
До опыта	0,00	5,08	0,00	2,83	48,17	42,00	1,92
	±0,00	±0,42	±0,00	±0,27	±1,59	±1,89	±0,19
После опыта	0,00	2,33	0,00	2,92	46,25	47,00	1,50
	±0,00	±0,40	±0,00	±0,40	±3,38	±3,45	±0,15

При сравнении процентного содержания отдельных групп лейкоцитов в крови лошадей до и после применения фонофореза достоверных отличий не отмечено, что свидетельствует об отсутствии отрицательного влияния фонофореза на картину крови лошадей.

Результаты определения активности ферментов в сыворотке крови лошадей до и после курса применения фонофореза приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Активность ферментов в сыворотке крови лошадей до и после курса применения фонофореза

Взятие крови	Активность фермента, Ед/л							
	АЛТ	ЩФ	Ами-лаза	АСТ	КК	ГГТ	НБДН	ЛДГ
До опыта	13,18	144,17	4,54	205,54	347,64	12,37	229,44	649,64
	±1,11	±11,75	±0,96	±14,61	±43,85	±1,04	±28,17	±33,32
После опыта	14,50	140,98	4,05	174,24	* 254,90	* 15,83	185,50	** 469,79
	±1,08	±10,05	±0,94	±8,59	±17,90	±0,87	±16,19	±27,35

Примечание – * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,001$, АЛТ – аланинаминотрансфераза, ЩФ – щелочная фосфатаза, АСТ – аспаратаминотрансфераза, КК – креатинкиназа, ГГТ – гамма-глутамилтрансфераза, НБДН – альфа-гидроксibuтират-дегидрогеназа, ЛДГ – лактатдегидрогеназа

При сравнении полученных результатов по содержанию ферментов в сыворотке крови лошадей до и после фонофореза достоверные отличия получены в содержании креатинкиназы, гамма-глутамилтрансферазы и лактатдегидрогеназы. Так, содержание креатинкиназы снизилось с $347,64 \pm 43,85$ Ед/л (что выше физиологической нормы) до $254,90 \pm 17,90$ Ед/л (физиологическая норма), т.е. на 26,7%. Содержание гамма-глутамилтрансферазы увеличилось в пределах физиологической нормы с $12,37 \pm 1,04$ Ед/л до $15,83 \pm 0,87$ Ед/л, т.е. на 28%. Содержание лактатдегидрогеназы снизилось с $649,64 \pm 33,32$ Ед/л (что выше физиологической нормы) до $469,79 \pm 27,35$ Ед/л (приближается к физиологической норме), т.е. на 38,3%.

Результаты определения содержания субстратов в сыворотке крови лошадей до и после курса проведения фонофореза приведены в таблицы 4.

При сравнении полученных результатов по содержанию субстратов в сыворотке крови лошадей до и после применения фонофореза достоверные отличия получены в содержании глюкозы, общего белка и триглицеридов. Так, содержание глюкозы увеличилось в пределах физиологической нормы с $64,61 \pm 1,57$ г/л до $68,18 \pm 0,81$ г/л, т.е. на 14,9%. Содержание общего белка увеличилось в пределах физиологической нормы с $51,82 \pm 4,64$ мкмоль/л до $35,59 \pm 2,75$ мкмоль/л, т.е. на 5,5%. Содержание триглицеридов увеличилось в пределах физиологической нормы с $0,20 \pm 0,02$ ммоль/л до $0,27 \pm 0,02$ ммоль/л, т.е. на 35%.

Таблица 4 – Содержание субстратов в сыворотке крови лошадей до и после проведения фонофореза

Взя- тие кро- ви	Субстраты									
	Аль-бу- мин	Билли- рубин прям.	Биллиру- бин общ.	Холе- стерин	Креа- тинин	Глю- коза	Об- щий белок	Триг- лице- риды	Моче- вая к-та	Моче- вина
До о пы- та	35,55	4,68	53,08	1,89	86,84	5,04	64,61	0,20	29,13	4,51
	±1,94	±0,30	±5,24	±0,07	±2,63	±0,23	±1,57	±0,02	±5,34	±0,50
По- сле о пы- та	35,07	5,43	44,52	2,09	83,28	5,79*	68,18*	0,27*	26,73	4,84
	±1,95	±0,26	±2,96	±0,11	±2,54	±0,22	±0,81	±0,02	±4,52	±0,43

Примечание – * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$

Результаты определения содержания минералов в сыворотке крови лошадей до и после курса применения фонофореза приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Содержание минералов в сыворотке крови лошадей проведения курса фонофореза

Взятие крови	Содержание минералов			
	Кальций, ммоль/л	Железо, мкмоль/л	Магний, ммоль/л	Фосфор, ммоль/л
До опыта	2,50	20,78	0,59	0,61
	±0,22	±2,16	±0,08	±0,07
После опыта	3,26**	22,95	0,66	0,76
	±0,09	±2,04	±0,06	±0,05

Примечание – ** $P \leq 0,01$

При сравнении содержания минералов в сыворотке крови лошадей до и после опыта достоверные изменения отмечены только в содержании кальция, которое после применения фонофореза увеличилось с $2,50 \pm 0,22$ ммоль/л до $3,26 \pm 0,09$ ммоль/л, т.е. на 30,4%. Поскольку кальций является важным составляющим элементом костной ткани и суставов, увеличение его содержания должно благотворно влиять на состояние суставов у лошадей.

Результаты электрофоретического разделения белков сыворотки крови лошадей до и после применения фонофореза приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Количество и процентное соотношение белковых фракций в сыворотке крови лошадей до и после применения фонофореза

Взятие крови	Белковые фракции									
	Альбумины		Альфа-1-глобулины		Альфа-2-глобулины		Бета-глобулины		Гамма-глобулины	
	%	г/л	%	г/л	%	г/л	%	г/л	%	г/л
До опыта	50,15	35,07	4,04	2,79	2,83	1,94	16,70	11,47	26,21	17,95
	±0,90	±1,95	±0,26	±0,20	±0,19	±0,13	±0,62	±0,47	±0,98	±0,64
После опыта	42,36	35,55	3,59	2,31	3,46	2,22	21,32	13,79	33,37	21,66
	±1,95 **	±1,94	±0,14	±0,08 *	±0,19 *	±0,11	±0,46 ***	±0,48 **	±1,20 ***	±1,11 ***

Примечание – * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$

При сравнении соотношения белковых фракций в сыворотке крови лошадей до и после применения фонофореза достоверные отличия получены по содержанию все белковых фракций. Так, после применения фонофореза снизилось процентное отношение альбумина на 18,4%, фракция альфа-1-глобулинов снизилась в абсолютном выражении на 20,8%, а альфа-2-глобулинов увеличилась в процентном соотношении на 22,3%. Фракция бета-глобулинов увеличилась в процентном соотношении на 27,7%, в абсолютном выражении на 20,2%. Фракция гамма-глобулинов также увеличилась в процентном отношении на 27,3%, в абсолютном выражении на 20,7%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение показателей крови спортивных лошадей с поражением опорно-двигательного аппарата при применении фонофореза хондроитина сульфата показало, что после проведения фонофореза у лошадей отмечено увеличение содержания в крови эритроцитов на 6,6%. Кроме того, у отдельных лошадей отмечено снижение содержания лейкоцитов, что может быть связано с уменьшением воспалительного процесса в суставе.

Установлено также снижение содержания в сыворотке крови таких ферментов, как креатинкиназа и лактатдегидрогеназа, которые снизились соответственно на 26,7% и 38,3% и повышение гамма-глутамилтрансферазы на 28%. Также у части лошадей произошла нормализация активности ферментов, содержание которых до опыта выходила за пределы физиологической нормы. Такие изменения в ферментном профиле свидетельствуют об улучшении состояния мышц у лошадей.

В сыворотке крови лошадей до и после применения фонофореза отмечено увеличение общего белка на 5,5%, глюкозы на 14,9% и триглице-

ридов на 35%, что указывает на стимуляцию обменных процессов в организме и повышение гуморального иммунитета.

Фонофорез с хондропротектором ведёт к увеличению в сыворотке крови лошадей содержания кальция на 30,4%. Поскольку кальций является важным составляющим элементом костной ткани и суставов, увеличение его содержания должно благотворно влиять на состояние суставов у лошадей. Следует отметить, что у большинства лошадей содержание железа, магния и фосфора имеет тенденцию к увеличению по сравнению с физиологической нормой.

В белковых фракциях сыворотки крови после опыта отмечается снижение альфа-1-глобулиновой и повышение альфа-2-глобулиновой фракции, а также повышение бета- и гамма-глобулиновой фракции белка, что может быть связано со снижением воспалительной реакции и увеличением иммуноглобулинов, что свидетельствует о повышении иммунитета лошадей.

ЛИТЕРАТУРА

1 Диагностика, лечение и профилактика острого расширения желудка у спортивных лошадей: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / М. Д.А.С. Мувафак ; Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина, Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. – Москва, 2001. –18 с.

2 Диагностика, лечение, профилактика закрытых и открытых повреждений суставов и сухожилий у животных: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / М. С. Борисов; Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина. – Москва, 2001. – 43 с.

3 Диагностика, терапия и профилактика паразитарных болезней лошадей: учебно-методическое пособие для студентов / А.И. Ятусевич [и др.]; Учреждение образования "Витебская государственная академия ветеринарной медицины". – Витебск, 2011. – 56 с.

4 Пономаренко, Г.Н., Турковский, И.И. Биофизические основы физиотерапии: Учебное пособие.—М.: «Издательство«Медицина». – 2006.— 176 с.

5 Справочник по разведению и болезням лошадей / А. А. Лазовский [и др.] ; Ред. А. И. Ятусевич. – Москва : РЕАЛ–А, 2002. – 319 с.

6 Ультрафонофорез хондроксида — новый способ лечения больных остеоартрозом. Пособие для врачей Екатеринбург, 2004.

7 Физиотерапия: национальное руководство / под ред. Г.Н. Пономаренко. — М. : ГЭОТАР- Медиа, 2009. — 864 с.

8 Sachot, E. Boîteries du cheval. Les bisphosphonates traitent les boîteries d'origine osseuse / E. Sachot // Point Vétérinaire. – 2004. – Vol. 33, № 226. –P. 16–17.

9 Scapulohumeral osteoarthritis in 20 Shetland ponies, miniature horses and Falabella ponies / P.D. Clegg [et al.] // Veterinary Record. – 2001. – Vol.148, № 6. – P. 175–179.

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук
Ястребов А.С., доктор ветеринарных наук, доцент
Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор
Андросик Л.Д., кандидат ветеринарных наук

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

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ИНТЕРФЕРОНА, ИНДУКТОРА ИНТЕРФЕРОНА И АЛЬВЕОЗАНА В НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОМ ОПЫТЕ

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные и бактериальные инфекции, вызывающие поражение органов дыхания у свиней (РРСС, цирковиральная инфекция, грипп, пастереллёз, микоплазмоз, сальмонеллёз, актинобациллярная плевропневмония), диагностируются в свиноводческих хозяйствах и причиняют им экономический ущерб. Данные заболевания протекают чаще всего в виде смешанных вирусных и вирусно-бактериальных инфекций. В борьбе с ними вакцинопрофилактика играет решающую роль. Однако степень её эффективности напрямую зависит от состояния иммунной системы животных на момент проведения вакцинации.

Известно, что некоторые вирусы (вирус РРСС, цирковир-2 свиней) являются иммунодепрессантами и вызывают в организме состояние вторичного иммунодефицита [1]. В этой связи возникает необходимость в коррекции иммунитета, в применении препаратов, восстанавливающих иммунологические нарушения. Одним из перспективных направлений коррекции иммунитета является использование средств для повышения функциональной активности иммунной системы. Определенное место среди таких средств, обладающих способностью стимулировать иммунную систему, занимают препараты на основе цитокинов. Иммунокоррекция на базе цитокинов в основном связана с применением интерферонов [2,3].

Механизм действия интерферона заключается в воздействии на клетки через её специфический рецептор. Интерферон не препятствует проникновению вируса в клетку. Под его воздействием в клетке синтезируются протеины, которые препятствуют размножению вируса в клетке и тормозят его репродукцию, стимулируют активность Т-лимфоцитов и макрофагов. Интерфероны обладают выраженным противовирусным, иммуномодулирующим эффектом, активизируют защитные силы организма [4,5].

Иммуномодуляторы (*modulation*- перемена состояния, изменение) – это препараты, восстанавливающие функции иммунной системы.

В настоящее время изучены три класса интерферонов (ИФН): α , β и γ . Лейкоциты синтезируют α -ИФН, фибробласты – β -ИФН, макрофаги, моноциты – γ -ИФН. Наиболее широко применяется α -ИФН, его получают из лейкоцитов человека (человеческий интерферон), лейкоцитов свиньи (свиной лейкоцитарный интерферон). Следует отметить видоспецифичность интерферонов. В последнее время получен свиной рекомбинантный α -ИФН путем клонирования гена ИФН в клетках бактерий *E.coli* [6].

Индукторы интерферона индуцируют выработку эндогенного интерферона. Они представляют собой разнородные по составу семейство высоко- и низкомолекулярных природных и синтезированных соединений. Установлено, что почти все вирусы стимулируют выработку интерферона [7]. Наиболее активными индукторами интерферона вирусной природы являются парамиксовирусы, ортомиксовирусы, тогавирусы. В частности, активным индуктором интерферона является вирус болезни Ньюкасла [8], аденовирус-5 [9].

Интерферон выводится из организма после его применения через 12–24 часа, индуктор интерферона – через 24–48 часов. Очевидно, что для достижения нужной терапевтической концентрации их в крови требуются повторные введения препаратов.

Российскими учеными (Левагина Г.М., Аликин Ю.С., Масычева В.И. и др.) разработаны индукторы интерферона пролонгированного действия (провест, ридостин) на основе двуспиральной РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Их действие сохраняется до 5 суток после однократного введения животным [10].

Известны иммуностимуляторы – препараты микробного, растительного происхождения, а также синтетические. Альвеозан – полисахарид, получен из бактерии *B. alvei*. Литературные данные свидетельствуют о том, что он обладает иммуностимулирующими свойствами и применяется в качестве иммуностимулятора, повышающего естественную резистентность организма животных и активизирует поствакцинальный иммунитет [11, 12].

Интерферон как иммуномодулятор применяется в виде монопрепарата, а также в сочетании с другими препаратами. Установлено, что сочетанное применение интерферона с антибиотиками и витаминами усиливает действие интерферона и витаминов, входящих в состав препарата [13]. Китайские ученые [14] сообщили о том, что экспериментальное введение мышам интерферона в комбинации с вакциной против бешенства животных усиливало действие вакцины.

В доступной литературе мы не нашли сообщений о совместном применении для коррекции иммунитета иммуномодуляторов – интерферона и индуктора интерферона с иммуностимулятором «Альвеозан».

Целью работы было изучение в научно-производственном опыте иммунологической эффективности комплексного биологического препарата на основе интерферона свиного рекомбинантного, индуктора интерферона «Провест» и иммуностимулятора «Альвеозан».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыт проводили в свиноводческом хозяйстве Минской области, неблагополучном по РРСС, на 224 поросятах в возрасте 30-40 дней. Было сформировано 7 групп поросят.

Поросятам 1-ой опытной группы (44 головы) внутримышечно однократно вводили интерферон свиной рекомбинантный (1 мл) с альвеозаном (1 мл). Интерферон свиной рекомбинантный – противовирусный и иммуномодулирующий препарат, изготовитель ООО «НПЦ Белагроген», г. Горки, Могилевской области, ТУ BY 790624352.001-2010, серия и контроль №4, изготовлен в 2013 г., срок годности – 1 год. Альвеозан – иммуностимулятор, изготовитель РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, ТУ BY 600049853.169-2011, серия и контроль №4, изготовлен в 2013 г., срок годности – 1 год. Поросятам 2-й группы (76 гол.) – интерферон свиной рекомбинантный (1 мл); пороссятам 3-й группы (5 гол.) – индуктор интерферона «Провест» (1 мл) с альвеозаном (1 мл). Индуктор интерферона «Провест» – иммуномодулятор, производитель ООО «Диафарм», г. Бердск-10, РФ, изготовлен 20.04.2009, срок годности – 3 года. Поросятам 4-й группы (5 гол.) – индуктор интерферона «Провест» (1 мл). Поросят 5-й группы (7 гол.) привили инактивированной вакциной против РРСС и парвовирусной инфекции (2 мл), изготовитель – ФГУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир. Предварительно за сутки до введения вакцины пороссятам 5-й группы ввели интерферон свиной рекомбинантный (1 мл) с альвеозаном (1 мл). Поросят 6-й группы (3 гол) привили названной вакциной (2 мл) без предварительной обработки их комплексным биологическим препаратом на основе интерферона свиного рекомбинантного и альвеозана. Поросят 7-й группы (84 гол) не обрабатывали комплексным биологическим препаратом и они служили контролем.

До введения и через 21 день после введения комплексного биологического препарата у поросят отбирали пробы крови. Одну часть крови стабилизировали гепарином для получения стабилизированной крови для определения количества Т- и В-лимфоцитов, вторую часть использовали с целью получения сыворотки крови для определения ее бактерицидной, лизоцимной активности и фагоцитарной активности лейкоцитов. Количество Т-лимфоцитов определяли в реакции Е-розеткообразования с эритроцитами барана, В-лимфоцитов – с эритроцитами мыши.

Для выделения лимфоцитов использовали 35%-ный раствор сахарозы на физиологическом растворе (плотность 1,077 г/мл), который разливали по 3 мл в пробирки и наслаивали 3 мл стабилизированной крови поросят, цен-

трифугировали 15 мин при 1800 об/мин. Отсасывали лимфоциты, которые находились в узкой интерфазе между градиентом плотности и плазмой, трижды отмывали физиологическим раствором. Надосадочную жидкость декантировали. Определяли концентрацию лейкоцитов в камере Горяева и доводили ее до 2–4 млн. клеток в 1 мл.

В пробирки наливали по 0,25 мл суспензии лимфоцитов и вносили по 0,25 мл 0,5%-ной взвеси эритроцитов барана. Смесь инкубировали 15 мин при температуре 37°C, центрифугировали 5 мин при 800 об/мин, затем ставили на ночь в холодильник при 4...8°C. Из смеси лимфоциты + эритроциты барана готовили мазки-отпечатки на обезжиренных предметных стеклах и окрашивали по Романовскому-Гимза. Результаты исследования учитывали путем микроскопии препаратов с иммерсией (объектив $\times 90$, окуляр $\times 7$) и оценивали по количеству лимфоцитов с прикрепившимися не менее чем тремя эритроцитами на 100 подсчитанных лимфоцитов. Количество Т-лимфоцитов (%) определяли путем деления количества розеткообразующих лимфоцитов на общее количество лейкоцитов.

Количество В-лимфоцитов в стабилизированной крови поросят определяли по аналогичной методике, но с эритроцитами мыши.

Бактерицидную активность сыворотки крови поросят определяли по методу Смирновой и Кузьминой (1979), лизоцимную активность – по Дорофейчуку (1966).

Эффективность двух вариантов комплексного биологического препарата на основе интерферона свиного рекомбинантного и альвеозана, индуктора интерферона «Провест» и альвеозана оценивали по иммунологическим показателям – по количеству Т- и В- лимфоцитов в крови, бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови, фагоцитарной активности лейкоцитов, а так же по количеству заболевших, павших и выживших поросят в опытных и контрольной группах. Уровень антител к вирусу РРСС до и после введения вакцины против РРСС и парвовирусной инфекции определяли в ИФА.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты изучения эффективности двух вариантов комплексного биологического препарата в научно-производственном опыте представлены в таблице 1.

Установлено, что количество Т-лимфоцитов в крови поросят, обработанных комплексным биологическим препаратом на основе интерферона свиного рекомбинантного и альвеозана, была на 9,9% выше количества Т-лимфоцитов в группе поросят, обработанных интерфероном свиным рекомбинантным без иммуностимулятора «Альвеозан». Количество Т-лимфоцитов в крови поросят, обработанных комплексным биологическим препаратом на основе индуктора интерферона «Провест», было на 9,6% выше по сравнению с количеством Т-лимфоцитов в группе поросят, обработанных одним индуктором интерферона «Провест».

Таблица 1 – Количество Т- и В-лимфоцитов в крови поросят, обработанных комплексным биологическим препаратом на основе свиного рекомбинантного интерферона, индуктора интерферона и альвеозана

№ п/п	Группы поросят	Кол-во проб крови	Показатели количества лимфоцитов, %			
			Т-лимфоциты	Разница в % по сравнению с контролем	В-лимфоциты	Разница в % по сравнению с контролем
1.	Интерферон+альвеозан	10	43,3±0,49***	48,3	29,8±0,32	22,6
2.	Интерферон	15	40,4±8,75	38,4	26,8±2,57	10,3
3.	Индуктор интерферона+альвеозан	5	36,8±3,64	26	27,7±3,98	14
4.	Индуктор интерферона	5	34,0±4,07	16,4	25,8±1,82	6,2
5.	Контрольная группа	10	29,2±1,07	–	24,3±2,55	–

Примечание—***– $P \leq 0,001$.

Показатели количества В-лимфоцитов в названных группах поросят составили соответственно 12,3–7,8%.

Показатели неспецифической резистентности организма поросят, обработанных двумя вариантами комплексного биологического препарата, приведены в таблицах 2, 3.

Таблица 2 – Фагоцитарная активность лейкоцитов крови поросят после введения образцов комплексного биологического препарата, %

Группа животных	Срок взятия крови	
	До введения КБП	Через 21 день после введения
Опытная группа 1	17,8±0,7	22,3±1,16*
Опытная группа 2	16,8±0,43	20,0±0,23*
Опытная группа 3	17,7±0,52	24,1±0,91**
Опытная группа 4	19,0±1,31	19,9±0,54
Контрольная группа 5	15,6±0,72	18,1±0,59

Примечание—*– $P \leq 0,05$; **– $P \leq 0,01$

Из таблицы 2 видно, что через 21 сутки после введения поросят испытываемых образцов препарата происходит достоверное (в сравнении с контрольной группой) увеличение фагоцитарной активности лейкоцитов в 1-й, 2-й и 3-й опытных группах на 4,5% ($P \leq 0,05$), 3,2% ($P \leq 0,05$) и 6,4% ($P \leq 0,01$).

Таблица 3 – Бактерицидная и лизоцимная активность сыворотки крови поросят после введения образцов комплексного биологического препарата

Срок взятия крови	Группы животных	Показатели	
		Лизоцимная активность сыворотки крови, %	Бактерицидная активность сыворотки крови, %
До введения КБП	ОГ 1	16,6±0,31	47,5±0,4
	ОГ 2	18,4±0,65	50,3±2,6
	ОГ 3	16,6±0,35	49,4±0,79
	ОГ 4	17,4±0,4	53,7±4,66
	Контрольная	17,9±0,64	48,6±0,21
Через 21 день после введения	ОГ 1	19,9±0,5*	58,3±0,9*
	ОГ 2	19,7±0,44*	60,2±1,8*
	ОГ 3	16,5±0,29	53,7±1,41
	ОГ 4	20,7±0,76*	57,3±1,75
	Контрольная	17,4±0,55	51,7±1,51

Примечание—* – $P \leq 0,05$; ОГ – опытная группа.

Проведенные исследования свидетельствуют о стимулирующем действии разработанных двух вариантов препарата на активность лизоцима в крови поросят. Отмечено достоверное ($P \leq 0,05$) в сравнении с контролем увеличение данного показателя в 1-ой, 2-ой и 4-ой опытных группах на 3,3, 1,3 и 3,3% соответственно через 21 сутки после введения образцов комплексного биологического препарата.

Как следует из данных таблицы 3, через 21 сутки после введения поросятам двух вариантов комплексного биологического препарата бактерицидная активность сыворотки крови в опытной 1-й и 2-й группах поросят достоверно ($P \leq 0,05$) увеличивалась по отношению к показателям в контрольной группе на 10,8 и 9,9% соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что применение интерферона и индуктора интерферона в комплексе с иммуностимулятором «Альвеозан» сопровождается более выраженной иммунологической реакцией в организме поросят по сравнению с применением интерферона или индуктора интерферона без иммуностимулятора.

При исследовании сывороток крови от трех поросят, которым за 24 часа до вакцинации вводили комплексный биологический препарат на основе интерферона с альвеозаном, установили, что до введения вакцины против РПСС и парвовирусной инфекции свиней специфические антитела к вирусу РПСС отсутствовали. Через 21 и 35 дней после вакцинации их титр составил 1:4787 и 1:7345 соответственно. В группе поросят (3 гол.), привитых вакциной без предварительной обработки их комплексным биологическим препаратом, титр антител к вирусу РПСС через 21 день составил 1:1988. Сохранность поросят в опытных и контрольной группах приведена в таблице 4.

Таблица 4 – Сохранность поросят в опытных и контрольной группах в научно-производственном опыте

№ п/п	Группы поросят	Кол-во поросят	Количество голов					
			Заболело	%	Пало	%	Остались живыми	%
1.	Интерферон+альвеозан	44	7	15,9	2	4,5	42	95,5
2.	Интерферон	76	11	14,5	3	3,9	73	96,0
3.	Индуктор интерферона+альвеозан	5	0	0	0	0	5	100
4.	Индуктор интерферона	5	0	0	0	0	5	100
5.	Обработаны интерфероном+альвеозан и привитые вакциной	7	0	0	0	0	0	100
6.	Привитые вакциной	3	0	0	0	0	0	3
7.	Контроль	84	12	14,3	10	11,9	74	88,1

ВЫВОДЫ

1 Испытание эффективности двух вариантов комплексного биологического препарата (КБП) на основе интерферона свиного рекомбинантного и альвеозана, индуктора интерферона «Провест» и альвеозана в научно-производственном опыте показало, что оба варианта биологического препарата обладают иммунологической эффективностью. Применение их поросятам в возрасте 30-40 дней приводит к достоверному увеличению количества Т- и В-лимфоцитов в крови, повышению бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови и повышение фагоцитарной активности лейкоцитов.

2 Применение поросятам интерферона свиного рекомбинантного и индуктора интерферона «Провест» без иммуностимулятора «Альвеозан» также сопровождается повышением количества Т- и В-лимфоцитов, уровня бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови, фагоцитарной активности лейкоцитов крови. Однако они были ниже показателей в крови поросят, обработанных комплексным биологическим препаратом на основе интерферона и альвеозана, индуктора интерферона и альвеозана.

3 Применение поросятам комплексного биологического препарата на основе интерферона свиного рекомбинантного и альвеозана за 24 часа до введения инактивированной вакцины против РРСС и парвовирусной инфек-

ции свиней стимулирует антителообразование к вирусу РРСС. Титр антител к вирусу РРСС через 14 дней после вакцинации составил 1:4787, через 35 дней – 1:7345. До вакцинации антитела к вирусу РРСС отсутствовали. У поросят, привитых вакциной без предварительной обработки интерфероном с альвеозаном, через 21 день титр антител к вирусу РРСС составил 1:1988.

4 Применение комплексного биологического препарата на основе интерферона свиного рекомбинантного и альвеозана, индуктора интерферона «Провест» и альвеозана позволяет на 7,4% снижать падеж поросят и повышать их сохранность.

ЛИТЕРАТУРА

1 Хмылов, А.Г. Коррекция иммунной системы поросят на промышленных комплексах // Свиноводство. – 2010, №5. – С. 47–49.

2 Гавриков А.В. Препараты интерферона ЗАО «Мосагроген» // [и др.] Ветеринарии. – 2010, №7. – с. 14–18.

3 Машковский, М.Д. Препараты, корригирующие процессы иммунитета (иммуномодуляторы, иммунокорректоры) // В кн.: Лекарственные средства (пособие для врачей). – 1993. – часть 2. – с. 192–209.

4 Хмылов, А.Г. Профилактика вторичных иммунодефицитов поросят миксофероном // Степанов Е.М. Ветеринария. – 2006, №12. – с. 9–10.

5 Хантов, Р.М., Пинегин Т.В. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения // Иммунология. – 2000, №5. – с. 4–7.

6 Трубицына, М.В., Клонирование и экспрессия гена свиного лейкоцитарного α -интерферона в клетках бактерий *E.coli* // Потапович М.И., Прокулевич В.А. Труды Белорусского государственного университета Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2008, том 3, часть 1. – с. 80–84.

7 Epstein, O.I., Dugina M.V., Kachanova S.A. et al. Antiviral Aktiviti of Anntibodies to Interferon – Gamma in ultra – Low Doses // Вестник международной академии наук (русская секция). 2008. 2. P.20–23.

8 Лаптев, С.В., Общая биология и микробиология. Основы вирусологии. Особенности репродукции вирусов. Учебное пособие для модульно-рейтинговой технологии обучения // Мезенцева Н.И. 2005. – Изд-во Алтайского технологического ун-та. – 164 С.

9 Susan, L. Brockmeier, Crystal L. Loving, Eric A. Nelson et al. The pre-sense of Alpha Interferon at the Time of Intection on Alters the innate and Adaptive Immune Responses to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus // Clinical and Vaccine immunology. – April 2012, Nol.19, №4. – p.508–514.

10 Патент РФ №2172631 кл. A61K31/70, A61K31/7105, A61K47/06, 27.08.2001.

11 Дубина, И.Н. Альвеозан как средство активизации естественной резистентности кроликов // Гласкович А.А., Красочко П.А. Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – Горки. – 2000. – с. 233–

238.

12 Красочко, П.А. Активизация поствакцинального иммунитета у телят с помощью препарата альвеозан // Актуальные проблемы патологии с.-х. животных. Материалы международной научно-практической конференции. – Минск. – 2000. – с. 120-123.

13 Прокулевич, В.А. Ветеринарные препараты на основе интерферона //Потапович М.И. Вестник Белорусского государственного университета.- 2011. – серия 2. - №3. – с. 51-55.

14 Hui, Qi et al. Study on using Rabies Vaccine and Interferon – alfa-2b for Antirabies protective Effect of Mouse // J. of Anhui Agricultural Sciences. – 2008 – 09.

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор
Михалевич Е.А., младший научный сотрудник
Лемиш А.П., кандидат ветеринарных наук
Великий С.В., младший научный сотрудник

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

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПРИЧИН РЕАКЦИЙ НА ТУБЕРКУЛИН У КОРОВ

ВВЕДЕНИЕ

Проблема туберкулиновых реакций у коров без патоморфологического и бактериологического подтверждения туберкулеза привлекает внимание исследователей с 30-х годов прошлого века. Считалось, что такие реакции, в основном, обусловлены инфицированием поголовья атипичными (нетуберкулезными) микобактериями (НТМБ), индуцирующими чувствительность к туберкулину [8, 19, 20]. Совершенствование методов культивирования микобактерий туберкулеза (МБТ), в том числе и L-форм, применение новых иммунологических и молекулярно-генетических методов, позволило выявить связь туберкулиновых реакций в благополучных стадах со скрытой (латентной) туберкулезной инфекцией [2, 3, 9]. Вместе с тем, выяснение причин появления реакций на туберкулин в стадах, считавшихся благополучными, остается серьезной проблемой. Рекомендуемая для этих целей симультанная проба не всегда четко дифференцирует инфицирование НТМБ и скрытую туберкулезную инфекцию, кроме того, проба должна проводиться не ранее, чем через 42 – 60 дней после туберкулинизации с потерей статуса благополучия стада в этот период [7, 10, 19, 20].

В качестве альтернативного диагностического и дифференцирующего теста широко изучался иммуноферментный анализ (ИФА). Однако из-за антигенного родства МБТ и НТМБ и, соответственно, перекрестной активности антител к их антигенам были получены противоречивые результаты [4, 10, 12, 22, 24]. Применение для непрямого ИФА видоспецифических антигенов МБТ и их «коктейлей» не решило проблему низкой чувствительности теста [5, 10, 16, 17]. Это связано с тем, что при инфицировании *M. bovis* отмечается выраженная продукция микобактериальных антигенов, связывающих синтезирующиеся антитела с образованием иммунных комплексов (ИК), причем в первую очередь – к наиболее специфичным антигенам [4, 5, 11]. Поэтому для ИФА целесообразно одновременно использовать негретые дезинтеграты МБТ и НТМБ с широким спектром антигенов, что позволяет максимально обнаружить несвязанные антитела и

за счет антител к видоспецифическим эпитопам, присутствующих даже на общеродовых антигенах, по интенсивности реакции определить этиологический агент.

Применение вариантов ИФА для выявления антигенов МБТ и их комплексов с антителами, что дает возможность обнаружить животных, у которых основная масса антител связаны с антигенами, что часто отмечается при активном туберкулезе [13, 21, 23].

Исходя из этого, нами разработаны наборы для выявления и оценки специфичности антимикобактериальных антител и для обнаружения микобактериальных антигенов и их комплексов с антителами. Наборы были апробированы на заведомо здоровых животных и животных неблагополучных по туберкулезу стад [2]. **Цель** настоящих исследований – изучение диагностической ценности ИФА наборов на туберкулин-позитивных коровах из стад, считающихся благополучными по туберкулезу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Набор реагентов для определения специфичности антимикобактериальных антител. Штаммы *M.tuberculosis* H₃₇Rv, *M.bovis* 8, *M.fortuitum* 342 выращивали на среде Сотона 4–8 недель при температуре 37⁰С, инаktivировали фенолом (3%, 48 ч) и дезинтегрировали ультразвуком на Bandelin Sanoplus (3 цикла по 5 мин.).

Соникаты (3–4 мкг/100мкл в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере pH 9,3) сорбировали на панелях Sarstedt 1 ч, при температуре 37⁰С и перемешивали: *M.tuberculosis* (ряды 1,4,7,10), *M.bovis* (ряды 2,5,8,11), *M.fortuitum* (ряды 3,6,9,12). Несвязавшиеся антигены удаляли 4-кратным промыванием ЗФР-Т (0,15 М раствор NaCl, pH 7,5–7,8 с 0,2% твина 20).

Внесение проб. Разведения проб и контрольных сывороток (в дублях) готовили на отдельной панели. В лунки вносили по 200 мкл ЗФР-Т и добавляли по 15 мкл исследуемых и контрольных сывороток (разведение 1:13).

Во все лунки рабочей панели вносили по 50 мкл ЗФР-Т. Из панели для разведения проб 8-канальной пипеткой отбирали по 50 мкл разведенных проб, внося их в каждые три вертикальных ряда (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.fortuitum*) рабочей панели, получая конечное разведение проб 1:26. То есть, идентичное разведение каждой пробы одновременно исследовалось с каждым антигеном.

Рабочие панели с пробами инкубировали на встряхивателе 1 ч при температуре 37⁰С. После промывки во все лунки вносили конъюгат пероксидазы с антителами против IgG быка (Sigma) и инкубировали 1 ч при температуре 37⁰С. После промывки в лунки вносили субстратный раствор ТМБ, через 5 мин реакцию останавливали 10% серной кислотой. Результаты учитывали на спектрофотометре BioRad при 450 нм.

Контрольные сыворотки:

– (К-) эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота (для контроля неспецифической адсорбции);

– (К-НТМБ) бычья антисыворотка к смеси антигенов НТМБ (для сравнения интенсивности реакций с антигенами *M.bovis* и *M. fortuitum*;

– (К+ТУБ) баранья антисыворотка *M.tuberculosis* (1:2000) для контроля соотношения интенсивности реакций на антигены *M.tuberculosis* и *M.bovis* (К+ТУБ);

– (К+БОВ) сыворотка крови коровы, больной туберкулезом (или бычья антисыворотка *M.bovis* 1:2000), для оценки интенсивности реакции исследуемой пробы и соотношения интенсивности реакций на антигены *M.tuberculosis* и *M.bovis*. Контрольные сыворотки вносили в дублях в вертикальные ряды 1–3.

Оценка результатов. По каждой пробе определяли:

– отношение оптической плотности (ОП) Sample/Positive с антигеном *M.bovis* (показывает уровень антимикобактериальных антител, положительными считали пробы с показателем больше 0,45);

– отношение (Δ) ОП с антигеном *M. tuberculosis* и *M. bovis* (позволяет сделать предположение об инфицировании животных этими видами);

– отношение (Δ) ОП с антигеном *M. bovis* и *M. fortuitum* (позволяет сделать предположение об инфицировании животных МБТ или НТМБ).

Набор реагентов для определения микобактериальных антигенов и их комплексов (ИК) с антителами. Панели Sarstedt сенсibilizировали соникатом *M.bovis*, как указано выше. Для реакции использовали конъюгат пероксидазы с аффинноочищенными антителами к комплексу антигенов *M.bovis*. Антитела выделяли из кроличьей антисыворотки к *M.bovis* 8 на бромцианактивированной сефарозе 4В с антигенами МБТ и конъюгировали с пероксидазой (Sigma) по Nakane (1977).

Разведения проб и контрольных сывороток готовили на отдельной панели. В лунки вносили по 110 мкл конъюгата (1:80) и добавляли по 105 мкл исследуемых и контрольных сывороток. После 20 мин инкубации на встряхивателе при температуре 37⁰С каждую пробу по 95 мкл переносили в 2 лунки рабочей панели. Через 60 мин инкубации при температуре 37⁰С на встряхивателе панели 4-кратно промывали, в лунки вносили субстратный раствор ТМБ, через 5 мин реакцию останавливали 10% серной кислотой. Результаты учитывали на спектрофотометре BioRad при 450 нм.

Отрицательными контролями служили эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота и баранья антисыворотка к смеси антигенов НТМБ (1:40), положительным контролем – сыворотка крови коровы, больной туберкулезом (K+ar). Уровень антигенов МБТ и ИК определяли по снижению ОП смеси пробы и конъюгата в сравнении отрицательным контролем

(смесь конъюгата и эмбриональной сыворотки). Положительными считали пробы, ингибирующие активность конъюгата на 30% и больше.

Пробы крови. Исследовали 349 проб крови коров 13 молочно-товарных комплексов (МТК), на которых выявлялись коровы с реакциями на туберкулин, но результаты бактериологического исследования патологического материала и биопробы были отрицательными. Пробы отбирались с соблюдением правил асептики и антисептики в одноразовые шприцы.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) ставили с пулами (по 3 пробы крови). Кровь замораживали и оттаивали и обрабатывали меркаптоэтанолом. ДНК из лизата выделяли на колонках с сорбентом ДНК.

ПЦР ставили с использованием праймеров *M.tuberculosis*-*M.bovis* 16 sRNA (543 bp) и MPB 70 (472 bp) по стандартному протоколу [2].

Посев проб крови проводили на питательную среду Микофаст после инкубации в стимуляторе роста с 0,1% хлоргексидина.

Изоляты и мазки-отпечатки лимфатических узлов убитых с диагностической целью коров исследовали с помощью тест-системы для прямого выявления возбудителя туберкулеза. Мазки фиксировали 1 ч при температуре 65⁰С, для инактивации эндогенной пероксидазы обрабатывали 3% перекисью водорода и охлаждённым метанолом.

ИП окрашивание. На мазки наносили раствор конъюгата пероксидазы и антител к *M.bovis*, через 1,2 ч промывали водой и на 20 мин наносили фильтрованный раствор ДАБ (10 мг 3,3'-диаминобензидина «Fluka» в 2 мл ДМСО, 10 мл дистиллированной воды с 10 мкл 33% H₂O₂). После смывания субстрата мазки докрашивали 5 мин карболовым фуксин по Kinyoun, 70–90 сек обесцвечивали солянокислым спиртом и 2 мин – 0,3% метиленовым синим.

Микроскопию и фиксацию результатов проводили на микроскопе Olympus 56BX (10x100).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для корректной оценки ИФА при определении уровня и специфичности антител использовали показатели контрольных сывороток крови на каждой панели. К- НТМБ должна давать более интенсивную реакцию с антигеном *M. fortuitum*. Этот показатель (Δ ОП с антигеном *M. bovis* и *M. fortuitum*) колебался в пределах 0,76–0,92, т.е. реакции с антигеном *M. fortuitum* были на 8–24% интенсивнее и, наоборот, контрольная сыворотка К+БОВ на 20–50% интенсивнее реагировала с гомологичным для нее антигеном *M. bovis*. Сыворотка К+ТУБ давала на 3,8–9,5% более интенсивные реакции на антиген *M.tuberculosis*, чем на *M.bovis*. В свою очередь, К+БОВ на 9–40% интенсивнее реагировала на антиген *M. bovis*.

С учетом показателей контрольных проб установлено, что в крови туберкулин-положительных коров уровень антител к *M. bovis* у 88,9% особей составлял 45–103% (S/P 0,45–1,03) от показателя контрольной сыворотки крови коровы, больной туберкулезом (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты ИФА 349 проб крови туберкулинпозитивных коров из 13 МТК с подтверждением латентной туберкулезной инфекции в ПЦР

МТК	Положительные пробы (%)				
	S/P	Антитела, реакция интенсивнее			Антигены и ИК
		с <i>M. tuberculosis</i> , чем с <i>M. bovis</i>	с <i>M. bovis</i> , чем с <i>M. tuberculosis</i>	с <i>M. bovis</i> , чем с <i>M. fortuitum</i>	
Ч-е	36,4%	36,4%	63,6%	18,2%	63,6%
Р-о	57,1%	34,3%	65,7%	45,7%	68,6%
Ч-ое	100%	15,5%	84,5%	98,5%	69,4%
МСШ	100%	45,8%	54,2%	100%	37,5%
Б-а	100%	12,3%	87,7%	24,5%	89,8%
Р-и	97%	0	100%	84,9%	100%
К-и	88,5%	0	100%	80,8%	96,2 %
Г-ы	85,1%	15%	85%	34%	87,2%
О-ц ^х	100%	64,7%	35,3%	52,9%	29,4%
Н-и	91,4%	31,4%	57,1%	34,3%	22,9%
В-ы	100%	25%	75%	25%	25%
М-и ^х	100%	38,1%	52,4%	57,1%	23,8%
6–0	100%	22,2%	68,9%	24,4%	31,1%

Примечание – ^х на фермах работали животноводы, больные туберкулезом

При оценке специфичности антител оказалось, что в 8 стадах 45–100% проб крови коров интенсивнее реагировали на антиген *M. bovis*, чем на *M. fortuitum*, что указывало на инфицирование МБТ. В 5 стадах (38,5%) этот показатель был в пределах 18–34%, что свидетельствовало об инфицированности части животных НТМБ.

Сравнение интенсивности реакций на антигены *M. tuberculosis* и *M. bovis* показало, что пробы крови коров 12 стад (92,3%) чаще (в 52,4–100% случаев) интенсивнее реагировали с антигеном *M. bovis*. В стаде «О-ц» 64,7% проб дали выраженные реакции с *M. tuberculosis*. Это не было случайностью, при углубленном медицинском осмотре животноводов был выявлен источником инфекции – сторож, больной туберкулезом. Кроме того, в 5 стадах до 45,8% коров давали интенсивные реакции на антиген *M. tuberculosis*, при этом, на МТК «М-и» также был обнаружен животновод, больной туберкулезом.

Наличие в крови микобактериальных антигенов и их комплексов с антителами – важный показатель туберкулезной инфекции в стаде. Считается, что только МБТ, но не НТМБ, размножаются в организме хозяина и в крови могут появляться свободные и связанные с антителами антигены МБТ. Контрольные сыворотки коров, больных туберкулезом, снижали активность конъюгата пероксидазы с антителами к *M. bovis* на 55–73%, в то время как контрольная сыворотка крови барана, гипериммунизированного смесью антигенов НТМБ (в разведении 1:40), – только на 20–30%. В обследованных стадах положительные результаты теста были получены у 57,3% туберкулинпозитивных коров, причем в 4 стадах этот показатель превышал 80%. Необходимо отметить корреляцию количества животных с высоким уровнем антигенов в крови и интенсивностью реакций на антигены *M. tuberculosis* и *M. bovis*. В стадах, где было много туберкулинпозитивных коров, интенсивнее реагировавших на антиген *M. tuberculosis*, только у 22,9–37,5% особей был повышен уровень антигенов МБТ. В стадах, где преобладали реакции на антиген *M. bovis*, до 100 проб давали положительный результат теста.

В целом, результаты определения в ИФА уровня и специфичности антимиkobактериальных антител, микобактериальных антигенов указывали на то, что основной причиной реакций на туберкулин, было инфицирование коров *M. bovis*, а в ряде случаев *M. tuberculosis*. Используемые варианты ИФА оказались чувствительнее, чем ПЦР с кровью. Если с праймерами 16 sRNA (наличие в крови микобактериальной ДНК) реагировало 20–40% пулов крови и редко до 100% (рисунок 1), то только 12,5% этих пулов давали ПЦР с праймерами МРВ 70 *M. tuberculosis*-*M. bovis*, что подтверждало туберкулезную инфекцию в стаде (рисунок 2).

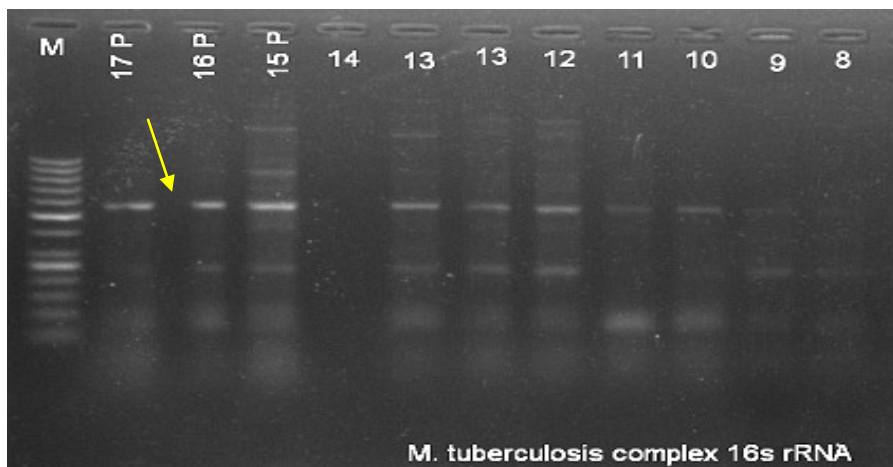


Рисунок 1 – Амплификаты пулов крови туберкулинпозитивных коров МТК «Г-ы». ПЦР с праймерами 16 sRNA *M.tuberculosis-M.bovis*. Стрелкой показано положение амплификата 543 bp 16 sRNA

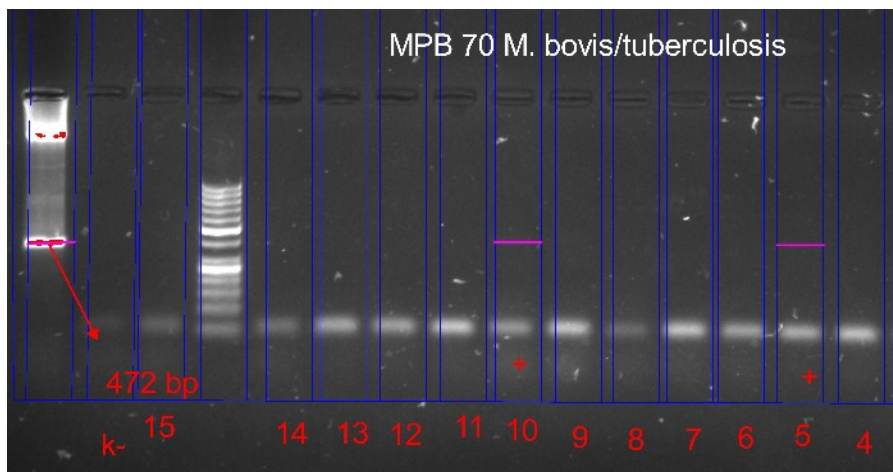


Рисунок 2 – Амплификаты пулов крови туберкулинпозитивных коров МТК «Г-ы». ПЦР с праймерами MPB 70 *M.tuberculosis-M.bovis*. Стрелкой показано положение амплификата 472 bp MPB 70

В 25–94,1% проб крови, посеянных на питательную среду Микофаст, были обнаружены как измененные формы МБТ, так и типичные рубиново-красные палочки (рисунок 3).

На вскрытии 24 туберкулинпозитивных коров туберкулезных изменений не обнаружено. Бактериологическое исследование лимфатических узлов на средах Гельберга и Левенштейна-Йенсена дало отрицательный результат. Вместе с тем, в мазках-отпечатках лимфатических узлов с помощью дифференцирующей иммунопероксидазной окраски были обнаружены специфически окрашенные коричневые и темно-коричневые клетки, связанные сетевидными структурами, коричневая зернистость. Встречались гранулемоподобные образования с рубиново-красной зернистостью (рисунок 4).

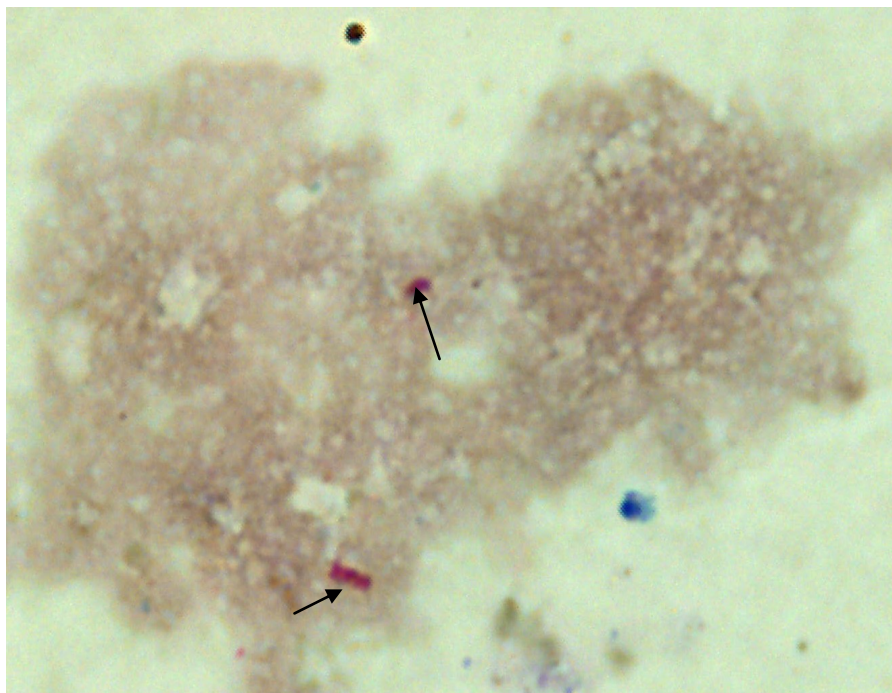


Рисунок 3 – Рост в посеве крови ПЦР+ коровы № 60543 МТК К-и на среде Микофаст. Видны 2 рубиново-красные палочки (стрелки) в сетевидной структуре. ИП окраска ПХ-Ig *M.bovis* - Kinyoun (10x100)

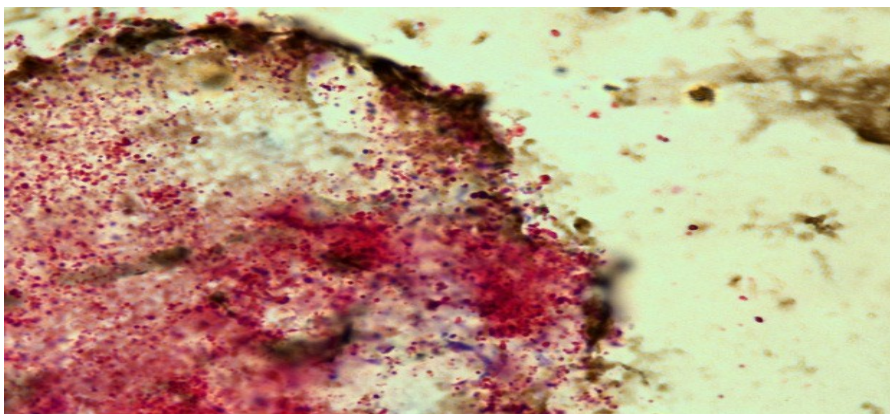


Рисунок 4 – Лимфатический узел туберкулинпозитивной коровы МТК «К-и». Гранулемоподобное образование с рубиново-красной зернистостью и темно-коричневым валом. ИП окраска ПХ-Ig *M.bovis* - Kin-youn (10x100)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первые попытки применения ИФА были направлены на определение уровня антител к комплексу антигенов *M.bovis* [12, 22, 24]. Действительно, у части инфицированных животных был повышен уровень антимикобактериальных антител, но значительная часть больных особей давала отрицательный результат. В дальнейшем это было объяснено интенсивным размножением возбудителя в организме и связыванием его антигенами образующихся антител [4, 5, 13, 21]. Кроме того, высокие титры антимикобактериальных антител обнаруживались у коров благополучных стад [4,12]. Тем не менее, определение уровня антител к комплексу антигенов *M.bovis* достаточно важный показатель, особенно, если в реакции используют негретые соникаты МБТ [5]. Этот показатель важен для оценки результатов определения в крови микобактериальных антигенов. Неблагоприятным признаком, указывающим на активную туберкулезную инфекцию, является низкий уровень антимикобактериальных антител при положительном результате определения антигенов [4].

Решением проблемы специфичности ИФА считали использование видоспецифических антигенов МБТ [4,15,16]. Действительно, с их помощью можно установить туберкулезную инфекцию в стаде [4,16,18]. Однако их чувствительность ограничена образованием иммунных комплексов у инфицированных особей и особенностями индивидуального гуморального иммунного ответа [1,4]. В известной степени, решить эту проблему можно путем одновременного исследования в ИФА крови с комплексами антигенов МБТ и НТМБ, так как присутствующие в их составе антигены, даже общеродовые, несут видоспецифические эпитопы [4, 15].

Это подтвердили результаты ИФА с контрольными сыворотками, которые интенсивнее реагировали с гомологичными антигенами, а в стадах с туберкулезной инфекцией 18–98,5% проб давали более интенсивные реакции с антигенами МБТ, чем с НТМБ. Различия в интенсивности реакций были отмечены даже на антигены *M.tuberculosis* и *M.bovis*. Если в стаде имело место инфицирование МБТ человеческого вида, то более интенсивные реакции отмечались на *M.tuberculosis*, что коррелирует и с результатами других авторов [9].

Определение в крови микобактериальных антигенов по снижению активности конъюгата пероксидазы и антител к *M.bovis* - важный тест для выявления туберкулезной инфекции [11, 13, 21, 23]. Необходимо отметить, что на его результаты могут влиять антимикобактериальные антитела, но это влияние не столь велико и существенное снижение активности конъюгата в сочетании с данными о низком уровне антител в пробе, четко указывает на туберкулезную инфекцию [2, 3].

Положительным результатом применения ИФА-диагностики можно считать возможность сохранения до 50 % туберкулинпозитивных животных с отрицательными результатами определения микобактериальных антигенов и с более интенсивными реакциями на антигены НТМБ. Проведенные наблюдения (данные не приведены) показали, что реакции на туберкулин у животных с такими показателями, выпадают в течение 6 месяцев.

Необходимо отметить, что результаты ИФА, полученные в других стадах (данные не приведены), нередко указывали на туберкулезную инфекцию при отрицательных результатах ПЦР. Вероятно, это было связано с ограничением чувствительности ПЦР с цельной кровью из-за наличия в ней ингибиторов. Кроме того, нами, в большинстве случаев, из крови были выделены трансформированные (измененные) МБТ, которые могли из-за мутаций, не иметь специфических участков генома, которые определяются праймерами MPB 70, MPT 64, IS 6110 [6].

В целом, полученные результаты указывают на то, что латентная туберкулезная инфекция встречается в стадах, которые по результатам послеубойного осмотра и традиционных методов бактериологической диагностики могут считаться благополучными. В этой связи, особенно, в крупных молочных комплексах, наряду с туберкулинодиагностикой, необходимо использовать ИФА диагностику с наборами для определения специфичности антимикобактериальных антител, микобактериальных антигенов и их комплексов с антителам.

ВЫВОДЫ

1 Применение набора для определения уровня и специфичности антимикобактериальных антител в непрямом ИФА с антигенами (негретые соникаты) *M.tuberculosis* H₃₇Rv, *M.bovis* 8, *M.fortuitum* 342 позволяет

выявить инфицирование микобактериями туберкулеза у 18–100% туберкулинпозитивных коров и с высокой вероятностью дифференцировать инфицирование животных *M.bovis* и *M.tuberculosis*.

2 Применение набора для определения в ИФА микобактериальных антигенов и иммунных комплексов показало их наличие в крови у 22,9–100% туберкулинпозитивных коров из стад с латентной туберкулезной инфекцией. В комплексе с данными об уровне и специфичности антител результаты теста позволяют подтвердить или исключить инфицирование животных микобактериями туберкулеза.

3 Результаты определения уровня и специфичности антител, микобактериальных антигенов, бактериологического посева крови реагирующих на туберкулин коров и ПЦР позволили доказать, что в условиях современных молочно-товарных комплексов у части животных может отмечаться скрытая туберкулезная инфекция, которую невозможно установить общепринятыми методами диагностики.

4 Для исключения угрозы возникновения активного заболевания на молочно-товарных комплексах, помимо убоя реагирующих на туберкулин коров, необходимо выяснять причины возникновения таких реакций путем исследования крови с применением современных методов серологической, бактериологической и молекулярно-генетической диагностики, что позволяет объективно оценить эпизоотическую обстановку и принять адекватные меры.

ЛИТЕРАТУРА

1 Авдиенко, В.Г., Бабаян, С.С., Гусева, А.Н. с соавт. Количественные, спектральные и серодиагностические характеристики антимиkobактериальных IgG-, IgM - и IgA- антител у больных туберкулезом легких // Пробл. туберкулеза. – 2006. – 10. – С. 47–55.

2 Архипов, И.Н. Серологические, бактериологические и молекулярно-генетические маркеры туберкулезной инфекции крупного рогатого скота: Автореф. дисс. ... канд. вет. н. – Минск, 2011.– 21с.

3 Лемиш, А.П. Ранняя диагностика туберкулеза крупного рогатого скота на основе выявления бактериологического маркера инфекции: Автореф. дисс. ... канд. вет. н. – Минск, 2008.–21с.

4 Лысенко, А.П. Антигены *Mycobacterium bovis* и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота: Автореф. дисс... д.вет.н. – Минск, 1994.– 35с.

5 Лысенко, А.П., Агеева, Т.Н., Карпова, Г.А., с соавт. Исследование сыворотки крови здоровых коров, больных туберкулезом и инфицированных атипичными микобактериями в перекрестном иммуноэлектрофорезе и иммуноферментном анализе // Ветеринарная наука - производству. Научные труды. – 1998.– вып.33. – С.37–47.

6 Мельникова, Н.Н. Бактериологическая диагностика туберкулеза внелегочных локализаций с исследованием L-трансформированных вариантов микобактерий: Автореф.дис. ...канд. мед. н. – Санкт – Петербург, 2007.–20 с.

7 Санитарные и Ветеринарно-санитарные правила по профилактике и ликвидации заболеваний, общих для человека и животных. Туберкулез. МСХП и МЗ РБ, утв. 26.03.2010 г., № 31/21.

8 Шаров, А. Н. Аллергическая диагностика туберкулеза у животных: повышение ее эффективности // Автореф. дис. докт. вет. наук. – М., 1989. – 29 с.

9 Яковлева, Л.Ф., Лысенко, А.П., Лемиш, А.П. с соавт. Реакции на туберкулин у коров и иммунный ответ на антигены возбудителя туберкулеза у животноводов // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – 3. – с. 20–23.

10 Adams, L.G. In vivo and in vitro diagnosis of *M. bovis* infection // Rev. sci. tech. int. Epiz. – 2001. – 20. – (1) – P. 304 – 324.

11 Attallah A., Abdel Malak C., Ismail H. et al. Rapid and simple detection of a *M. tuberculosis* circulating antigen in serum using dot-ELISA for field diagnosis of pulmonary tuberculosis // J. Immunoassay Immunochem. 2003. – 24. – 1. – P. 73–87.

12 Auer L. Assessment of ELISA for the detection of cattle infected with *M. bovis* // Austral. Vet. J. 1987, 64, 6, P. 172–176.

13 Bhattacharya A. et. al. Antibody based ELISA for determination of immune-complexes in clinical tuberculosis // Am. Rev. Resp. – 1986. – 134. – P. 205–209.

14 Castro C. et al. Development of a multiantigenic serological test for tuberculosis diagnosis // Biomedica. – 2005. – 1. 25. – P. 55– 64.

15 Fifis J., Rothel P., Wood S. Soluble *M. bovis* protein antigens: studies on their purification and immunological evaluation // Microbiol. – 1994. – 40. – P. 65–81.

16 Harboe M., Wiker H., Duncan R., et al. Protein G-based ELISA for anti-MPB 70 antibodies in bovine tuberculosis // J. Clin. Microbiol. 1990 – 28. – 5. – P. 913 – 921.

17 Houghton R., Lodes M., Dillon D. et al. Use of multiepitope polypeptides in serodiagnosis of active tuberculosis // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2002. – 9. – (4). – P. 883–891.

18 Lightbody K. et al. Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status // Vet Rec. – 1998. – 12. – 142. – P. 295–300.

19 Monaghan M., Kazda J., McGil K. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis // Vet. microbiology. – 1994. – 10. – P. 125 – 135.

20 Pearson C., Corner L., Lepper A. Tuberculin sensitivity of cattle inoculated with atypical mycobacteria isolated from cattle, feral pigs and trough water // Austral. Vet. J. – 1977. – 53. – 507 – 511.

21 Pereira Arias-Bouda L. et al. ELISA using immune complexes for the diagnosis of tuberculosis // J. Immunol. Methods. – 2003. – 1– 2. – № 283. – P. 115–124.

22 Ritacco V., de Kantor I., Barrera L., et al. Assessment of sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis // J. Vet. Med. – 1987. – B. – 34. – P. 119–125.

23 Simonney N., Bourrillon A., Lagrange P. Analysis of circulating immune complexes in childhood tuberculosis: levels of specific antibodies to glycolipid antigens and relationship with serum antibodies // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2000. – 2. – 4. – P. 152–160.

24 Thoen C., Hall M. Application of modified ELISA for detecting mycobacterial antibodies in sera of cattle from a herd in which *M. bovis* infection was diagnosed // In Proc. Ann. Meet. of the US Animal Health Assoc., Las Vegas, Nevada. – 1983. – P. 603–608.

Марущак Л.В., младший научный сотрудник
Неволько О.М., кандидат ветеринарных наук

Государственный научно-исследовательский институт по лабораторной диагностике и ветеринарно-санитарной экспертизе, г. Киев

РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ И ОПТИМИЗАЦИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КУ-ЛИХОРАДКИ

ВВЕДЕНИЕ

Ку-лихорадка занимает первое место в группе зоонозных риккетсиозов, являясь наиболее распространенным эндемическим риккетсиозом в мире [3,5]. Такая распространённость обусловлена тем, что многие виды диких грызунов, а также паразитирующие на них клещи могут образовывать собственные резервуары возбудителя Ку-лихорадки, в биоцинозе которых происходит циркуляция вирулентного возбудителя по замкнутому циклу [1,2,3].

Диагностика Ку-лихорадки в Украине базируется на серологических методах исследования, однако они указывают лишь косвенную очевидность инфицирования и могут диагностировать болезнь на поздних стадиях заражения и при проявлениях клинических признаков. Серонегативный результат у животных не гарантирует того, что животное не было инфицировано [12].

Метод иммуноферментного анализа (ИФА) позволяет провести исследование большого количества образцов от животных или стада, но не позволяет провести индивидуальную идентификацию животных, которые выделяют *C. burnetii* в окружающую среду с калом, молоком и вагинальными выделениями. Большинство животных, которые выделяют *C. burnetii* с вагинальной слизью, калом или молоком могут быть как серопозитивными так и серонегативными [7]. Учет этих фактов важен для постановки правильного диагноза и молекулярно-генетические методы исследования в настоящее время являются высоко эффективными в лабораторной диагностике для выявления животных, которые выделяют возбудитель Ку-лихорадки.

Молекулярно-биологические методы для определения *C. burnetii* имеют ряд преимуществ: большая чувствительность и специфичность, короткий промежуток времени, необходимый для получения результата, отсутствие повышенных требований по биозащите лаборатории, возможность диагностики на ранних сроках заболевания и возможность выявления *C. burnetii* в материале от животного в случае гибели [6].

В настоящее время полимеразная цепная реакция широко используются для выявления *C.burnetii* в странах Евросоюза (Duquesne et al., 2008, EFSA questionnaire). Сравнительные анализы испытаний с участием 7 лабораторий стран Евросоюза, которые проводили выделение ДНК *C. burnetii* из разного биологического материала (плацента, молоко), показали, что уровень специфичности сравним с выделением ДНК *C. burnetii* из образцов, взятых от абортированного плода или от животных, которые позитивны на Ку-лихорадку (Duquesne et al., 2008; Jones et al., 2009).

Потребность в разработке отечественного диагностического набора объясняется тем, что Ку-лихорадка распространена в 17 областях Украины среди людей (по данным специалистов Львовского НИИЭГ), а по результатам исследования ГНИИЛДВСЭ за период 2008 – 2011 г. 722 пробы сывороток крови от домашних животных (26,7%) проб были серопозитивными [4,9]. Эти результаты указывают на циркуляцию возбудителя на территории Украины и требуют более глубоких эпидемиологических и эпизоотологических исследований. Целесообразно провести эколого-эпидемиологические исследования для изучения степени инфицированности возможных носителей с помощью молекулярно-генетических методов, которые имеют большое значение для оценки распространения Ку-лихорадки.

Цель работы – разработать систему ПЦР для обнаружения и идентификации ДНК *C.burnetii* – возбудителя Ку-лихорадки с помощью полимеразной цепной реакции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была проведена в научно-исследовательском отделе молекулярно-генетических методов исследований ГНИИЛДВСЭ.

Для проверки специфичности праймеров был использован ПЦР позитивный референс-контроль, сертификат № 5131, разработанный Genekam Biotechnology AG, Германия. Для контроля так же использовали коммерческий набор «Coxiella Burnetii Real Time», FR002, разработанный Genekam Biotechnology AG.

Поиск нуклеотидных последовательностей проводили по базам данных GeneBank – Национального института здоровья США.

Для выявления и идентификации *C.burnetii* были рассчитаны оригинальные нуклеотидные последовательности (праймеры), которые комплементарны консервативной области гена *comI*, который кодирует высококонсервативный белок наружной мембраны 27kDa возбудителя Ку-лихорадки (ATCC AB004712).

Анализ выбранных нуклеотидных последовательностей на вариабельность и поиск консервативных участков, необходимых для выбора праймеров проводили с помощью программы „Vector NTI Advanced v.11” (Invitrogen, США).

Праймеры были синтезированы в ЗАО «Синтол» (г. Москва).

Выделение ДНК проводили при помощи набора реактивов «High Pure PCR Template Preparation Kit» (Roche Diagnostics, Германия). Полимеразную цепную реакцию выполняли с помощью реактивов «АмплиСенс», Россия: «АмплиСенс – 200 – 1». Постановку ПЦР осуществляли на амплификаторе «Mastercycler ep gradients Eppendorf AG», Eppendorf (Германия) и «Rotor Gene – 3000», Corbett Research (Австралия) согласно инструкции по его применению.

Концентрацию ДНК *C.burnetii* определяли на спектрофотометре «BioPhotometr» Eppendorf, Германия.

Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с интеркалятором – бромидом этидия. Результаты электрофореза учитывали визуально на транслюминаторе под УФ-светом с наличием или отсутствием фрагментов ДНК определенного размера. Специфичность амплицированного фрагмента определяли по его размеру (положению) в отношении маркера «100 bp DNA Ladder», Fermentas (г. Латвия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для расчета праймеров и конструирования системы детекции *C.burnetii* в ПЦР использовали зарегистрированные в GenBank следующие нуклеотидные последовательности геномов изолятов *C.burnetii* для гена *comI* (рис.1) (ATCC: AB004693, AB004694, AB004695; AB004696, AB004697, AB004698, AB004699, AB004700; AB004701, AB004702, AB004703, AB004704, AB004705; AB004706, AB004707, AB004708, AB004709, AB004710; AB004711, AB004712 [11]; AF317646; AF317647; AF318145; AF318146; AF318147; AF318148; AF318149; M88613 [8].

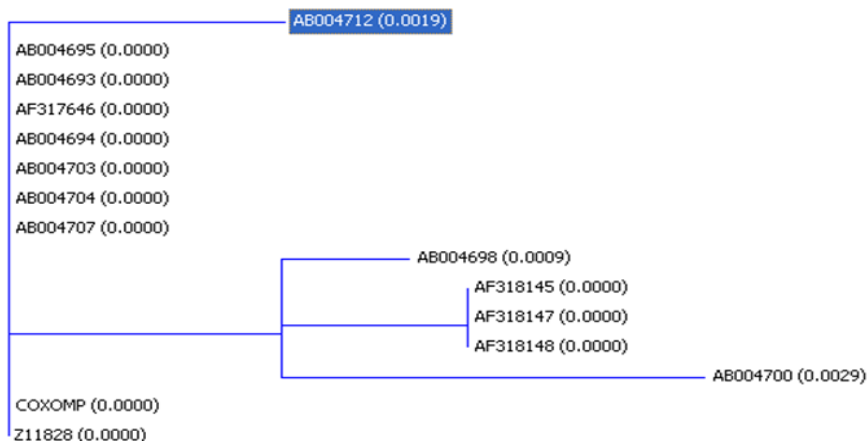


Рисунок 1 – Нуклеотидные последовательности геномов изолятов *C.burnetii*

Позиции праймеров CoxF2 и CoxR4, которые были использованы для разработки системы детекции, специфичны консервативной области гена *Com 1* (рисунок 1), который кодирует высококонсервативный белок наружной мембраны 27kDa возбудителя Ку-лихорадки. Специфичность олигонуклеотидных праймеров учитывает различия нуклеотидного состава гена *Com 1* возбудителя ку-лихорадки *C.burnetii* разных генотипов. Эндонуклеаза *Eco RI* используется для рестрикционного анализа данного участка гена *Com 1*.

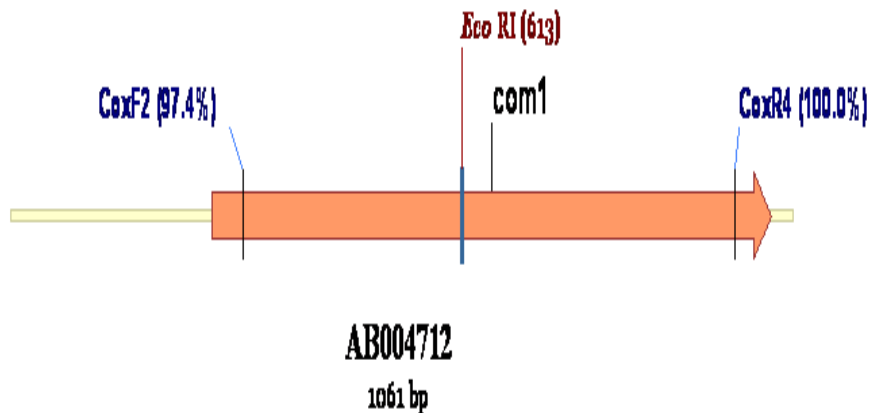


Рисунок 2 – Позиции праймеров CoxF2 и CoxR4 на последовательности гена *com1* *C.burnetii* изолята AB004712

При помощи программы „Vector NTI Advanced v.11” был проведен компьютерный дизайн нуклеотидных последовательностей (праймеров) для проведения ПЦР(таблица 1).

Таблица 1 – Основные параметры сконструированных праймеров

Праймер	Последовательность(5'→3')	Температура плавления, °C	GC, %
CoxF2	ACYGCAGGCGTGGCGATAG	58,4	65,8
CoxR4	TGAAGGTTTTGTTGTGAGGTGGC	57,7	48,7

Примечание – Y=C/T

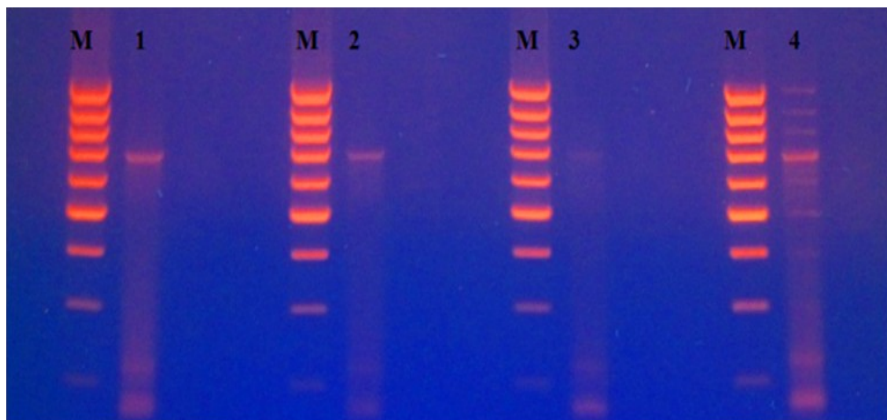
Праймеры обеспечивают синтез фрагмента ДНК размером 689 н.з.

Объем реагентов входящий в реакцию смесь для проведения ПЦР, представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Реакционная смесь для ПЦР

п/п	Реактив	1 х на 1 реакцию (мкл)
1	Смесь нуклеотидтрифосфатов, 1,76 мМ (dNTP-mix)	1
2	Праймер СоxF2 (100 пкмоль/мкл)	0,25
3	Праймер СоxR4 (100 пкмоль/мкл)	0,25
4	5-кратный ПЦР- буфер с 15мМ Mg ²	5
5	DiaTaq-полимераза 5 од/мкл	0,5
6	Стерильная Н ₂ O, свободная от нуклеаз, для ПЦР	15
	ДНК	3
	Общий объем	25

Оптимизация условий проведения ПЦР была проведена по следующим показателям: сравнительный анализ температуры отжига праймеров (рисунок 3), подбор оптимальной концентрации праймеров, ионов магния и полимеразы.



Примечание – М – маркер „100 bp DNA Ladder” (Fermentas); 1,2,3,4,5 – ПЦР позитивный референс-контроль, 1 – температура отжига праймеров 60°C, концентрация ионов магния 1,5 мМ; 2 – температура отжига праймеров 62°C, концентрация ионов магния 1,5 мМ; 3 – температура отжига праймеров 64°C, концентрация ионов магния 1,5 мМ; 4 – температура отжига праймеров 65°C, концентрация ионов магния 1,5 мМ.

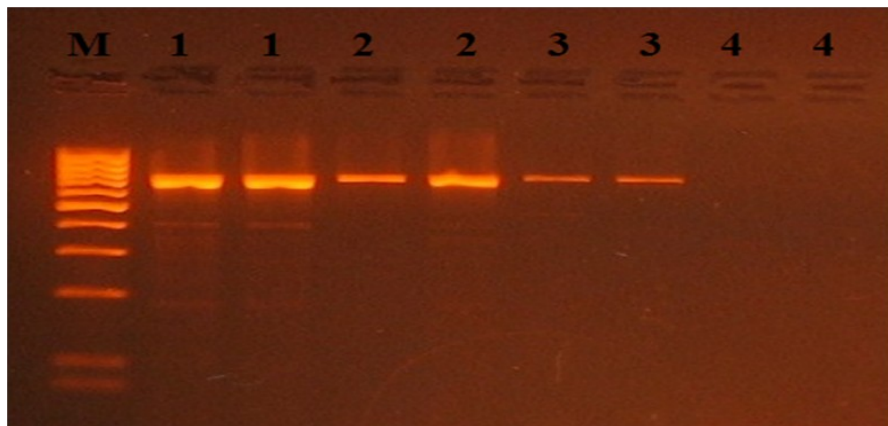
Рисунок 3 – Учет ПЦР в 1,5% электрофоретическом геле

Термопрофиль реакции амплификации для пары праймеров СоxF2/СоxR4 представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Программа для амплификации ДНК *C.burnetii*

Цикл	Температура	Время	Количество циклов
1	95° C	4 мин	1
2	94° C	0,3 сек	35
	60° C	0,3 сек	
	72° C	0,3 сек	
3	72° C	4 мин	1
4	10° C	хранение	

Чувствительность данной системы определяли по анализу образцов ДНК, содержащих разное количество генетического материала возбудителя. Сначала определяли концентрацию исходного ДНК на спектрофотометре Bio Photometr Eppendorf, Германия. Она составила 34 нг/мкл. Далее готовили серию последовательных десятикратных разведений (рисунок 4). Было определено, что система ПЦР позволяет гарантированно обнаруживать до 1,8 нг ДНК *C.burnetii*. Оптимальный диапазон для внесения 3 – 10 нг.



Примечание – М - маркер „100 bp DNA Ladder” (Fermentas); 1 – ДНК *C.burnetii* с концентрацией 34 нг; 2 – ДНК *C.burnetii* с концентрацией 3,4 нг; 3 – ДНК *C.burnetii* с концентрацией 0,34 нг; 4 – ДНК *C.burnetii* с концентрацией 0,034 нг.

Рисунок 4 – Учет ПЦР в 1,5% электрофоретическом геле для проверки чувствительности

ВЫВОДЫ

1 Рассчитаны оригинальные нуклеотидные последовательности (праймеры) *SoxF2* и *SoxR4*, которые комплементарны консервативной области гена *com1* для выявления и идентификации *C.burnetii*.

2 Подобраны и оптимизированы условия и параметры постановки ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в 1,5% агарозном геле для обнаружения ДНК *C.burnetii* возбудителя ку-лихорадки.

3 Сконструированная система ПЦР для обнаружения ДНК *C.burnetii* – является высокоспецифической и чувствительной.

ЛИТЕРАТУРА

1 Дайтер, А.Б. Эпидемиология лихорадки Ку / Дайтер А.Б., Тарасевич И.В., Ржегачек И. // Риккетсиозы. Сб. научн. трудов (Труды ин-та им. Пастера). – Л., 1989. – Т. 66. – С. 5 – 36.

2 Здродовский, П.Ф. Учение о риккетсиях и риккетсиозах/ Здродовский П.Ф., Голиневич Е.М. // Москва, 1972. – Изд. 3-е. – С. 496.

3 Лобан К.М. Риккетсиозы человека /К.М., Лобзин Ю.В., Лукин Е.П.// Руководство для врачей. – Москва – Санкт-Петербург, 2002. – С. 475.

4 Марущак Э, Л.В. Изучение распространения ку-лихорадки на территории Одесской области/ Марущак Л.В.// Ветеринарная медицина. Межведомственный тематический научный сборник. – Харьков, 2012 – Выпуск № 96 – С.32.

5 Самуйленко, А.Я. Инфекционная патология животных. /Под ред. А.Я.Самуйленко, Б.В.Соловьева, Е.А.Непоклонова, Е.С.Воронина // М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т.2. – С. 807.

6 Berri, M. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction / Berri M, Laroucau K and Rodolakis A. // Veterinary Microbiology, – 2000. – N72(3-4) – P. 285– 293.

7 Berri, M. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep / Berri M., Souriau A., Crosby M., Crochet D., Lechopier P., Rodolakis A. // Vet. Rec. – 2001. – N148. – P. 502–505.

8 Hendrix, L.R Cloning and sequencing of *Coxiella burnetii* outer membrane protein gene *com1*/ Hendrix L.R, Mallavia L.P, Samuel J.E. // Infect. Immun. – 1993. – N61 – P. 470.

9 Marushchak, L. Q-fever: epizootic situation and laboratory diagnostics. / Marushchak L, Nevolko O, Volosianko O, Drozhzhe Z.//The 93 rd Annual Meeting of the CRWAD, Emerging and Re-Emerging Zoonotic Pathogens, Chicago, Illinois. – 2012.

10 Zhang, G. Q. Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples./ Zhang G. Q., Nguyen, S. V., To, H., Ogawa, M., Hotta, A., Yamaguchi, T., Kim, H. J., Fukushi, H., and Hirai, K J. // Clin Microbiol. – 1998 – N 36– P.77 – 80.

11 Zhang, G.Q. Differentiation of *Coxiella burnetii* by sequence analysis of the gene (*com1*) encoding a 27-kDa outer membrane protein / Zhang G.Q, To H, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K. // Microbiol Immunol. – 1997. – N41. – P.871.

12 Scientific Opinion on Q fever. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Chapter on Food Safety, European Food Safety Authority (EFSA) // EFSA Journal. – Parma, Italy. – 2010. –N.8 (5):1595. –P – 13.

Ситюк Н.П., кандидат ветеринарных наук

Ничик С. А., доктор ветеринарных наук, профессор

«Институт ветеринарной медицины НААН Украины», Киев

РАЗРАБОТКА И ИСПЫТАНИЕ ПРИЖИЗНЕННОГО СПОСОБА ОТБОРА СЛЮНЫ ОТ ДИКИХ КАБАНОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ

ВВЕДЕНИЕ

Традиционно отбор биологического материала от диких кабанов для вирусологических и бактериологических исследований проводится по-смертно после отстрела животных. Такой способ является эффективным, поскольку позволяет во время вскрытия животных оценить патологоанатомические изменения и полноценно отобрать фрагменты различных органов. Однако этот способ имеет недостатки: требует определенных затрат на проведение организации самого отстрела, и главное, приводит к утрате биологической единицы, особенно тогда, когда экологическая ниша не наполнена достаточным количеством тех или других видов животных. Также процесс отстрела способствует распутиванию диких свиней, что является предпосылкой до заноса возбудителей особо опасных инфекций африканкой и классической чумы свиней на новые территории.

На сегодняшний день на территории Восточной Европы регистрируется такое особо опасное трансграничное заболевание, как африканская чума свиней (АЧС), нозоареал которой постоянно расширяется на территории России и за ее пределами (Украина 2012 г., Беларусь 2013 г.) и одним из наиболее опасных путей распространения вируса являются миграция диких кабанов-вирусоносителей.

Кроме существующего классического посмертного способа отбора биологического материала от диких кабанов исследователи [1] предложили, так называемый бесконтактный метод отбора слюны у дикого кабана с целью мониторинга АЧС. Авторы в эксперименте на домашних свиньях (после заражения вирусом АЧС) отработали методику выявления ДНК вируса в слюне методом ПЦР. С учетом этого разработчики в эксперименте на диких кабанах апробировали бесконтактный способ отбора их слюны, где в качестве адсорбирующего элемента применяли образцы жгутов из синтетического материала и натуральных волокон (хлопок, лён), которые обрабатывали различными приманками (вкусовыми добавками): глюкоза, растительное масло, водный экстракт комбикорма, мёд, селёдочный рассол. В этих опытах было показано, что дикие кабаны в большинстве случаев охотно подходят к жгутам, пропитанных селёдочным рассолом, оставляя при жевании слюну. По результатам этих исследований авторы рекомендуют данный

метод использовать в целях диагностики АЧС.

Целью нашей работы было разработать и испытать несколько иной прижизненный способ отбора слюны от диких кабанов с применением других материалов и приманок, а также молекулярно-генетически доказать ее принадлежность слюны к диким кабанам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор материала для содержания приманок основывался на принципе подбора ткани из хлопка и грубой натуральной ткани (мешковины), которые хорошо поглощают влагу, а последняя из них устойчивая к разрывам.

Были взяты ткани серого цвета: мешковина, в состав которой входили волокна растений (джуты, канатника, конопли), и ткань из хлопка. Из этих тканей были изготовлены мешочки шириной 30 см и высотой 50 см. Всего было изготовлено 18 мешочков: 9 – из мешковины и 9 – из ткани хлопка.

Согласно литературным данным, в качестве приманок использовали те корма, которые лучше всего употребляются кабаном – желудки и зерно кукурузы. Кукурузу в качестве приманок использовали в сухом виде и также подвергали брожению. Согласно данным Michael J. Bodenchuk (Wild Life Sevices, г. Сан Антонио, штат Техас, США) кукурузу, которая подвергалась брожению, не едят другие парнокопытные животные (лось, олень, косуля). Кукурузу подвергали брожению путем увлажнения водой при температуре +18–+20 °C на протяжении семи суток.

Проведение опыта по испытанию способа отбора слюны от диких кабанов согласовывали с главой Государственной ветеринарной и фитосанитарной службы Украины, письмо № 15–9–1–18/414 от 17.01.2013 года, и начальником Главного управления ветеринарной медицины в Киевской области, письмо № 01–04/141 от 31.01.2013 года. Опыты проводили на территории лесохозяйственных угодий Броварского района Киевской области. Опыты в течение 2013 года были проведены дважды с целью его апробации в различные сезоны года (зимой и летом).

В первом опыте было использовано 9 мешочков изготовленных из ткани хлопка. Три мешочка были с желудками (по 3 кг в каждом), три – с сухим зерном кукурузы и три – с зерном кукурузы, которую подвергали брожению (по 4,5 кг в каждом). Приманки крепили на деревьях (сосны, березы) в глубине леса на расстоянии 150 – 200 метров от лесных дорог и просек. Приманки фиксировали на высоте от поверхности земли 0,5 – 0,6 метра путем крепления верхней части мешочков саморезами через алюминиевые пластины (4 – 5 саморезов на один мешочек). Использование саморезов и алюминиевых пластин способствовало надежной фиксации мешочков и исключало их срыв при съедании приманок кабаном. Место расположения приманок учитывалось с биологическими особенностями условий питания стада диких свиней. При этом мешочки фиксировали на деревьях (на каждое дерево один мешочек) таким образом, что бы все они находились не-

далеко друг от друга в диаметре 10 – 15 метров.

Во втором опыте также было использовано 9 мешочков, однако материалом для их изготовления была мешковина, которая была более прочной, и более прочной к разрывам в сравнении с хлопковой тканью, использованной в первом опыте. Выбор места и характер проведения второго опыта были идентичны первому опыту.

В опытах после поедания приманок ножницами отрезали те части ткани, где был наиболее визуально заметен её контакт с ротовой полостью животных. Из каждого мешочка отбирали по 2 образца ткани размером от 1,0 до 3,0 см. Каждый образец ткани помещали в стерильную пластиковую посуду (пробирки, флаконы), соответственно маркировали и помещали в термосумку с хладагентом. После отбора образцов остатки мешочков были сняты с деревьев. Отобранные образцы доставляли в лабораторию болезней свиней и биотехнологии ИВМ НААН Украины, и хранили при температуре –20 °С.

Видовую идентификацию биологического материала (слюны) в отобранных образцах проводили при помощи анализа митохондриальной ДНК в отделе селекции и генетики Института свиноводства и агропромышленного производства Национальной академии аграрных наук Украины. При этом использовали аппаратуру для постановки полимеразной цепной реакции и специфические олигонуклеотидные праймеры – прямой MITPRO2F: CATACAAATATgTgACCCCAAA и обратный MITPROR: gTgAgCATgggCTgATTAgtC [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Первый опыт был проведен в зимний период с 09.02 по 17.02, а второй – в летний период с 09.06 по 21.06.2013 года.

В первом опыте после размещения приманок на протяжении пяти суток ежедневного наблюдения поедания не наблюдалось. Лишь на шестые сутки были зарегистрированы характерные для кабана следы подхода к приманкам, и они были съедены в течение 2-х суток. Детальный осмотр места проведения опыта свидетельствовал о достаточно легком доступе к их содержимому, поскольку хлопковая ткань была разорвана без признаков ее жевания.

Во втором опыте после размещения приманок в течение семи суток при ежедневном наблюдении не было отмечено их поедания. Только на восьмые сутки был зарегистрирован подход кабанов к приманкам и поедание их на протяжении 4-х суток. Тщательное обследование места проведения опыта, свидетельствовало о сравнительно трудном доступе кабанов к их содержимому, поскольку ткани на всех мешочках были изжеваны с наличием одного или нескольких (2 – 3) разрывов в виде полос длиной от 5 до 12 см или отверстия размером от куриного яйца до головы ребенка. Ткань в местах жевания была похожа на сильно взъерошенную массу, волокна которой неравномерно переплетались в разных направлениях.

Отобранные образцы тканей были переданы в лабораторию селекции и генетики Института свиноводства и агропромышленного производства, где видовую идентификацию биологического материала (слюны) в приманках проводили при помощи анализа митохондриальной ДНК.

Таблица – Результаты исследования образцов тканей приманок методом ПЦР на наличие митохондриальной ДНК диких кабанов

Количество исследованных образцов ткани	Результаты исследований	
	положительных	отрицательных
9	3	6

Установлено, что в шести образцах тканей из девяти исследованных была выявлена митохондриальная ДНК, характерная для вида дикого кабана. Результаты постановки ПЦР в электрофореграмме представлены на рисунке 1.

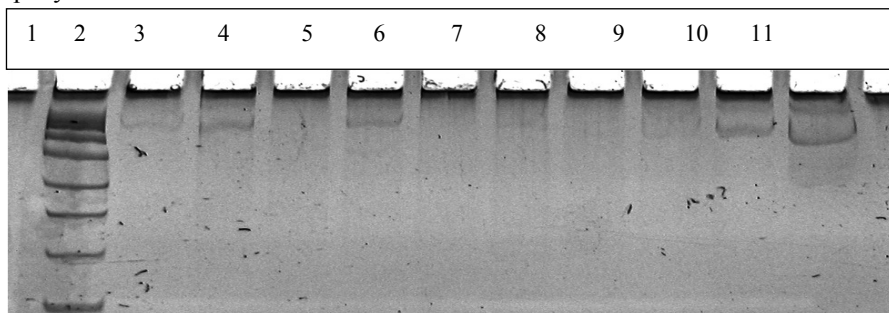


Рисунок 1 – Электрофореграмма разделения продуктов амплификации митохондриальной ДНК диких кабанов в образцах тканей приманок

Примечание – дорожки 2,3,5,7,9,10 – образцы, где присутствует биологический материал специфический для кабанов; дорожки 4,6,8 - образцы, где биологический материал специфический для кабанов отсутствует; дорожка 11 – контрольный образец (митохондриальная ДНК свиньи); дорожка 1 – маркер размера ДНК pUC19/MspI

Следует отметить тот факт, что проведенные опыты по способу прижизненного отбора слюны от диких кабанов дали положительный результат. Дикие кабаны, как в зимний, так и летний периоды отыскивали места расположения приманок и в течение нескольких дней съедали их содержимое. В процессе поедания приманок животные разжевывая и разрывая ткани мешочков оставляли слюну, в которой, по-видимому, держался отторгнутый эпителий ротовой полости и эпителий кожи рыла. Мы полагаем, что именно митохондриальная ДНК клеток эпителиальных клеток была выявлена при постановке ПЦР анализа. Таким образом, следует отметить, что

предложенный нами прижизненный способ получения слюны от диких кабанов с использованием приманок является эффективным. Предыдущий опыт российских исследователей [1], которые в качестве приманок использовали жгуты, пропитанные селедочным рассолом, также показал свою эффективность. При разработке метода прижизненного отбора слюны от диких кабанов с помощью приманок мы исходили из естественных биологических особенностей питания этих животных, выбрав при этом предпочитаемые ими корма – желуди и кукурузу. Зная, что кабаны как и домашние свиньи всеядные животные, мы не стали использовать в наших опытах приманки в виде селедочного рассола или мясного сока с целью исключить привлечения плотоядных животных (лисы, одичавшие собаки и др.).

Применение разработанного способа отбора слюны от диких кабанов в качестве мониторинговых исследований по африканской чуме свиней имеет основание, так как возбудитель этой инфекции способен в процессе заболевания выделяться со всеми секретами и экскретами из организма больных животных и вирусоносителей. Доказательством этого являются данные [1] выделения вируса АЧС при экспериментальном заражении домашней свиньи и передаче его со слюной в приманку. Мы, конечно же, не проводили исследований по детекции вируса АЧС в приманках, но учитывая опыт российских коллег можно утверждать, что этот способ может быть эффективным при мониторинговых исследованиях диких кабанов в отношении АЧС.

ВЫВОДЫ

Разработан и испытан способ прижизненного отбора слюны от диких кабанов с применением тканевых мешочков с содержанием приманок (желуди, зерно кукурузы).

Методом полимеразной цепной реакции выявлено наличие митохондриальной ДНК в составе ткани приманок, характерной для дикого кабана.

В перспективе дальнейших научных исследований необходимо испытать данный способ получения образцов слюны от диких кабанов в неблагополучных зонах по африканской чуме свиней с целью мониторинговых диагностических исследований.

Автор статьи выражает глубочайшую благодарность заведующему отдела селекции и генетики Института свиноводства и агропромышленного производства НААН Украины Почерняеву К.Ф. и сотрудникам в помощи проведения молекулярно-генетических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1 Бесконтактный метод отбора слюны у дикого кабана при африканской чуме свиней / А.Ю. Чичикин, И.Х. Газаев, С.Ж. Цыбанов, Д.В. Колбасов // Ветеринария. – 2012. – № 6. – С. 26 – 28.

2 Почерняев К.Ф. Визначення гаплотипів свиней з використанням методу породоспецифічного ПЛР-ПДРФ мітохондріальної ДНК // Ветеринарна біотехнологія. – 2005. – №6. – С.138 – 143.

Лемиш А. П., кандидат ветеринарных наук
Красникова Е.Л., научный сотрудник
Великий С. В., младший научный сотрудник
Рубникович Т.П., научный сотрудник*

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

*УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПЦР- ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОМА ВОЗБУДИТЕЛЯ НЕКРОБАКТЕРИОЗА (*FUSOBACTERIUM NECROPHORUM*)

ВВЕДЕНИЕ

В Республике Беларусь заболевания дистальных частей конечностей гнойно-воспалительного характера, приводящие к гибели крупного рогатого скота, диагностируются в 5% случаев, однако непроизводственное выбытие животных по этой причине, может достигать до 70–75% [3].

Заболевание конечностей, особенно у молочных коров, представляет серьезную проблему для многих ферм на протяжении последних 30–40 лет. По данным зарубежных исследователей в современных условиях хромота встречается почти во всех молочных фермах от 5 до 80%. Многие исследователи отмечают, что 75–90% всех зарегистрированных повреждений ног у коров может быть связано с изменениями, расположенными в области копытцев, чаще на задних конечностях (85–90%) и, прежде всего, на латеральном (боковом) копытке [1, 7].

Часто ведущую роль в развитии такого патологического процесса играет *Fusobacterium necrophorum* – грамотрицательный, неподвижный, строго анаэробный, полиморфный не образующий спор и капсул, условно-патогенный микроорганизм размером от 0,7–1,0 до 100–300 мкм. Наряду с другими микроорганизмами жвачных животных формирует микробиоценоз рубца. Известно 4 биотипа возбудителя: А, В, АВ, С, из которых А и В наиболее патогенные [2].

Заболевание опасно как для человека, так и для животных и характеризуется гнойно-некротическими поражениями дистальных частей конечностей, кожного покрова тела и подлежащих тканей, слизистых оболочек пищеварительного тракта, а также внутренних органов: печени, легких, половых органов и др. [4, 5, 6]

Основными факторами **эндогенного** возникновения инфекции является ослабленный иммунитет и наличие глубоких травм конечностей с узким наружным каналом. Такое сочетание приводит к формирова-

анаэробных условий в ране и созданию благоприятной среды для развития *Fuzobacterium necrophorum*.

В гнойно-некротическом очаге воспаления присутствует разнообразная облигатно-факультативная анаэробная и аэробная микрофлора: *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Veillonella*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Leuconostoc*, *E. Coli*, в некоторых случаях *Salmonella*, *Bacillus*.

Столь сложная микробная ассоциация объясняется тем, что каждая из бактерий в процессе своей жизнедеятельности создает условия для жизни других бактерий, создавая очаг воспаления и защищаясь, таким образом, от излишнего влияния кислорода и иммунной системы организма, в то же время усложняя установление первопричины инфекции [3].

Диагноз на некробактериоз ставится комплексно с учетом эпизоотологических данных, клинических, патологоанатомических признаков и результатов лабораторных исследований [8].

В настоящее время основой лабораторной диагностики некробактериоза крупного и мелкого рогатого скота является бактериологическое исследование, экспресс - метод в кровякапельной реакции с использованием эритроцитарного некробактериозного диагностикума и проведение биопробы на лабораторных животных.

Диагностика некробактериоза – сложный и длительный процесс, т.к.

- отбор проб и постановка диагноза путем проведения бактериологических исследований требует наличия специального оборудования или сред для создания анаэробных условий – возбудитель – не спорообразующий облигатный анаэроб;

- наличие сопутствующей микрофлоры в очаге поражения, представленной как аэробными микроорганизмами, так и факультативными анаэробами (стафилококки, стрептококки, микрококки, кишечная палочка, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus* и др.) значительно затрудняет выделение чистой культуры *Fuzobacterium necrophorum*;

- при постановке биопробы следует учитывать, что лабораторные животные (кролики, белые мыши), наряду с возбудителем некробактериоза, чувствительны и к сопутствующей микрофлоре, что усложняет постановку окончательного диагноза.

В целом на постановку диагноза затрачивается 12–16 суток. В случае значительного обсеменения биологических образцов сопутствующей микрофлорой это время увеличивается на 6–10 дней [8].

Наиболее информативной структурой, характеризующей вид микроорганизмов, является его геном. В этой связи проведение генотипирования с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) является наиболее перспективным [4]. Метод позволяет обнаружить в исследуемом образце последовательность ДНК, характерную только для искомого возбудителя.

При этом метод отличается оперативностью и диагностирование можно осуществить на протяжении нескольких часов.

Целью наших исследований являлась оценка специфичности разработанной на базе РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского тест-системы по выявлению генома возбудителя некробактериоза (*Fuzobakterium necrophorum*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструирование праймеров специфичных для *Fuzobakterium necrophorum* проводили 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 и с помощью программы Vector NTI и BLAST on-line (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast).

В качестве исследуемых образцов использовали следующие штаммы микроорганизмов: *Fuzobakterium necrophorum* subsp. *necrophorum* ATCC 25286, *Pasterella muloicida* серовариант D КМИЭВ В-165, *Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC 27088, *Mycoplasma hyopneumoniae* КМИЭВ – 42, *Bordetella bronchiseptica*– КМИЭВ В-120.

В работе были использованы следующие реактивы:

- 10x PCR буфер для Таг ДНК-полимеразы (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»)
- 10x ТЕ-буфер pH 8,0 (SIGMA);
- ТАЕ: 0,04М трис ацетат, 0,002М ЭДТА;
- маркер молекулярного веса «GeneRuler 50 bp Ladder» (Fermentas, Литва);
- термостабильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза, 5 ед/мкл) (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»);
- раствор MgCl₂ (50 mM);
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (25 mM) (Fermentas, Литва).
- праймеры общие для определения принадлежности к *Fuzobakterium necrophorum*;
- агароза (helicon, Россия);
- буфер для нанесения проб;
- бромистый этидий (SIGMA, США);
- стерильная деионизированная вода.

Приборы и оборудование

- микротермостат «BIOSAN-CH100» (Латвия);
- амплификатор «С 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США);

- персональный компьютер (Windows XP, 2 GHz, 512 Mb RAM, 80 Gb HDD, CD-RW, USB 2.0, мышь);
- микроцентрифуга высокоскоростная (14 000 об/мин) Joupan (Франция);
- комплект автоматических пипеток «SOCOREX» (Швейцария), вместимостью 0,1–2 мкл, 0,510 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 1–10 мл и наконечники к ним (с фильтрами и без фильтров);
- вортекс «BIOSAN» (Латвия);
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл для прибора «С 1000 Thermal Cycler»;
- система для электрофореза «Consort», (Бельгия);
- Gel Doc XR и программа imageLab Software, BIO-RAD (США);
- термостат SEL LAB (Германия)
- система подготовки чистой воды «Crystal В», ADRONA (Латвия)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разрабатываемую ПЦР систему подвергли тестированию на возможность образования неспецифичных продуктов амплификации при использовании чужеродных образцов ДНК. В качестве таких образцов в реакционные смеси добавляли геномные ДНК культур *Pasterella muloicida* серовариант D КМИЭВ В-165, *Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC 27088, *Mycoplasma hyopneumoniae* КМИЭВ-42, *Bordetella bronchiseptica*–КМИЭВ В-120.

Для определения чувствительности использовали 2-хсуточную культуру *Fuzobakterium necrophorum* штамм ATCC 25286, выращенную в анаэробе на кровяном МПА. Культуру смывали стерильным физраствором с чашки Петри с последующими десятикратными разведениями от 10^{-1} до 10^{-7} . Из каждого разведения отбирали аликвоты и выделяли ДНК набором для выделения ДНК-ВК (фирмы ИБОХ г. Минск).

С выделенными ДНК проводили амплификацию при следующих температурных режимах:

- 1) 10°C 30сек
- 2) 95°C 5 мин
- 3) 94°C 45 сек
- 4) 56°C 45 сек
- 5) 72°C 45 сек
- 6) п.п.3)-5) повтор 30 циклов
- 7) 72°C 5 мин
- 8) 10°C режим хранения

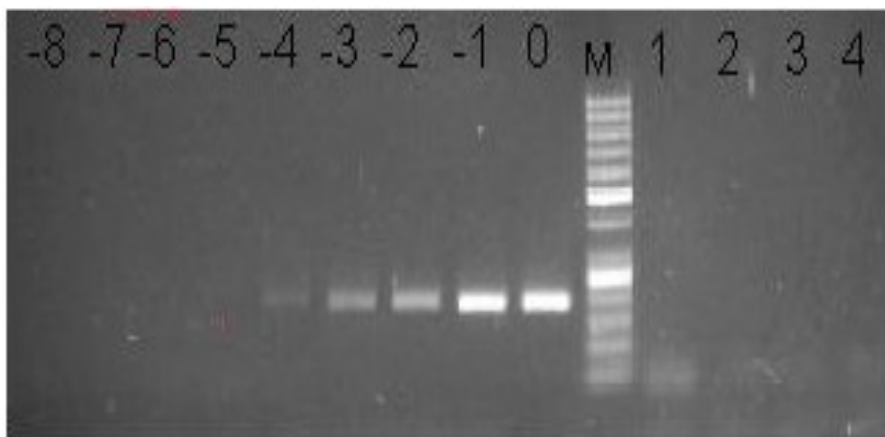


Рисунок 1 –Электрофорез продуктов амплификации

В результате постановки полимеразной цепной реакции при длине волны 254 нм или 310 нм проба видна в виде светящейся полосы, соответствующей маркеру на уровне 187 нуклеотидных пар (под цифрой ноль (0) расположена амплифицированная ДНК изначальной концентрации, -1 соответствует разведению на порядок и т. д.).

Для определения пороговых значений концентраций геномной ДНК *Fuzobacterium necrophorum*, при которых разрабатываемая ПЦР система способна детектировать возбудителя, провели эксперимент с использованием различных концентраций ДНК *Fuzobacterium necrophorum* в пробах (таблица 1).

Таблица 1 – Варианты количественного соотношения геномной ДНК *Fuzobacterium necrophorum* при пробоподготовке

<i>Fuzo- bakteri um nec- rophor um</i> , нг	0 (100)	-1 (25)	-2 (15)	-3 (10)	-4 (5)	-5 (1)	-6 (0,5)	-7 (0,25)	-8 (0,05)
К.м.к.	1 млрд.	100 млн.	10 млн.	1 млн.	100 тыс.	10 тыс.	1 тыс.	100	10

Примечание – к.м.к.–количество микробных клеток по стандарту McFarland

Проведенные нами исследования подтверждают специфичность сконструированного набора, так как специфическая полоса образуется на участке 187 нуклеотидных пар в разведении 1×10^{-4} , что соответствует 100 тыс. микробным клеткам по стандарту мутности McFarland. При постановке реакции с ДНК *Pasterella muloicida* серовариант D КМИЭВ В-165, *Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC 27088, *Mycoplasma hyopneumoniae* КМИЭВ-42, *Bordetella bronchiseptica* – КМИЭВ В-120 реакция отрицательная – светящаяся полоса не обнаружена.

Сконструированный набор обладает высокой чувствительностью и позволяет выявлять возбудителя в разведении 10^{-4} степени.

ВЫВОДЫ

1 Разработанная ПЦР тест-система обладает способностью детектировать ДНК *Fuzobakterium necrophorum* в разведении 1×10^{-4} , что соответствует 100 тыс. микробным клеткам по стандарту мутности McFarland или 5 нг выделенной геномной ДНК.

2 Тест-система специфична в отношении *Fuzobakterium necrophorum subsp. necrophorum* и не реагирует на ДНК, выделенную из образцов *Pasterella muloicida* серовариант D КМИЭВ В-165, *Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC 27088, *Mycoplasma hyopneumoniae* КМИЭВ-42, *Bordetella bronchiseptica* – КМИЭВ В-120.

ЛИТЕРАТУРА

1 Лемиш, А.П. Микробные ассоциации при гнойно-некротических поражениях копыт крупного рогатого скота/Андрусевич А.С., Корнеева М.Н.–Ветеринария сегодня.– сентябрь, 2012.– №3. – С.33–38.

2 Семенихин, В.И. Полиморфизм ДНК изолятов возбудителя некробактериоза крупного рогатого скота в Западной Сибири // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2005. –Т.2. – С.98–100.

3 Самоловов, А.А., Лопатин, С.В. Хромата и некробактериоз [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.vetinst.narod.ru/article/Samolovov2.pdf>.

4 Семенихин, В.И., Самоловов, А.А., Некрасова, Н.В. Полимеразная цепная реакция в диагностике *Fusobakterium necrophorum* [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.laboratorium.narod.ru/necro33.html>.

5 Методические указания про проведению обязательного минимума исследований в ветеринарных лабораториях при диагностике болезней животных // Утверждены ГУВ МСХ и П РБ 16.01.2008 (№ 10–1–5/34).

Лемиш А.П., кандидат ветеринарных наук

Красникова Е.Л., научный сотрудник

Вербицкий А. А., кандидат ветеринарных наук, доцент *

Рубникович Т.П., научный сотрудник**

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

* УО Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины, Витебск

** Белорусский государственный медицинский университет, Минск

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИЧЕСКИХ И ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ *BORDETELLA* *BRONCHISEPTICA*, ОСНОВАННЫХ НА МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДАХ

ВВЕДЕНИЕ

Bordetella bronchiseptica это небольшие, грамотрицательные, палочковидные бактерии рода *Bordetella* [1]. Данный возбудитель может вызывать инфекционный бронхит у млекопитающих, но редко вызывает заболевание людей [2]. В антигенном отношении *Bordetella bronchiseptica* схожа с *Bordetella pertussis* – облигатными патогенами человека, которые вызывают коклюш. *B. bronchiseptica* может сохраняться в окружающей среде в течение длительного периода времени [3, 4].

У бактерии *B. bronchiseptica* имеется на вооружении множество факторов патогенности: адгезинов (филаментозного гемагглютинина, пертактина и фимбрий) и токсинов (дермoneкротического, аденилатциклазы-гемолизина и липополисахарида) (Woolfrey et al., 1991; Gueirard et al., 1995).

В ветеринарии *B. bronchiseptica* приводит к патологии бронхолегочных путей, трахеобронхитам у различных видов животных [5, 6].

B. bronchiseptica является этиологическим агентом заболевания у собак, свиней и кроликов, а также у кошек, лошадей и тюленей. В настоящее время существуют ПЦР тест-системы для идентификации возбудителя [7].

У свиней *B. bronchiseptica* и *Pasteurella multocida* действуют в ассоциации, вызывая атрофический ринит – болезнь, в результате которой происходит задержка роста и искривление носовых раковин (криворылость) [8].

У собак *B. bronchiseptica* вызывает острый трахеобронхит [9], который обычно сопровождается сильным кашлем (кашель питомников). Кашель питомников может быть вызван собачим аденовирусом тип 2, ви-

русом собачьего парагриппа или комбинацией этих патогенов [7].

У кроликов *B. bronchiseptica* часто выделяется из носовых путей при часто встречающейся бессимптомной инфекции, сопровождаясь только насморком [10].

У кошек поражения, вызванные *B. bronchiseptica* сопровождаются трахеобронхитами, конъюнктивитами и ринитами, поражением нижнечелюстных лимфатических узлов и пневмонией. Помимо этого, со схожими клиническими признаками протекают заболевания, вызванные вирусом герпеса, калицивирусом, микоплазмой различных видов или хламидией [7]. Для кошек разработана и внедрена в практическое использование интраназальная вакцина [11].

Целью исследования является применение методических и теоретических приемов индикации и идентификации *B. bronchiseptica*, основанных на молекулярно-генетических методах.

В Республике Беларусь до настоящего времени исследования в этой области не проводились.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение генов и поиск нуклеотидных последовательностей проводили 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.

Анализ выбранных нуклеотидных последовательностей на вариабельность и поиск консервативных участков, необходимых для выбора праймеров проводили с помощью программы Vector NTI и BLAST online (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast).

В работе использовался производственный, вакцинный штамм *B. bronchiseptica* – КМИЭВ В–120

В работе были использованы следующие реактивы:

- 10x PCR буфер для Tag ДНК-полимеразы (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»)
- 10x TE-буфер pH 8,0 (SIGMA);
- ТАЕ: 0,04М трис ацетат, 0,002М ЭДТА;
- маркер молекулярного веса «GeneRuler 50 bp Ladder» (Fermentas, Литва);
- термостабильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза, 5 ед/мкл) (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»);
- раствор $MgCl_2$ (50 мМ);
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (25 мМ) (Fermentas, Литва);
- праймеры для определения принадлежности к *B. bronchiseptica*;
- агароза (helicon, Россия);

- буфер для нанесения проб;
- бромистый этидий (SIGMA, США);
- стерильная деионизированная вода.

Приборы и оборудование:

- микротермостат «BIOSAN-CH100»(Латвия);
- амплификатор «С 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США);
- персональный компьютер (Windows XP, 2 GHz, 512 Mb RAM, 80 Gb HDD, CD-RW, USB 2.0, мышь);
- микроцентрифуга высокоскоростная (14 000 об/мин) Jouan (Франция);
- комплект автоматических пипеток «SOCOREX» (Швейцария), вместимостью 0,1-2 мкл, 0,5-10 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл, 1–10 мл и накопники к ним (с фильтрами и без фильтров);
- пробирки для микропроб типа «эппендорф» вместимостью 0,5 и 1,5 мл;
- вортекс «BIOSAN» (Латвия);
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл для прибора «С 1000 Thermal Cycler»;
- холодильник «Атлант MXM 1841» (ЗАО «Атлант», РБ);
- система для электрофореза «Consort», (Бельгия);
- Gel Doc XR и программа imageLab Software, BIO-RAD (США);
- термостат SEL LAB (Германия);
- весы RADWAG AS 220/X (Польша);
- система подготовки чистой воды «Crystal В», ADRONA (Латвия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Своевременное выявление возбудителя болезни весьма важно при лечении данного заболевания антибиотиками, а также в цепи мероприятий направленных на борьбу с распространением данного заболевания. Обычные методы обнаружения с применением питательных сред обладают недостаточной чувствительностью.

Существующие серологические тесты не дают различий близкородственных видов *Bordetella*. Только молекулярно-генетические методы обнаружения, основанные на ПЦР, могут за короткий промежуток времени не только идентифицировать возбудителя болезни, но специфически идентифицировать его вид.

Преимущества постановки ПЦР при идентификации *B. bronchiseptica*:

- 1 помощь при подтверждении вида болезнетворных агентов;
- 2 малое количество времени, необходимое для подтверждения клинического диагноза *B. bronchiseptica*;
- 3 позволяет выявить животных, являющихся бактерионосителями и бактериовыделителями;

4 дает возможность минимизировать воздействие *B. bronchiseptica* на человека за счет мониторинга биологических продуктов, произведенных от восприимчивых животных.

Первым этапом в конструировании ПЦР тест-системы является мониторинг генов *B. bronchiseptica*, генотипических профилей кодирующих факторы вирулентности, поиск мишеней (таб.1). Одними из таких факторов у бордетелл являются: жгутики (FLA), dermonecrotoxin (DNT), экзогенный рецептор сидерофор железа (bfrZ), PTX– пертуссис токсин, CYA– ген, отвечающий за синтез белка аденилатциклазы, FHA– ген, отвечающий за синтез гемагглютинина, FIM– гены, отвечающие за формирование субъединицы фимбрии, PRN – ген, отвечающий за синтез пертактина, и так далее.

Таблица 1 – Наименование генов, олигонуклеотидных последовательностей и длина мишеней.

№	Праймер	Последовательность**, 5'-3'	П.н.
1	<i>16S rRNA1 (f)</i>	CTACGGGGGAAAGCGGGGGA	711
	<i>(r)</i>	GACCGTACTCCCCAGGCGGT	
2	<i>16S rRNA 2 (f)</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	520
	<i>2 (r)</i>	GCGGCTGCTGGCACG	
3	<i>BfrZ (f)</i>	GGACGACCAGGATCACATCTTCC	298
	<i>BfrZ (r)</i>	GCTTTCCTGGTAGTTGGCGTAGG	
4	<i>fimX (f)</i>	CACGATCGAGGACCCGAG	123
	<i>fimX (r)</i>	TTGGAGATCGTGGGCAGG	
5	<i>bvgR (f)</i>	TGCTTACCGTCAGCACGTTCTGA	104
	<i>bvgR (r)</i>	GCATACATGAGTTCTGGCATCAG	
6	<i>Prn (f)</i>	CAATGTCACGGTCCAACGCA	587
	<i>Prn (r)</i>	GCCTGCAAGGTGATCGACAG	
7	<i>CyaA (f)</i>	GTGGCTGGCCTGGTTCATGA	1072
	<i>CyaA (r)</i>	CGTTGTAAAACAGCGACGCCAACG	
8	<i>FhaS (f)</i>	CCAGCGCGGCCCCGCTCAGCC	117
	<i>FhaS (r)</i>	GCCGGCACGCACCGACAGCGCGTT	
9	<i>fhaB(f)</i>	GGAAAAGTCTGAATTCCCGCGC	338
	<i>fhaB (r)</i>	CGGTGCAATGCTCGCTCACGG	

Амплификацию проводили по программе, указанной в таблице 2.
Таблица 2 – Программа амплификации

Амплификатор: С 1000 Thermal Cycler,		Количество повторов
Температура	Время	
95°C	3 мин	1
94°C	30с	40–50
58°C	1 мин	
72°C	30с	
72°C	7 мин	–
10°C	хранение	–

Результат исследования представлен на рисунках 1–2.

Рисунок 1 –
50 циклов ам-
плификации:
1 – 16S rRNA1,
2– 16S rRNA 2,
3–Prn,
4 – fhaB,
5 – BfrZ,
6 – FhaS,
7 – bvgR,
8 – fimX,
9 – CyaA

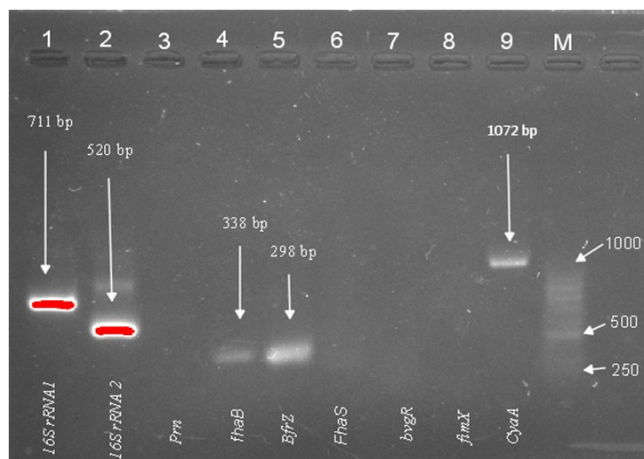
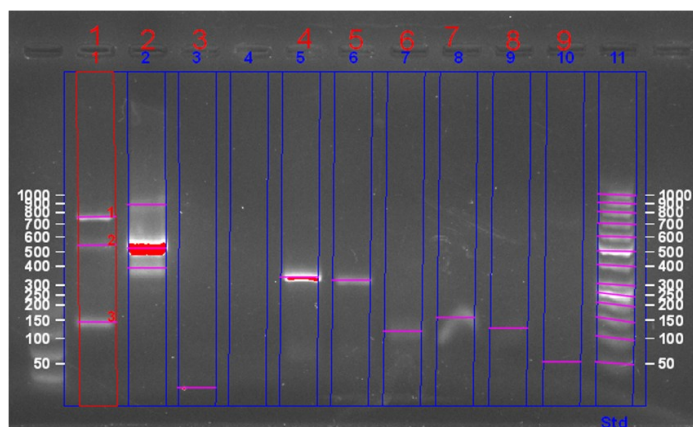


Рисунок 2 –
40 циклов ампли-
фикации:
1 – 16S rRNA1,
2– 16S rRNA 2,
3 – Prn,
4 – fhaB,
5 – BfrZ,
6 – FhaS,
7 – bvgR,
8 – fimX,
9 – CyaA

Светящаяся полоса на соответствующем уровне длины фрагмента подтверждает наличие у штамма *B. bronchiseptica*, соответствующего гена, мишени.

Уже в 1931 году Лесли и Гарднер отметили, что при выращивании штаммов *Bordetella* в пробирке на обычной питательной среде, то со временем выращенные штаммы спонтанно теряли свои вирулентные свойства и в большинстве случаев необратимо. Это явление называется вариационной фазой (*phase variation*) (Лесли и Гарднер, 1931). Авирулентные бактерии можно также получить, изменяя условия роста, и это явление было названо фенотипической модуляцией (*phenotypic modulation*) (Lacey, 1960). Фенотипические модуляции у бактерий можно получить под действием различных стимуляторов, таких как сульфат ионы, никотиновой кислоты или культивировании бактерий при температуре сопоставимой с температурой тела. Проведенный генетический анализ показывает, что так называемый *bvg* locus отвечает за регуляцию таких явлений. Вставки транспозонов в locus *bvg* приводит к формированию авирулентных вариантов *B. bronchiseptica*. Показано, что locus *bvg*, содержит делеции (Monack и др., 1989; Weiss и Falkow, 1984). Кроме того, фенотипические модуляции не происходят как у вирулентных, так и авирулентных штаммов содержащих мутации по *bvg* locusу (Gross and Rappuoli, 1989; Miller et al., 1992). Locus *bvg* кодирует синтез двух молекул белка, BvgA и BvgS, принадлежащих большому семейству двухкомпонентной системы передачи сигнала от раздражителя к бактерии (Aricò et al., 1989; Gross et al., 1989; Stibitz and Yang, 1991).

Двухкомпонентные системы белковой регуляции широко распространены в природе и находятся у большинства эубактерий, а также у архебактерий, нескольких представителей низших эукариот и растений (Loomis соавт., 1998; Perraud и др., 1999). Эти системы используются для определения вне- или внутриклеточных раздражителей (стимуляторов) и переводят их в сигнал через активацию клеточных гистидинкиназ. Гистидинкиназа автоматически фосфорилируется сохраняя остаток гистидина выполняющего роль передатчика, характерного для всех двухкомпонентных белковых систем. Высокоэнергетический фосфогистидин очень нестабильное соединение, передающее фосфат аспарагиновой кислоте приемника, области регуляторного белка. BvgAS двухкомпонентная система принадлежит к подсемейству двухкомпонентных систем, так называемых неортодоксальных систем, которые структурно более сложны и характеризуется четырьмя шагами His-Asp-His-Asp фосфорилированием, включая привлечение дополнительных белковых доменов (Parkinson and Kofoed, 1992; Uhl and Miller, 1994; Perraud et al., 1999) рисунок 3.

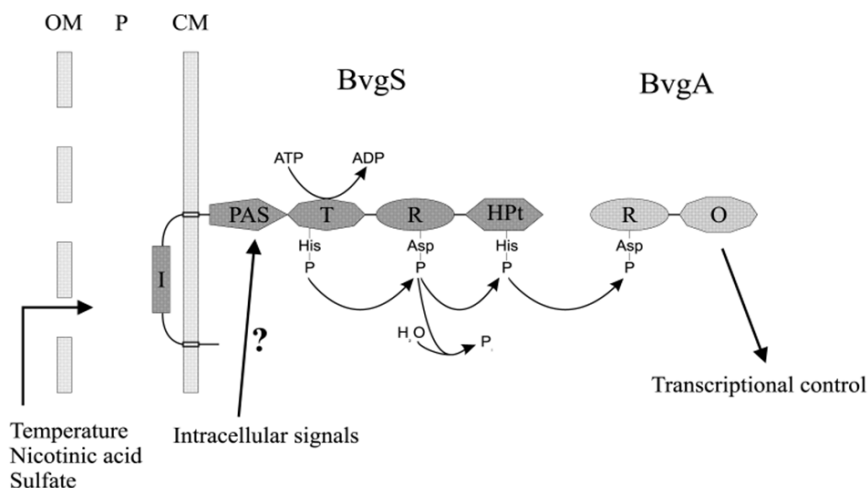
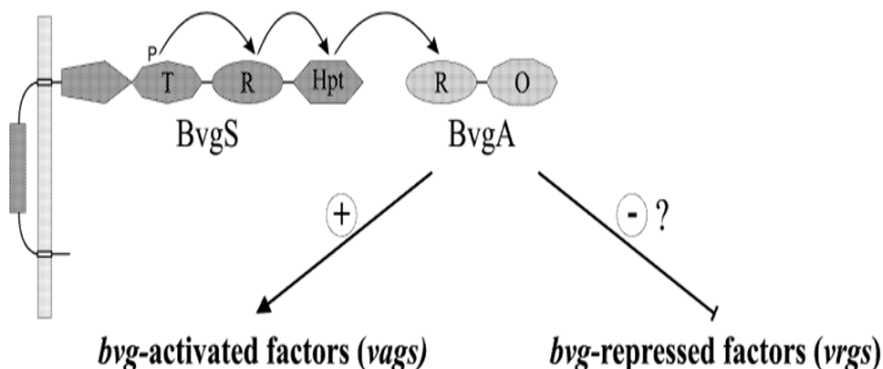


Рисунок 3 – Структурная организация BvgAS двухкомпонентной системы регуляции клетки (детали указаны в тексте). OM – внешняя мембрана бактериальной клетки; P – периплазма; CM – цитоплазматическая мембрана; I – область определения внешнего раздражителя, фактора; PAS – внутриклеточный сигнал; T – трансмиттер (передатчик); R – приемник (ресивер); HPt – гистидин-содержащий комплекс; O – выпускающий домен

При определенных условиях роста бактерий активность множества генов регулируется системой белков BvgAS. Эти гены названы *vag* генами (virulence-activated genes) и бактерии их экспрессирующие должны находиться в Bvg⁺ фазе. Большинство генов отвечающих за вирулентность, включая PTX, CYA, FHA, FIM, PRN, TcfA, BrkA регулируется *vag* генами (рисунок 4).



<i>bvg</i> -активирующие факторы (<i>vags</i>)	<i>bvg</i> - репрессирующие факторы (<i>vrgs</i>)
Гены и их функция	Гены и их функция
Адгезия и колонизация <i>FIM</i> – гены, отвечающие за формирование субъединицы фимбрии	Поверхностные и секреторные факторы <i>vrg6, vrg18, vrg24, vrg53, vrg73</i> – гены репрессоры вирулентности
<i>PRN</i> – ген, отвечающий за синтез пертактина	Метаболизм Уреаза, Алкалагин
<i>FHA</i> – ген, отвечающий за синтез гемагглютинаина	Подвижность <i>fliAB</i> → <i>flaA</i>
Токсины	Транспорт электронов
<i>PTX</i> – пертуссис токсин	Цитохром С оксидаза
<i>CYA</i> – ген, отвечающий за синтез белка аденилатциклазы	
<i>DNT</i> – ген, отвечающий за синтез дермoneкротического токсина	

Рисунок 4 – Двухкомпонентная система регуляции активности генов *Bordetella*

Функция большинства *vag* генов известна и раскрыты механизмы их взаимодействия. Однако существует несколько *vag* генов, отношение которых к вирулентности бактерии пока еще не изучено, включая выключение генов «домашнего хозяйства» кодирующих такие факторы, как цитохром и порин (Antoine et al., 2000; Ezzel et al., 1981; Finn and Amsbaugh, 1998; Finn et al., 1995). Интересен и тот факт, что экспрессия *bvgR* гена, усиливается при кодировании белка репрессора вовлеченного в регуляцию так называемых *vrg* генов (*virulence-repressed genes*), так же регулируется системой BvgAS (Beattie et al., 1993; Merkel et al., 1998).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной ПЦР установлено наличие у исследованного вакцинного штамма *B.bronchiseptica* КМИЭВ В-120 следующих генов:

* *16S rRNA1* – ген, отвечающий за формирование 16 S субъединицу рибосомы;

* *16S rRNA 2* – ген, отвечающий за формирование 16 S субъединицу рибосомы;

* *BfrZ* – ген отвечающий за формирование рецептора Сидерофора;

* *fhaB* – ген, отвечающий за синтез гемагглютинаина;

* *CyaA* – ген, отвечающий за синтез белка аденилатциклазы.

У данного штамма не установлено наличие следующих генов:

- * *bvgR* – ген, отвечающий за формирование субъединицы фимбрии;
- * *Prn* – ген, отвечающий за синтез пертактина;
- * *fimX* – ген, отвечающий за формирование субъединицы фимбрии;
- * *FhaS* – ген, отвечающий за синтез гемагглютинина.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Hewlett, EL (1995). "Bordetella species." In: *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Mandel, GL, Bennett, JE, Dolin, R, eds.). Churchill Livingstone, Inc., New York, NY. pp. 2078–2084.
- 2 Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed.). McGraw Hill. ISBN 0–8385–8529–9.
- 3 Finger H, von Koenig CHW (1996). Bordetella. In: *Barron's Medical Microbiology* (Barron S et al., eds.) (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. (via NCBI Bookshelf) ISBN 0–9631172–1–1.
- 4 Coote JG (2001). "Environmental sensing mechanisms in Bordetella". *Adv Microb Physiol* 44: 141–81. doi:10.1016/S0065–2911(01)44013–6. PMID 11407112.
- 5 Mattoo S, Foreman–Wykert AK, Cotter PA, Miller JF (2001). "Mechanisms of Bordetella pathogenesis". *Front Biosci* 6: E168–86. doi:10.2741/Mattoo. PMID 11689354.
- 6 Diavatopoulos DA, Cummings CA, Schouls LM, Brinig MM, Relman DA, Mooi FR (2005). "Bordetella pertussis, the Causative Agent of Whooping Cough, Evolved from a Distinct, Human–Associated Lineage of *B. bronchiseptica*". *PLoS Pathog* 1 (4): e45. doi:10.1371/journal.ppat.0010045. PMC 1323478. PMID 16389302.
- 7 "Bordetella data sheet". Zoologix. Retrieved 2009–03–08.
- 8 Lawhorn, Bruce. "Atrophic Rhinitis" (PDF). Texas Agricultural Extension Service. Retrieved 2006–11–23.
- 9 Wagener, J. S., R. Sobonya, L. Minnich and L. M. Taussig (1984). Role of canine parainfluenza virus and Bordetella bronchiseptica in kennel cough. *Am J Vet Res* 45 (9): 1862–6.
- 10 Burns, E. H., Jr., J. M. Norman, M. D. Hatcher and D. A. Bemis (1993). Fimbriae and determination of host species specificity of *Bordetella bronchiseptica*. *J Clin Microbiol* 31 (7): 1838–44.
- 11 "Prevention and control of Bordetella bronchiseptica infection in cats". Intervet/Schering-Plough Animal Health. Retrieved 2009–03–08.

Чехун А. И., научный сотрудник

Коваленко В. Л., доктор ветеринарных наук

Ничик С. А., доктор ветеринарных наук, профессор

«Институт ветеринарной медицины НААН», г. Киев

ВЛИЯНИЕ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ *ESCHERICHIA COLI* И *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых эффективных дезинфицирующих средств является актуальным вопросом для ветеринарии. При этом исследование механизмов влияния химических веществ на микроорганизмы дает возможность для усовершенствования и разработки дезинфицирующих средств. В предыдущих наших работах мы определяли и доказали тормозящее действие некоторых дезинфицирующих средств на процесс поглощения кислорода клетками *E. coli* и *S. Aureus* [1]. В этом важном процессе для микроорганизмов актуальную роль играют липиды. Они являются не только структурными компонентами мембран, но и осуществляют определенную регуляторную функцию в метаболических процессах в клетке [2, 3]. Например, некоторые изоферменты протеинкиназы С активируются фосфатидилсеринем и фосфатидилэтаноламином, что позволяет открыться активному центру каталитической субъединицы необходимой для осуществления реакции фосфорилирования белков. Фосфатидилинозитол принимает непосредственное участие в функционировании некоторых сигнальных путей в клетке и транспорте Ca^{2+} . Негативно заряженный фосфатидилсерин регулирует электростатическое взаимодействие между белками и мембранами, а некоторые липидные домены в мембранах являются своеобразными температурными сенсорами во время реакции клеток на тепловой шок, который способствует сохранению их жизнеспособности [4, 5]. Предполагается, что одним из механизмов действия дезинфицирующих средств на клетку может быть их влияние на липидный состав.

Целью работы было исследование качественного и количественного состава липидов клеток *E. Coli* и *S. Aureus* после воздействия на них дезинфицирующих средств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки бактерий указанных штаммов *E. Coli* 1257 и *S. Aureus* 209 – Р инкубировали с дезинфицирующими растворами в стандартных условиях в течение 1 часа. Контролем служили штаммы, которые не подвергались воздействию дезинфектантов.

Качественный и количественный состав общих липидов и фосфоли-

пидов определяли с помощью метода тонкослойной хроматографии, используя пластинки "Sorbfil" ПТСХ-АФ-А("Imid Ltd", Краснодар, Россия). Для этого из исследуемого образца экстрагировали липиды смесью растворителей:хлороформ, метанол(1/1; v/v). Тонкослойную хроматографию общих липидов проводили в одном направлении в системе растворителей: гексан, диэтиловый эфир, ледяная уксусная кислота (85: 15: 1; v/v) [6].

Тонкослойную хроматографию фосфолипидов проводили в двух взаимно перпендикулярных направлениях [7]. Первая система растворителей – хлороформ-метанол-бензол- аммиак (65: 30: 10: 6; v/v). Вторая – хлороформ -метанол-бензол-ацетон-ледяная уксусная кислота-вода(70: 30: 10: 5: 4: 1; v/v). После испарения системы растворителей пластины обрабатывали 10 %-й серной кислотой в метаноле и нагревали 5 мин при температуре 180 °С. Полученные хроматограммы сканировали. Для обработки изображений применяли программу Pikturе j. Содержимое липидов выражали в %. Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили с помощью коэффициента Стьюдента (t) [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

В результате проведенных исследований были выявлены изменения в липидном составе клеток *E. coli* и *S. aureus* через час инкубации с дезинфицирующими средствами гуанцид, биохлор, диамант. Состав общих липидов представлен в таблице 1. Особое внимание уделяли определению уровня холестерина, так как холестерол является обязательным структурным компонентом клеточной мембраны. Он стабилизирует мембрану, взаимодействуя своими гидроксильными группами с полярными головками фосфолипидов и сфинголипида.

Таблица 1 – Содержимое общих липидов *E. coli* и *S. Aureus* до и после одночасовой экспозиции с дезинфицирующими средствами %, М±m (n=7)

Штам	Дез. средство	Общие фосфолипиды	Моно-глицериды	Холестерол	Свободные жирные кислоты	Диглицериды	Триглицериды
<i>E. coli</i>	Контроль	37,3±1,4	2,3±0,4	1,6±0,2	1,6±0,2	32,6±3,0	24,6±2,3
	Гуанцид	22,1±1,7*	2,6±0,4	0,8±0,1*	2,5±0,2*	53,6±1,6*	19,4±1,8
	Биохлор	28,3±1,4*	2,4±0,3	0,9±0,2*	2,4±0,2*	46,3±1,1*	19,8±2,0
	Диамант	28,2±1,7*	2,5±0,2	1,3±0,2	3,0±0,5*	42,4±2,8*	22,6±2,2
<i>S. aureus</i>	Контроль	40,5±2,0	3,5±0,2	2,0±0,1	2,5±0,2	28,7±2,0	22,8±2,1
	Гуанцид	28,4±2,0*	3,5±0,3	1,7±0,1	3,9±0,2*	46,3±1,7*	16,2±1,2*
	Биохлор	27,7±1,3*	3,5±0,2	1,7±0,1	3,5±0,3*	45,2±1,3*	18,4±1,0
	Диамант	33,8±1,4*	3,4±0,1	1,8±0,1	3,2±0,2*	39,7±2,3*	18,1±0,9

Примечание – p < 0,05 в сравнении с контролем

Следует отметить, что в контрольных клетках *E. coli* и *S. aureus* низкий уровень холестерина. В этих клетках основная часть приходится на фосфолипиды, ди- и триглицериды. Ди- и триглицериды являются, в основном, энергетическими резервами клеток прокариот и эукариот, а фосфолипиды – важным компонентом мембран.

Дезинфицирующие средства гуанцид, биохлор, диамант приводят к уменьшению общего количества фосфолипидов, холестерина и триглицеридов. Так гуанцид в *E. coli* вызывает уменьшение общего количества фосфолипидов, холестерина и триглицеридов на 41 %, 50 % и 21 % соответственно. Биохлор снижает эти показатели на 24 %, 44 %, и 20 %, а диамант - на 24 %, 19 %, и 8 % соответственно. При этом отмечается увеличение содержания свободных жирных кислот и ди- и триглицеридов. Гуанцид приводил к увеличению уровня жирных кислот и ди- и триглицеридов на 56 % и 64 %, биохлор и диамант повышали эти показатели на 50 %, 42 % и на 87 %, 30 % соответственно.

В *S. aureus* происходили аналогичные изменения. Под воздействием гуанцида общее количество фосфолипидов, холестерина и триглицеридов уменьшались на 30%, 15% и 29%. А биохлор и диамант вызывали снижение этих показателей на 44%, 15%, 19% и 16%, 10%, 21% соответственно.

Жирные кислоты включаются в сложные липиды, в частности, в фосфолипиды и триглицериды [9]. Метаболиты жирных кислот играют ключевую роль в экспрессии факторов транскрипции. Производные жирных кислот модулируют уровень внутриклеточного кальция, влияют на ход реакций каскада сигнальной трансдукции. Факторы транскрипции, активность которых регулируется жирными кислотами, взаимодействуют со специфическими участками промоторов генов вследствие прямого связывания с ДНК или не-ковалентного белок-белок взаимодействия. Фундаментальным достижением последнего десятилетия стало открытие факта, что химическая структура жирной кислоты является определяющим фактором контроля экспрессии генов [10].

Установлено, что *E. coli* имеет индуцибельную систему для окисления жирных кислот. Продукт гена *FadR* участвует в регуляции разнообразных генов, которые кодируют ферменты синтеза и деградации жирных кислот. *FadR* принадлежит к классу репрессоров транскрипции генов, которые участвуют в перенесении жирных кислот [11- 14].

Другими исследователями при изучении *Bacillus megaterium* было выявлено и ингибирование жирных кислот, связанных с ДНК репрессорами транскрипции *Bm3R1*, которая вызывает активацию транскрипции оперона, кодирующего гидроксилазу жирных кислот (*CUP102*) [15].

Как видим из приведенных данных, в клетках *E. coli* и *S. aureus* под воздействием дезинфицирующих средств уменьшается количество фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и сфингомиелина, но при этом растет содержимое фосфатидилхолина. Изменение состава отдельных

фосфолипидов отображено в таблице 2.

Гуанцид приводил к снижению уровня фосфатидилетаноламина, фосфатидилсерина и сфингомиэлина на 28 %, 30 % и 21 %, соответственно. Биохлор и диамант вызывали уменьшение количеству этих липидов на 23 %, 26 %, 28 % и 16 %, 19 %, 20 % соответственно. Гуанцид, биохлор, диамант при этом приводили к увеличению уровня фосфатидилхолина на 34 %, 37 % и 23 % соответственно. У исследованных бактерий ДНК связана с мембраной. Поэтому, возможно, что рост бактериальной клетки (в первую очередь процесс синтеза и репликации ДНК) будет зависеть от состояния мембран. Фосфолипиды – основные компоненты клеточных мембран, которые обеспечивают их физико-химические свойства, полупроницаемыми для низкомолекулярных соединений, от чего зависит активность мембраносвязанных ферментов, ход реакций каскада сигнальной трансдукции [16]. Главными фосфолипидами мембран являются фосфатидилхолин и фосфатидилетаноламин. Обращая внимание на изменение количества холестерина и сфингомиэлина в клетках, следует обратить внимание на липидные рафты. Липидные рафты – это своеобразные участки в пределах внешнего листка плазматической мембраны, которые обогащены холестерином и сфинголипидом. Эти мембранные микродомены участвуют в процессах инвагинации мембран, сигнальной трансдукции, эндоцитоза.

Результаты исследований дают возможность сделать определенные выводы относительно изменения качественного и количественного состава липидов клеток *E. coli* и *S. aureus* после одночасовой экспозиции с гуанцидом, биохлором и диамантом. Во – первых, следует отметить, что большее влияние на качественный и количественный состав общих липидов и фосфолипидов является эффективнее оказывает гуанцид. Во – вторых, уменьшение общего количества фосфолипидов приводит к повышению уровня диглицеридов, вероятно, за счет разрыва связи у третьего углеродного атома глицерина ($\text{CH}_2 - \text{O}$). Но такое происходит не со всеми фосфолипидами. Так, например, содержащее фосфатидилхолина увеличивается, содержащее фосфатидилетаноламина, фосфатдилсерина и сфингомиэлина уменьшается. При этом снижается и уровень холестерина (таблица 2).

Снижение количества холестерина, сфингомиэлина и увеличение количества фосфатидилхолина (то есть увеличение соотношения фосфатидихолин/сфингомиэлин) указывает на повышение «текучести» клеточных мембран у *E. coli* и *S. aureus*. То есть, мембраны клеток этих бактерий теряют свою упругость, как бы "растворяются" и не выполняют свою функцию.

Повышение уровня фосфатидилхолина является следствием повышения уровня диглицеридов. А это совпадает с исследованиями Ж. Крю, что приводит к увеличению количества данного фосфолипида, что значительно влияет на «текучесть» мембран.

Таблица 2 – Содержимое отдельных фосфолипидов *E. coli* и *S. aureus* до и после одночасовой экспозиции с дезинфицирующими средствами %, $M \pm m$ (n=7)

Штам	Дез. средство	Фосфатидилэтаноламин	Фосфатидилхолин	Фосфатидилсерин	Фосфатидилинозитол	Сфингомиелин
<i>E. coli</i>	Контроль	23,8±2,0	34,8±2,1	13,9±1,4	11,8±1,4	15,8±1,4
	Гуанцид	17,2±0,9*	46,8±3,0*	9,7±0,9*	13,0±1,8	12,5±1,9
	Биохлор	18,3±1,2*	47,6±1,8*	10,3±0,6*	12,6±1,3	11,3±1,1*
	Диамант	19,9±0,7	42,8±1,9*	11,3±0,5	13,3±0,8	12,6±0,7
<i>S. aureus</i>	Контроль	25,2±1,8	33,2±4,1	14,5±1,1	12,2±1,2	14,9±1,2
	Гуанцид	16,7±1,4*	49,5±1,8*	10,5±0,9*	12,5±0,5	10,9±0,9
	Биохлор	19,2±0,8*	45,3±1,5*	10,9±0,6*	13,1±1,1	11,5±0,9
	Диамант	20,0±0,8*	43,5±1,4*	11,6±0,4*	12,6±1,0	12,4±0,5

Примечание – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами установлено, что дезинфицирующие средства гуанцид, биохлор и диамант вызывают существенные изменения липидного состава клеток *E. coli* и *S. aureus*, что ведёт к потере жизнеспособности бактерий за счет повышения текучести клеточных мембран.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Чехун, А.И. Влияние дезинфицирующих средств на поглощение кислорода клетками бактерий *E. coli* и *S. aureus*. / А.И. Чехун // Ветеринарная биотехнология. № 20. – К. – 2012 – С. 213–218.
- 2 Lee, A.G. How Lipids effect the activities of integral membrane proteins. / A.G. Lee // Biochim. Biophys. Acta; Sci., 2004.– P. 62–87.
- 3 Yeagle, P.L. The structure of biological membranes./ P.L. Yeagle // Second edition. CRC Press, 2005 – P.590.
- 4 Torok, Z. Heat shock protein coinducers with no effect on protein denaturation specifically modulate the membrane lipid phase. / Z. Torok, N.M.Tsvetkova, G. Balogh et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA; – 2003. – P. 3131–3136.

5 Parker, P.J. The ubiquitose phosphoinositides. / P.J. Parker // Biochem. – 2004. Sur. Trans; – P.893 – 898.

6 Кейтс, М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. / М. Кейтс. М. – 1975 – 323с.

7 Vaskovsky, B.E. HPTLC of phospholipid mixtures containing phosphatidylglycerol. / B.E. Vaskovsky, T.A. Terekhova // J. High Resolution chromatography and CC; – 1979. – P.671 – 672.

8 Лакин, Г.Ф. Биометрия. Выс.школа. М. – 1980 – 293с.

9 Крю, Ж. Биохимия. Медицинские и биологические аспекты. М. – 1979. – 510 с.

10 Gossett, R.E. Acyl-Co A binding proteins: multiplicifi and function. / R.E. Gossett, A.A.Frolov, J.B. Roths [et al.] // Lipids; – 1996. – Vol. 31. P.895 – 918.

11 Jump, D.B. Fatty acid regulation of gene transcription. / D.B. Jump. Crit. Revs. Clinik. Lab. Sci. – 2004. – Vol. 41. – P.41 – 78.

12 Dirusso, C.C. Characterization of FadR, a global transcriptional regulator of fatty acid metabolism in Echerichia coli. / C.C. Dirusso, T.L. Heimert, A.K. Metrger // Interaction with fad B promoter is prevented by long-chain fatty acyl coenzyme A. J. Biol. Chem. – 1992. – P. 8685 – 8691.

13 Black, P.N. Molekular and biochemical analysis of fatty acid transport, metabolism and gene regulation in *E.coli*. / P.N. Black, C.C. Dirusso // Biochim.et biophys. Acta. – 1993. – P.123 – 145.

14 Dirusso, C.C. The fats of *E.coli* during infancy and old age: regulation by global regulators, alarmones and lipid intermediates. / C.C. Dirusso, T. Nys-trom // Mol. Mikrobiol. – 1998. – Vol.27. – P.1 – 8.

15 Palmer, C.N. The repressor protein, BM 1, mediates an adaptive response to toxic fatty acids in *Bacillus megenterium*. / C.N. Palmer, E. Axen, V. Hughes, C.R. Wolf // J. Biol. Chem. –1998. – Vol.273. – P.18109 – 18116.

16 Гула, Н.М. Жирные кислоты и их производные при патологических состояниях. / Н.М. Гула, В.М. Маргитич // К. – Научная мысль. – 2009. – 335с.

Бабак В.А., кандидат ветеринарных наук
Гусев А.А., доктор ветеринарных наук, профессор
Пунтус И.А., младший научный сотрудник
Згировская А.А., кандидат биологических наук
Ломако Ю.В., кандидат ветеринарных наук

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

ВАКЦИНА ЖИВАЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННАЯ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ОСПЫ ОВЕЦ

ВВЕДЕНИЕ

Оспа овец (Sheep pox) – высоко контагиозная особо опасная болезнь, характеризующаяся лихорадкой и образованием в эпителии кожи и слизистых оболочек папулезно-пустулезных поражений. Болезнь широко распространена в Турции, Иране, Пакистане, Афганистане, Индии, Марокко, Алжире, Тунисе, Ливии, Кувейте и многих других странах Азии и Африки. В Российской Федерации заболевание эпизодически регистрируют на пограничных территориях. Согласно решению МЭБ оспа овец и коз отнесена к быстро распространяющимся болезням и подлежит животных обязательному декларированию. Болезнь наносит овцеводству огромный ущерб, включающий потери от гибели и вынужденного убоя больных животных, снижения продуктивности, обострения вторичных инфекций, затраты на проведение ветеринарно-санитарных и охранно-карантинных мероприятий. Оспа мелкого рогатого скота остается актуальным заболеванием в мире, о чем свидетельствуют случаи ее регистрации в последние годы в разных странах мира (Китай, 2002–2003; Монголия, 2006; Греция, 2007; Турция, 2001; Таджикистан, 2001; Вьетнам, 2005; Россия, 2012 и другие).

В случаях генерализованного и осложненного течения болезни гибель овец достигает 50% от количества заболевших. Вирус передается при контакте больных животных со здоровыми, а от овец, имеющих поражения трахеи и легких – воздушно-капельным путем. Виремия наступает перед генерализацией процесса. У больных животных вирус максимально локализуется в оспинах. Он не имеет антигенных вариантов. Переболевание сопровождается длительным иммунитетом (не менее двух лет) и образованием антител, которые с молозивом и молоком передаются потомству [3, 4, 5, 6, 7, 8].

В Республике Беларусь аналогов инактивированных и живых вирус-вакцин для профилактики оспы овец не производится. Использование вакцин, завозимых из стран дальнего и ближнего зарубежья, экономически не оправдано из-за высокой себестоимости.

Кроме того, вступление Республики Беларусь в Таможенный Союз повысило риск заноса высококонтагиозных инфекций из Средней Азии, среди которых оспа овец, ящур, сибирская язва, африканская чума свиней, чума мелких жвачных животных, блютанг, бруцеллез и другие. В связи с этим разработка и применение отечественной вакцины для профилактики оспы овец является актуальной задачей ветеринарной науки, а сама вирус-вакцина – экспортно-ориентированной.

Целью наших исследований явилась разработка технологии изготовления культуральной живой лиофилизированной вирус-вакцины для иммунизации против оспы овец.

Для достижения цели в наших исследованиях были поставлены **задачи**:

1 из имеющихся в работе синтетических и ферментативных питательных сред подобрать оптимальную среду для выращивания культуры клеток 3-КГ (гонады козы) и адаптировать ее с эмбриональной сыворотки к нормальной сыворотке крови КРС;

2 определить оптимальную посевную концентрацию клеток для пассажирования и выдачи к заражению в матрасах и роллерах;

3 адаптировать вирус оспы к культуре клеток 3-КГ и отработать рациональную схему накопления вируса;

4 подобрать среду для высушивания вируса;

5 провести контроль качества разработанной вирус-вакцины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в отделе культур клеток и питательных сред и лаборатории биотехнологии РУП “Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского”.

В опытах использовалась перевиваемая линия клеток 3-КГ (гонады козы), депонированная в коллекции культур клеток РУП “Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского”. Культура клеток 3-КГ представляет собой фибробластоподобные полигональные клетки с кариологической характеристикой $2n=60$. Сформированный монослой культуры – это веретеновидно переплетенные клетки с округлым ядром. Первично полученная культура клеток 3-КГ культивировалась на полусинтетической питательной среде (ПСС) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС).

Для адаптации культуры клеток использовали синтетические среды МЕМ, 199, ДМЕМ и ферментативные ФГМС и ГЛА в различных сочетаниях компонентов. Хорошие результаты по ростовым свойствам и морфологии были получены при сочетании компонентов ФГМС+ДМЕМ 3:1 с добавлением 0,2 г/л глюкозы и 100-150 мг/л L-глутамина. Адаптацию к сыворотке крови КРС проводили в течение 4-х пассажей, заменяя ЭТС пошагово на 30, 50, 70 и 100%.

Культивирование клеток проводилось по общепринятой методике на пластиковых матрасах ($V=50-200 \text{ см}^3$), стеклянных матрасах ($V=1500 \text{ см}^3$) и стеклянных роллерных флаконах ($V=2000-3000 \text{ см}^3$). Для определения количества клеток, индекса пролиферации и процента жизнеспособных клеток ежедневно снимали по три матраса в течение 7 дней жизненного цикла и проводили подсчет клеток в камере Горяева по общепринятым методикам, используя 0,5% водный раствор трипанового синего [2]. Каждые 12 ч в течение 7 суток проводили микроскопирование исследуемой линии клеток, оценивая состояние культуры, морфологию, формирование клеточного монослоя.

В исследованиях использовали вакцинный вирус оспы штамм «НИСХИ», депонированный в коллекции микроорганизмов под номером «КМИЭВ-V140».

Адаптацию вируса оспы штамм «НИСХИ» «КМИЭВ-V140» проводили в течении 4-х слепых пассажей на полный монослой клеток в объемной дозе 1:20, при этом инфекционную активность вируса определяли только на последнем пассаже. Титрацию вируса оспы проводили на культуре клеток пробирочным способом и в 96-ти луночных микропланшетах. Расчет титра вируса производили по методу Кербера и выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$.

Отработку накопления биомассы вируса оспы проводили на сформированном монослое с контактом и сменой питательной среды на поддерживающую. Ежедневно проводили микроскопию контрольного интактного и инфицированного клеточного монослоя, оценивая степень его поражения и сравнивая ее с контролем. При отработке заражающей дозы вируса испытывали концентрации 0,01, 0,1, 0,5 и 1,0 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$.

Накопленная по оптимальной схеме биомасса вируса оспы использовалась при подборе защитной питательной среды для лиофильного высушивания вируса оспы. С этой целью использовали следующие компоненты: сыворотку крови КРС и ЭТС, пептон, желатозу, сахарозу, ГЛА, которые смешивали в различных комбинациях и процентных соотношениях. После высушивания определяли на какой защитной среде сохранность вирусной активности была выше.

На заключительном этапе оценивали физико-химические показатели сконструированного биопрепарата: внешний вид и цвет (визуально), наличие вакуума (с помощью аппарата типа Д'Арсонваль по действующим ТНПА), растворимость (времени растворения вакцины в объеме физиологического стерильного раствора, равном объему вакцины до сушки), определение массовой доли влаги в вакцине (согласно ГОСТ 24061 «Препараты биологические сухие. Метод определения влажности»), контаминация бактериальной, грибковой флорой (среды питательные – мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА) или среда № 1 – для выращивания бактерий; среда Сабуро или среда № 2 – для выращивания грибов, среда Китта-Тароцци – для выращивания анаэробных микроорганизмов).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для эффективного роста культур клеток различного происхождения проводился тщательный подбор синтетических и ферментативных питательных сред, различающихся аминокислотным, витаминным и солевым составом для конкретной производственной линии клеток в условиях определенных схем и методов культивирования.

Культивирование перевиваемой линии клеток 3-КГ проводили с использованием синтетических и ферментативных питательных сред. Базовым вариантом являлись среды ПСС и ДМЕМ. В опытах по подбору и модификации среды использовали ферментативные и синтетические питательные среды: 0,25% гидролизат мышечных белков (ФГМС), среда 199, ЕМЕМ. Во всех вариациях питательных сред присутствовала эмбриональная сыворотка крови КРС (10%), антибиотики – бензилпенициллин и стрептомицина сульфат в дозе 100 ЕД/мл, и корректирующий рН 7,57% раствор бикарбоната натрия.

В качестве компонентов обогащения модифицированных питательных сред использовали добавление глюкозы (до 2000 мг/л) и глутамина (100–150 мг/л). Глюкоза является легкодоступным энергетическим материалом для перевиваемых культур клеток. Глутамин, как незаменимая аминокислота, содержится в ферментативных средах в недостаточных количествах и требует обязательной корректировки в питательной среде, используемой для выращивания клеток, так как является лимитирующим фактором, который сказывается на ростовых свойствах клеток в длительных пассажах.

Результаты исследований роста перевиваемой линии клеток 3-КГ представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Данные исследования ростовых свойств клеток 3-КГ при культивировании стационарным способом

Компоненты среды	Проведено пассажей	Выход клеток с матраса, ср. знач., млн.кл.	Индекс пролиферации
ПСС *	8	41,8±4,94	4,2
ДМЕМ	6	31,67±6,63	3,2
199	6	25,27±5,48	2,5
ЕМЕМ	4	33,33±4,08	3,3
ФГМ-С	6	28,33±5,35	2,8
ФГМ-С+ДМЕМ	10	39,0±5,2	3,9
ДМЕМ+ЕМЕМ	8	30,0±7,05	3,0

Примечание –*базовый вариант культивирования

P < 0,05

Как видно из таблицы 1, хорошие результаты получены на среде ФГМС+ДМЕМ 3:1, которые сопоставимы с базовой средой ПСС и выше, чем на других обрабатываемых питательных средах в 1,4–1,6 раза.

На следующем этапе мы провели замещение эмбриональной сыворотки крови телят на нормальную сыворотку крови КРС, заменяя в течение 4-х пассажей ЭТС пошагово на 30, 50, 70 и 100% нормальной сыворотки на 4-м пассаже соответственно. В ходе проведенных работ культура клеток несколько изменила морфологию, стала более вытянутая, веретеновидная (рисунок 1), а ИП снизился с 3,9 до 3,5. Оптимальная посевная концентрация составила 70–110 тыс.кл/мл для проведения 5–7 суточных пассажей.

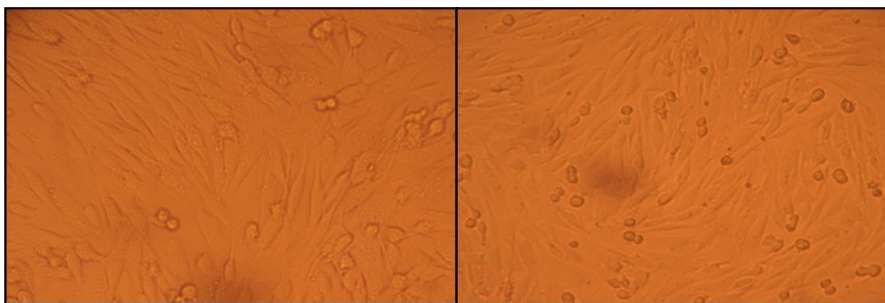


Рисунок 1 – Интактный монослой культуры клеток 3-КГ, 72 ч роста

В дальнейшем подбиралась посевная концентрация клеток 3-КГ для получения полного монослоя через 48 и 72 часа, которая составила 170 и 130 тыс.кл/мл $\pm 15\%$ соответственно. С посеянных матрасов на 2-е и 3-е сутки снимали монослой для определения концентрации выросших клеток, что учитывалось в дальнейшем при расчете дозы заражения вирусом. Так, при 2-х суточном цикле культивирования (170 тыс.кл/мл) на вторые сутки в монослое было 30–35 млн.кл./матр, а на третьи сутки (130 тыс.кл/мл) – 34–39 млн.кл./матр.

При культивировании клеток 3-КГ роллерным способом отработали посевную концентрацию клеток 30–35 млн.кл./рол. для проведения пассажей и 50–55 млн.кл./рол. для выдачи на 48 час на заражение.

Адаптацию вируса оспы овец штамм «НИСХИ» «КМИЭВ-V140» проводили в течении 4-х слепых пассажей на полный монослой клеток в объемной дозе 1:20, при этом от пассажа к пассажу проявление цитопатического действия усиливалось и выражалось в округлении клеток, дегенерации клеточного монослоя, формировании специфических «гроздей». К четвертому пассажу ЦПД проявлялось с 48–72 часов, а полное поражение монослоя – к 96–120 часам (рисунок 2).

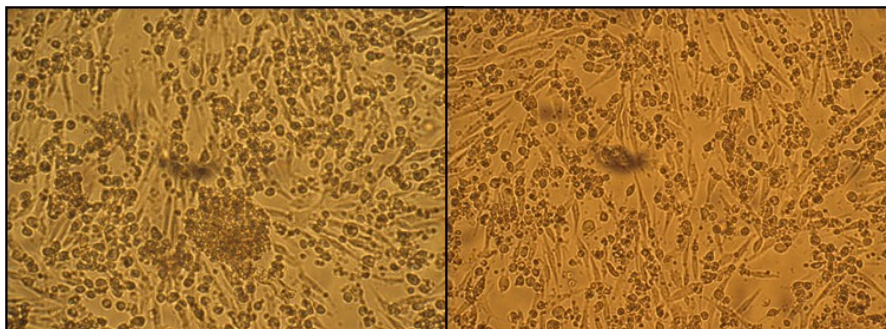


Рисунок 2 – Инфицированный монослой культуры клеток 3-КГ, 72 ч

Для отработки эффективного накопления вакцинного вируса оспы полученный 4-й пассаж был протитрован на культуре клеток 3-КГ и использован в дальнейшем для отработки технологической схемы накопления вируса оспы, которая включала определение множественности заражения, сроков инкубации инфицированных клеток и активности получаемого вируса оспы (ВО).

Для проведения серии экспериментов нами были сформированы 4 группы матрасов, содержащие линию клеток 3-КГ с монослоем клеток на 85–100% поверхности. В первой группе матрасов вирус оспы вносили в дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл. Во второй группе множественность заражения составила 0,1 ТЦД₅₀/кл, в третьей – 0,5 ТЦД₅₀/кл, в четвертой – 1,0 ТЦД₅₀/кл. При поражении 85–100% клеточного монослоя отбирали пробы вирусосодержащего материала согласно схеме опытов для определения инфекционной активности вируса. В качестве контроля использовали интактную линию клеток 3-КГ (таблица 2).

Таблица 2 – Динамика накопления вируса оспы штамм «НИСХИ» «КМИЭВ-V140» в линии клеток 3-КГ при стационарном культивировании

№ группы	Множественность заражения, ТЦД ₅₀ /кл	Количество клеток, млн.кл/матр	Срок культивирования вируса с клетками, часы				
			24	48	72	96	120
			титр вируса, lg MLD ₅₀ /мл, (±0,25 lg)				
1-я	0,01	35,0±3,6	–	–	4,0	5,0	5,25
2-я	0,1	35,0±3,6	–	4,25	5,5	6,0	–
3-я	0,5	35,0±3,6	–	5,0	5,75	5,5	–
4-я	1,0	35,0±3,6	–	4,75	4,5	4,0	–
Контроль	интактная	35,0±3,6	–	–	–	–	–

Из таблицы 2 видно, что максимальное накопление вируса отмечалось к 72 часам культивирования при дозе 0,5 ТЦД₅₀/кл и к 96 часам при 0,1 ТЦД₅₀/кл, при этом титр инфекционной активности составил 5,5–6,0 lgТЦД₅₀. При более низкой дозе вируса (0,01 ТЦД₅₀/кл) ЦПД начиналось в более поздние сроки и достигало 85–100% к 96–120 часам от начала инкубирования. При множественности 1,0 ТЦД₅₀/кл максимальный титр составил 4,75 lgТЦД₅₀ к 48 часам и снижался при дальнейшем культивировании. Наиболее рациональной и экономически обоснованной была множественность заражения 0,1–0,5 ТЦД₅₀/кл при культивировании 72–96 часов с поражением 85–100% клеточного монослоя.

По отработанной лабораторной схеме стационарно в 1,5-литровых матрасах РУ была накоплена биомасса вируса оспы. Культивирование вируса проводили в течение 72–96 часов. По истечении указанного времени содержимое флаконов с выраженным ЦПД вируса на монослое клеток замораживали, размораживали и объединяли, затем определяли стерильность и титр вируса в культуральной жидкости хранили полученный материал при минус 40⁰С и использовали при подборе оптимальной защитной питательной среды для лиофильного высушивания вируса оспы. С этой целью использовали сыворотку крови КРС и ЭТС, пептон, желатозу, сахарозу, ГЛА.

Лиофилизацию вирусной суспензии проводили на установке для лиофильного высушивания с программным обеспечением фирмы “Krist” (Германия) в течение 48–72 часов.

При подборе стабилизирующей защитной среды испытывали два варианта. Одна среда состояла из сахарозы, пептона и желатозы, вторая – из гидролизата лактальбумина, сахарозы и желатозы. Качество защитной среды определяли по сохранению инфекционной активности вируса после лиофилизации в сравнении с инфекционной активностью до нее. Инфекционную активность вируса оспы овец определяли титрованием на культуре клеток 3-КГ.

Для создания экспериментального образца вакцины против оспы овец использовали вирусосодержащую жидкость с титром 5,8 lg ТЦД₅₀/см³. Вирусосодержащую культуральную жидкость размораживали, соединяли с защитной средой в процентном соотношении 60:40 и подвергали лиофилизации в течение 48 ч в объеме 2,0 и 4,0 мл. Результаты влияния защитной среды на сохранение вируса при лиофилизации представлены в таблице 3. Таблица 3 – Влияние защитной среды на сохранение инфекционной активности вируса оспы овец при лиофилизации

Защитная среда	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³		Достоверность, Р
	до лиофилизации	после лиофилизации	
Сахароза Пептон Желатоза	5,8	5,3	<0,05
ГЛА Сахароза Желатоза	5,8	5,5	<0,05

Как видно из таблицы 3, лучшие результаты по сохранности вируса оспы и формированию вакцинной «таблетки» были получены с использованием компонентов ГЛА+желатоза+сахароза+сыворотка крови КРС в соотношении 60% вирусосодержащей жидкости и 40% защитной среды. Титр активности вируса при высушивании снижался на 0,2–0,5 lgТЦД₅₀. В ходе проведенных исследований было установлено, что при одинаковых компонентах защитной среды высушивания нормальная сыворотка крови КРС выполняет консервирующую функцию не хуже эмбриональной сыворотки и является более дешевым компонентом.

Сконструированную живую лиофилизированную вакцину против оспы овец контролировали по внешнему виду, остаточной влажности, растворимости, наличию вакуума, контаминации бактериальной и грибковой флорой, безвредности, биологической и антигенной активности.

Контроль внешнего вида вакцины. Наличие посторонних примесей, дефектов флаконов определяли визуально. По внешнему виду экспериментальный образец вакцины представляет собой однородную сухую пористую массу в виде таблетки светло-желтого - светло-коричневого цвета, отделяющуюся от стекла при встряхивании.



Рисунок 3 – Вакцина живая лиофилизированная для профилактики оспы овец

Определение массовой доли влаги (в соответствии с ГОСТ 24061-89). Массовая доля влаги в препарате не должна превышать 4,0%, в противном случае такая вакцина не будет храниться, а вирус быстро инактивируется.

- Массовая доля влаги в изготовленном нами препарате составила $2,5 \pm 0,2\%$.

Для определения растворимости в два флакона вносили водный раствор натрия хлорида с массовой долей 0,9% (рН 7,2) в количестве, соответствующем объему вакцины до высушивания. После этого флаконы

встряхивали и наблюдали за растворением сухой массы. При легком встряхивании вакцина должна растворяться без остатка за 2-3 минуты и представлять собой гомогенную взвесь.

- Вакцина растворялась без остатка в течение одной минуты при легком встряхивании и представляла собой гомогенную взвесь.

Наличие вакуума во флаконах с вакциной определяли аппаратом типа Д'Арсонваль (согласно ГОСТ 28083). Фиолетово-синее свечение внутри флаконов и характерное потрескивание указывает на наличие вакуума. Препараты во флаконах, не давших свечения или с фиолетово-красным свечением, не пригодны для применения.

- Установлено фиолетово-синее свечение внутри флаконов с экспериментальными образцами вакцины и характерное потрескивание, что указывает на наличие вакуума.

Проверку изготовленного экспериментального образца вакцины на контаминацию бактериальной и грибковой флорой проводили путем посева на специальные питательные среды, используемые для культивирования того или иного вида микроорганизмов. Для определения контаминации аэробными и факультативно-анаэробными микроорганизмами производили посев вакцины на МПБ и МПА, для определения присутствия анаэробов – на среду Китта-Тароцци, для определения грибково-плесневого загрязнения – на агар Сабуро.

Брали 3 флакона вакцины и содержимое каждого флакона растворяли в водном растворе натрия хлорида с массовой долей 0,9% (рН 7,2) в объеме, равном объему вакцины до высушивания, соблюдая стерильность, и объединяли в общую пробу. Затем делали высевы по 0,3 см³ в пробирки с мясо-пептонным агаром (МПА) и с агаром Сабуро, и по 0,5–1,0 см³ в пробирки с мясо-пептонным печеночным бульоном (МППБ) под вазелиновым маслом, используя по 2 пробирки каждой из указанных питательных сред. Питательные среды с посевами выдерживали в термостате в течение 10 дней при (37±0,5)⁰С, а агар Сабуро – от плюс 20 до плюс 24 ⁰С. Через 10 дней пробирки с посевами проверяли визуально на наличие роста микроорганизмов. Вакцину считали стерильной, если ни в одной из засеянных пробирок не наблюдался рост.

- В посевах из вакцины рост бактериальной и грибковой микрофлоры отсутствовал, следовательно, экспериментальный образец вакцины против оспы овец стерилен.

При определении безвредности препарат вводили подкожно в объеме 1,0 см³ в верхнюю часть внутренней поверхности бедра в пяти и десятикратной иммунизирующей дозах (в 1 см³) 3–5 месячным овцам, используя по 3 животных на каждую дозу. Два животных служили контролем (вводили физиологический раствор).

- Вакцина в течение 10 суток наблюдения не вызывала у овец клини-

ческих признаков заболевания. В течение первых суток наблюдения отмечалось учащение дыхания и незначительный подъем температуры до 40,5°C. У двух животных, привитых десятикратной дозой вакцины, на месте введения образовывались незначительные уплотнения, которые исчезли на 4-е сутки наблюдения.

При определении иммуногенной активности 3–5-тимесячных овец прививали в однократной иммунизирующей дозе (не менее 3,0 lg ТЦД₅₀) и для подтверждения надежности защиты – в 0,1-кратной прививной дозе (2,0–3,0 lg ТЦД₅₀). Перед иммунизацией и через 21 сутки после нее у опытных и двух контрольных животных отбирали пробы крови, получали сыворотку, которую исследовали в реакции нейтрализации на культуре клеток на наличие вируснейтрализующих антител. Титр антител к вирусу оспы вычисляли по общепринятой методике Рида и Менча и выражали в логарифмах с основанием 2 (log₂). Результаты исследования сывороток крови приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Титры антител у иммунизированных против оспы животных

Группа наблюдения и номер животного	Титры антител до вакцинации, log ₂	Прививная доза вируса в вакцине	Титр антител на 21 день, log ₂	Доза вируса в РН, ТЦД ₅₀ /0,1 см ³
Опыт 1, №2920	0	1000 ТЦД ₅₀	4,25	100
Опыт 1, №1820	0	1000 ТЦД ₅₀	4,5	100
Опыт 1, №1831	0	1000 ТЦД ₅₀	4,0	100
Опыт 2, №1972	0	100 ТЦД ₅₀	3,5	100
Опыт 2, №6604	0	100 ТЦД ₅₀	3,75	100
Опыт 2, №2424	0	100 ТЦД ₅₀	3,0	100
Контроль, №1864	0	–	0	100
Контроль, №1810	0	–	0	100

Как видно из таблицы, все животные имели титры антител на уровне защитного (не менее 3,0 log₂), даже в группе животных №2, которые получили при иммунизации 100 ТЦД₅₀ (1/10 прививной дозы вакцины). У контрольных животных и в сыворотках крови до иммунизации титры антител не выявлены.

После проведения комиссионных лабораторных испытаний был подготовлен пакет НТД, вакцина прошла регистрационные испытания в Белгосветцентре и включена в реестр ветеринарных препаратов Республики Беларусь.

ВЫВОДЫ

1 Разработана технология изготовления живой лиофилизированной вакцины против оспы овец: подобрана оптимальная клеточная модель и питательная среда для выращивания культуры клеток 3-КТ, отработана технологическая схема и параметры накопления вирусной биомассы, а также защитная стабилизирующая питательная среда и условия высушивания вируса оспы.

2 Вакцина прошла лабораторные испытания на соответствие техническим условиям: внешний вид, посторонние примеси, массовая доля влаги, растворимость, наличие вакуума, стерильность, безвредность и иммуногенная активность.

ЛИТЕРАТУРА

1 Адамс, Р. Методы культуры клеток для биохимиков / Р. Адамс. – М.: Мир, 1983. – 263 с.

2 Аттестации перевиваемых клеточных линий – субстратов производства и контроля медицинских и иммунобиологических препаратов : методические указания. – М., 1989. – 33 с.

3 Дмитриев, А.Ф. Особенности эпизоотического процесса оспы овец в Ставропольском крае / А.Ф. Дмитриев, В.И. Дорофеев, В.И. Дегтярев // Вестник ветеринарии. 1999. III. – С. 68–70.

4 Нургазиев, Р.З. О распространенности оспы овец и мерах борьбы с нею в некоторых странах мира / Р.З. Нургазиев, Г.К. Акматова, Э.Д. Иманов // Мониторинг распространения и предотвращения особо опасных болезней жив-х: сб. матер, конф. Самарканд, 2004. – С. 131–133.

5 Особо опасные болезни животных И.А. Бакулов, В.М. Котляров, Т.А. Владова [и др.]. – Покров: ВНИИВВиМ, 2002. – С. 97–106.

6 Хухоров, И.Ю. Оспа овец в странах СНГ / И.Ю. Хухоров // Биологоэколог, проблемы заразных болезней диких жив-х и их роль в патологии с/х. жив-х и людей: матер. Междунар. науч.-практ. конф. Покров, 2002. – С. 206–211.

7 Эпизоотология оспы овец / Э.Д. Иманов, Н. Нурмарбетов, К.Р. Рыскулов [и др.] // Актуал. пробл. с.-х. биотехнологии: матер, конф. – Гвардейский, 1998. – 128 с.

8 Epidemiology of sheep pox L.M. Belwal, A.E. Nivsarkar, P.B. Mathur, R.M. Singh Trop. Anim. Hlth. Prod. 1982. – №14. - P. 229–233.

Згировская А.А., кандидат биологических наук
Минчук Ю.Н., кандидат ветеринарных наук
Гусев А.А., доктор ветеринарных наук, профессор
Ломако Ю.В., кандидат ветеринарных наук
Ананчиков М.А., кандидат ветеринарных наук
Ероховец Н.Ф., научный сотрудник
Бабак В.А., кандидат ветеринарных наук
Пунтус И.А., младший научный сотрудник

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

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ЖИВОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ

ВВЕДЕНИЕ

Репродуктивно-респираторный синдром свиней (PPCC) – высококонтагиозное инфекционное заболевание, проявляющееся поражением органов репродуктивной системы у свиноматок и органов респираторной системы у поросят.

Официальное название - репродуктивно-респираторный синдром свиней (Porcine reproductive and respiratory syndrome – PRRS) – принято в 1992 году на 1-м Международном симпозиуме по PPCC в США. Инфекция контролируется Международным эпизоотическим бюро (МЭБ). Быстрому распространению вируса способствуют его длительная персистенция в организме зараженных животных, присутствие в сперме, высокая контагиозность [1, 2].

PPCC впервые зарегистрировали в свиноводческих хозяйствах США и Канады в 1986–1987 гг. В последующие годы заболевание распространилось по всему миру и к середине 90-х годов охватило почти всю Европу. По официальным данным неблагополучными в отношении PPCC являются 56 стран мира.

В 1997–2002 гг. в 47 субъектах Российской Федерации проведен эпизоотологический и серологический мониторинг, результаты которого подтвердили широкое распространение вируса PPCC на территории России.

В Республике Беларусь впервые диагноз PPCC был поставлен учеными ВНИИЗЖ (г. Владимир, РФ) в 1995–1997 гг. в некоторых свиноводческих комплексах при исследовании органов абортированных плодов и сывороток крови свиноматок. Впоследствии диагноз был

подтвержден учеными РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского» [3].

В результате возникновения и развития РРСС хозяйства и предприятия терпят значительные экономические убытки, которые складываются из потерь, вызванных нарушением воспроизводительной функции у свиноматок и хряков, гибелью новорожденных и послеотъемных поросят, обострением вторичных инфекций, а также от вынужденного убоя товарных животных.

Установлено, что в течение первого месяца после начала заболевания потери среди животных на откорме и отъемышей увеличиваются в четыре раза, среднее число поросят на свиноматку снижается с 21,1 до 18,1. При этом стоимость мероприятий, связанных с профилактикой и лечением секундарных инфекций, на протяжении 12 месяцев после вспышки РРСС в среднем на 60% выше, чем в период до возникновения инфекции.

В свиноводческих хозяйствах Беларуси у поросят в группах дорашивания регистрируются заболевания органов дыхания, характеризующиеся угнетением, отказом от корма, посинением кожи ушей, учащенным дыханием, кашлем и диареей у части больных животных. Выбытие (падеж и вынужденный убой) поросят в этих группах достигает 20–30%. Основной причиной инфекционной патологии органов дыхания у поросят в группах дорашивания является вирус репродуктивно-респираторного синдрома. При исследовании 7418 проб сывороток крови свиней антитела к вирусу РРСС выявлены в 52% случаев, что указывает на широкую циркуляцию вируса в свиноводческих стадах [4, 5].

В этой связи возникает необходимость в проведении иммунизации поросят, в первую очередь, против РРСС, а затем – и против вторичных инфекций. Продолжительность пассивного колострального иммунитета у поросят к вирусу РРСС и возбудителям бактериальных инфекций составляет около 30–50 дней. После отъема от матерей поросята лишаются колострального иммунитета и становятся восприимчивыми к РРСС. Возникает потенциальная угроза появления вторичных инфекций.

В литературе имеется ряд сообщений о том, что проведение вакцинации поросят против РРСС в послеотъемный период позволяет снизить их заболеваемость пневмониями, повысить среднесуточные привесы и сохранность животных.

В Республике Беларусь вакцины против репродуктивно-респираторного синдрома свиней не производятся, в связи с чем разработка и изготовление таких вакцин в настоящий момент актуальны.

Цель работы: разработать технологию изготовления вакцины живой против репродуктивно-респираторного синдрома свиней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование вируса РРСС штамма «КМИЭВ-V112» осуществляли на перевиваемой культуре клеток Marc-145. Для культивирования вируса использовали 48-часовой монослой культуры, выращенный в клинских матрасах в стационарных условиях. Перед заражением культуры клеток из флаконов удаляли ростовую среду, монослой отмывали фосфатно-солевым буфером от продуктов жизнедеятельности клеток. Затем культуру клеток заражали вирусом РРСС и помещали в термостат при температуре $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ на 1 час. После контакта матрасы заливали поддерживающей питательной средой Игла МЕМ с глутамином, обогащенной 2% фетальной сыворотки. Ежедневно в течение 3–7 суток за матрасами вели наблюдение (световая микроскопия). Матрасы с ярко выраженными цитопатическими изменениями замораживали при температуре минус 80°C для хранения и дальнейшего использования. Цитопатическое действие (ЦПД) вируса РРСС проявлялось в округлении клеток культуры Marc-145, то есть происходила потеря поверхностных выступов (филлоподий и псевдоподий) и в конечной стадии наблюдался клеточный коллапс.

Определение биологической активности вируса РРСС производили путем титрования на перевиваемой культуре клеток Marc-145. Сущность титрования основана на цитопатическом действии вируса, то есть способности его вызывать деструкцию клеток монослоя.

Для титрования вируса РРСС использовали 2–3-суточный монослой культуры клеток Marc-145, выращенный в пробирках или пенициллиновых флаконах. Вначале готовили 10-кратные разведения (от 10^{-1} до 10^{-7}) вирусосодержащего материала на среде Игла без сыворотки (рН 7,0–7,4). Каждое разведение вируса готовили отдельной стерильной пипеткой. Предварительно из пробирок сливали ростовую среду, вносили по $0,1 \text{ см}^3$ разведенного вируса. Каждое разведение вируса вносили в 4 пробирки с культурой клеток. После 1 часа контакта добавляли $0,9 \text{ см}^3$ питательной среды и инкубировали при температуре 37°C . Одновременно ставили контроль с незараженной культурой клеток. На вторые сутки проводили первый учет результатов титрования вируса. Каждую пробирку просматривали под малым увеличением микроскопа и отмечали ЦПД вируса (условно в крестах). Окончательный учет результатов проводили через 144 часа после заражения культуры клеток. Результаты титрования считали достоверными при сохранении монослоя в контроле. Титр вируса вычисляли по методу Рида и Менча и выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

После накопления достаточного количества вирусосодержащего материала и проверки его титра проводили подбор стабилизирующей среды: одна среда состояла из сахарозы, пептона и желатозы, вторая - из гидролизата лактальбумина, сахарозы и желатозы. Качество защитной среды определяли по сохранению инфекционной активности вируса до

лиофилизации и после. Инфекционную активность вируса определяли титрованием на культуре клеток Marc-145.

Лиофилизацию вирусной суспензии проводили на установке для лиофильного высушивания с программным обеспечением фирмы "Krist" (Германия) в течение 48 часов.

После окончания сушки флаконы под вакуумом плотно закупоривали пробками и обкатывали алюминиевыми колпачками.

Изготовленную вакцину против РРСС контролировали на основании требований, предъявляемых к ветеринарным препаратам, которые изложены в инструкции о порядке регистрации ветеринарных препаратов в Республике Беларусь, ГОСТ 23050-78 (по внешнему виду, остаточной влажности, растворимости, наличию вакуума, контаминации бактериальной и грибковой микрофлорой, микоплазмами, безвредности, биологической и антигенной активности).

Контроль внешнего вида вакцины, наличие посторонних примесей, дефектов флаконов осуществляли визуально.

По внешнему виду вакцина должна представлять собой однородную сухую пористую массу в виде таблетки от светло-желтого до светло-коричневого цвета. Допускается слегка розоватый оттенок.

Определение массовой доли влаги проводили в соответствии с ГОСТ 24061-89, которая не должна превышать 3,0%.

Для определения растворимости в два флакона вносили водный раствор натрия хлорида с массовой долей 0,9% (рН 7,2) в количестве, соответствующему объему вакцины до высушивания. После этого флаконы встряхивали и наблюдали за растворением сухой массы. При легком встряхивании вакцина должна растворяться без остатка за 2–3 минуты и представлять собой гомогенную взвесь.

Наличие вакуума во флаконах с вакциной определяли аппаратом типа Д'Арсонваль согласно ГОСТ 28083.

Фиолетово-синее свечение внутри флаконов и характерное потрескивание указывает на наличие вакуума. Содержимое флаконов, не давших свечения или с фиолетово-красным свечением, не пригодно для применения.

Проверку изготовленного образца вакцины на контаминацию бактериальной и грибковой микрофлорой проводили путем посева на специальные питательные среды, используемые для культивирования того или иного вида микроорганизмов. Брели 3 флакона вакцины и содержимое каждого флакона растворяли водным раствором натрия хлорида с массовой долей 0,9% (рН 7,2) в объеме, равном объему вакцины, до высушивания, соблюдая стерильность, и объединяли в общую пробу. Затем делали высева по 0,3 см³ в пробирки с мясо-пептонным агаром (МПА) и со средой Сабуро, и по 0,5–1,0 см³ в пробирки с мясо-пептонным печеночным бульоном (МППБ) под вазелиновым маслом, используя по 2 пробирки каждой из

указанных питательных сред. Питательные среды с посевами выдерживали в термостате в течение 10 дней при $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$, а со средой Сабуро – от плюс 20 до плюс 24 $^{\circ}\text{C}$. Через 10 дней пробирки с посевами проверяли визуально на наличие роста микроорганизмов. Вакцину считали стерильной, если ни в одной из засеянных пробирок не наблюдался рост.

Полученный образец проверяли на контаминацию микоплазмами путем посева его на полужидкий агар. Высевы инкубировали в термостате при температуре $(37,0 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ 7-8 суток, после чего проводили 3 последовательных пересева с интервалом 7 суток.

Рост микоплазм в образцах вакцины не допускается.

Безвредность вакцины против РРСС проверяли на мышах массой 20–25 г и поросятах 21–28-суточного возраста. По принципу аналогов были сформированы по 2 группы животных каждого вида – опытная и контрольная. Мышам и поросятам опытных групп вводили внутримышечно 10-кратную иммунизирующую дозу вакцины. Контрольным животным вводили физиологический раствор (плацебо) в том же объеме, что и опытным вакцину. За животными вели клиническое наблюдение в течение 14 суток.

Вакцина не должна вызывать у вакцинированных мышей и поросят в течение 14 суток клинических признаков заболевания и видимых изменений тканей в месте введения вакцины. Допускается повышение температуры тела животного на $1,5^{\circ}\text{C}$ в течение 3-5 дней после введения вакцины.

Биологическую активность вакцины определяли титрованием на перевиваемой линии культуры клеток Marc-145. Для этого содержимое трех флаконов вакцины растворяли стерильным водным раствором натрия хлорида с массовой долей 0,9% (рН 7,2) до объемов, равных объему вакцины до сушки, затем образцы объединяли и из объединенной пробы вакцины отбирали 1 см^3 . Из отобранной пробы вакцины в пробирках готовили разведения от 10^{-1} до 10^{-7} на стерильном водном растворе натрия хлорида с массовой долей 0,9% (рН 7,2). Каждым разведением вакцины заражали по четыре пробирочные культуры клеток Marc-145. Учет результатов проводили по цитопатическому действию вируса на ткань, которое выражалось небольшими шарообразными скоплениями клеток, выступающими над монослоем. Клетки округлялись, т.е. теряли поверхностные выступы (филлоподии и псевдоподии) и в конечной стадии разрушались. Окончательный учет результатов проводили через 96–120 часов после заражения. Титр вируса рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина.

Биологическая активность должна быть не ниже $5,5\text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Антигенную активность вакцины проверяли на 6 поросятах 21–28-дневного возраста, не имеющих в сыворотке крови антител к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней. Содержимое 3-х

флаконов растворяли стерильным 0,9% раствором натрия хлорида в объеме, указанном на этикетке. Затем содержимое флаконов объединяли. Четырем пороссятам вводили внутримышечно вакцину в объеме 2 см³, два поросенка служили контролем, им вводили внутримышечно физиологический раствор. Через 10 суток поросят опытной группы ревакцинировали в том же объеме. Через 21 сутки после последней вакцинации у всех животных отбирали кровь с целью получения сыворотки для определения наличия антител к вирусу РРСС методом твердофазного иммуносорбентного ферментного анализа. Для определения наличия в сыворотках антител к вирусу РРСС использовали набор ANIGEN PRRSV AB ELISA 2.0 производства Animal Genetics (Корея). Во всех пробах сывороток крови животных контрольной группы не должны выявляться антител к вирусу РРСС.

Через 21 день после вакцинации у животных должны образовываться антитела. Проба сыворотки крови оценивается как положительная, если соотношение S/P (отношение проба:положительный контроль) больше или равно 0,4. Проба сыворотки оценивается как отрицательная, если соотношение S/P меньше 0,4.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первый этап работы заключался в оптимизации параметров культивирования вируса РРСС штамма «КМИЭВ–V112» в культуре клеток Marc-145: определение заражающей дозы вируса, времени инкубации инфицированной культуры клеток и инфекционной активности вирусосодержащего материала (титр). В таблице 1 представлены результаты определения зависимости накопления титра вируса и заражающей дозы вируса от времени инкубации инфицированных культуры клеток.

Таблица 1– Влияние заражающей дозы вируса и времени инкубации вируса РРСС на культуры клеток Marc–145 на титр вируса

Заражающая доза, ТЦД ₅₀	Титр, lg ТЦД _{50/см} ³			
	24 часа	48 часов	72 часа	96 часов
1000	2,9	3,1	4,6	4,2
100	2,5	4,0	5,6	5,4
10	2,5	2,7	5,5	5,5
1	1,5	1,7	2,1	2,9

Как видно из таблицы, вирусосодержащую культуральную жидкость с максимальным инфекционным титром (5,4–5,6 lg ТЦД_{50/см}³) получали при заражении культуры клеток в дозах 10 и 100 ТЦД₅₀. При этом время инкубации составляло 72–96 часов. Заражение более высокой дозой (1000

ТЦД₅₀) не вело к увеличению инфекционной активности полученного вирусосодержащего материала.

Таким образом, определено, что заражающая доза вируса РРСС штамма «КМИЭВ-V112» не должна превышать 100 ТЦД_{50/см}³, так как ее увеличение не ведет к увеличению накопления вируса в культуральной жидкости.

Следующий этап нашей работы заключался в получении вируса РРСС в достаточных объемах для создания опытной партии вакцины.

Накопление вирусосодержащего материала проводили путем заражения 2–3-суточной культуры клеток Marc-145 вирусом РРСС в дозе 10–100 ТЦД_{50/см}³ стационарно в 1,5-литровых матрасах. Культивирование вируса проводили в течение 72–96 часов. По истечении указанного времени, содержимое флаконов с выраженным ЦПД вируса на монослой клеток, объединяли, определяли титр вируса в культуральной жидкости и хранили при температуре минус 80°C.

Для создания партии вакцины против РРСС использовали вирусосодержащую жидкость с титром не ниже 5,5 lg ТЦД_{50/см}³. Вирусосодержащую культуральную жидкость размораживали, соединяли с защитной средой в процентном соотношении 60:40 и подвергали лиофилизации в течение 72 часов. Результаты влияния защитной среды на сохранение вируса при лиофилизации представлены в таблице 2.

Таблица 2– Влияние защитной среды на сохранение инфекционной активности вируса РРСС при лиофилизации

Защитная среда	Титр вируса, lg ТЦД _{50/см} ³	
	до лиофилизации	после лиофилизации
Сахароза Пептон Желатоза	5,6±0,21	5,2±0,34
Гидролизат лактальбумина Сахароза Желатоза	5,6±0,28	5,5±0,12

Как видно из таблицы 2, наиболее оптимальной при лиофилизации вируса РРСС являлась стабилизирующая среда, состоящая из гидролизата лактальбумина, сахарозы и желатозы.

Вакцина по внешнему виду представляет собой однородную сухую пористую массу в виде таблетки светло-желтого цвета.

Массовая доля влаги в препарате составила 2,9%.

Вакцина растворилась без остатка в течение 2–3 минут при легком встряхивании и представляла собой гомогенную взвесь.

В изготовленной вакцине бактериальная и грибковая микрофлоры, она не контаминирована микоплазмой, установлено наличие вакуума во флаконах.

Вакцина не вызывала у вакцинированных мышей и поросят в течение 14 суток клинических признаков заболевания и видимых изменений тканей в месте введения препарата, следовательно, проверяемая вакцина является безвредной и неореактогенной.

Титр вируса в полученной партии вакцины против РРСС составлял $5,6 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Результаты изучения влияния иммунизации поросят вакциной живой сухой против РРСС на образование антител представлены в таблице 3.

Таблица 3– Наличия антител к вирусу РРСС в сыворотках крови поросят после их вакцинации (метод ИФА)

Количество поросят	Выявление антител к вирусу РРСС (соотношение S/P*)	
	до вакцинации	после вакцинации
1	0,36	0,63
2	0,28	0,77
3	0,18	0,51
4	0,21	0,68
5 (контроль)	0,24	0,21
6 (контроль)	0,27	0,11

Примечание – * проба считается положительной, если соотношение S/P больше или равно 0,4; при соотношении S/P меньше 0,4 сыворотка считается серонегативной

Таким образом, установлено, что проверяемая вакцина вызывает образование антител к вирусу РРСС, так как соотношение S/P в сыворотках крови подопытных поросят составляет 0,51–0,77 оптических единиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана система культивирования вируса РРСС из штамма «КМИЭВ–V112» на перевиваемой культуре клеток Marc–145, изготовлена живая сухая вакцина против репродуктивно-респираторного синдрома свиней и проведена ее проверка на соответствие параметрам контроля, разработанным согласно инструкции о порядке регистрации ветеринарных препаратов в Республике Беларусь, ГОСТ 23050–78.

ЛИТЕРАТУРА

1 Байбиков, Т.З. Репродуктивно-респираторный синдром свиней / Т.З. Байбиков // Вет. врач.–2000.–№2.–С.20–24.

2 Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина.–М.:ВНИТИБП,1998.–С.552-558.

3 Выделение вируса РРСС и его адаптация к перевиваемой линии клеток MARC-145 / Н.С. Дудникова и др. // Ветеринария.–2002.–№6.–С.23–25.

4 Голубев, Д.Б. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии / Д.Б. Голубев, А.А. Соминина, М.Н. Медведева.–Л.:Медицина,1976.–С.59–61.

5 Мищенко, В.А. Состояние и перспективы исследований по репродуктивно-респираторному синдрому свиней / В.А. Мищенко // Актуал. вопр. вет. вирусол.: матер. науч.-практ. конф. ВНИИВВиМ «Классическая чума свиней-неотложные проблемы науки и практики».–Покров,1995.– С.148–151.

Ломако Ю.В., кандидат ветеринарных наук, доцент

Зубовская И.В., кандидат ветеринарных наук

Амосова Л.А., кандидат ветеринарных наук

Карпович В.К., ветеринарный врач

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии имени С.Н. Вышеского», г. Минск

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ВАКЦИНЫ (КСКП) ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОЛИБАКТЕРИОЗА, САЛЬМОНЕЛЛЕЗА, КЛЕБСИЕЛЛЕЗА И ПРОТЕОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

ВВЕДЕНИЕ

Важную роль в этиологии желудочно-кишечных инфекций молодняка крупного рогатого скота играют условно-патогенные микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*, которые, вследствие воздействия на макроорганизм неблагоприятных факторов, приобретают свойства полноценных патогенов. К таким возбудителям относятся кишечная палочка, сальмонелла, клебсиелла, протей и др.

При этом данные возбудители чаще всего встречаются в ассоциациях как друг с другом, так и с другими бактериями и вирусами, что приводит к более тяжелому течению болезни, а также затрудняет постановку диагноза, выбор средств лечения и профилактики [1, 5, 6, 7].

Ветеринарная отчетность, а также собственные бактериологические исследования показывают, что патогенные энтеробактерии очень часто выделяются при патологиях желудочно-кишечного тракта у телят. Следует отметить, что факторы патогенности возбудителей (эндо-, экзотоксины, гемолизины и др.) обуславливают сверхострое течение болезни, при котором не успевают развиться характерные клинические признаки, и животное погибает за несколько часов от острого токсикоза. При вскрытии павших телят нами наблюдалась паткартина поражения почек и мочеточников.

В инфекционной патологии крупного рогатого скота в Республике Беларусь колибактериоз занимает первое место. Число выявляемых неблагополучных пунктов по этой болезни от общего количества всех неблагополучных по инфекционным заболеваниям крупного рогатого скота пунктов за последние годы составляло 38,3% (270 неблагополучных пунктов).

Среди выделяемых изолятов кишечной палочки 31,6% типизируются в РА с антиадгезивными колисыворотками. Изоляты, типизируемые в РА с О - колисыворотками, составляют 45,6%. Причем, следует отметить, что в 2011–2012 гг. отмечался стабильный рост процента выделяемости изолятов

E.coli, содержащих адгезивные антигены F41 и A20 (17–30 %). Количество изолятов *E.coli*, содержащих несколько адгезивных антигенов, достигает 20%.

Заболеваемость телят сальмонеллезом занимает второе место после колибактериоза. Ежегодно регистрируют в среднем 162 неблагополучных пункта по сальмонеллезу. Причем, среди выделяемых из патологического материала сальмонелл наиболее часто типизируются *Sal. dublin* – 68,5% и *Sal. typhimurium* – 23,7%.

Кроме вышеуказанных болезней в Республике Беларусь ежегодно регистрируется около 20 – 40 пунктов, неблагополучных по протейной инфекции телят (это составляет около пяти процентов от общей инфекционной патологии). Данная инфекция характеризуется высокой заболеваемостью и летальностью телят от 22 до 56%. Чаще всего протейная инфекция протекает в ассоциации с колибактериозом. В основном изолируется протей двух разновидностей – *Proteus mirabilis* и *Proteus vulgaris*, причем чаще регистрируется *Proteus mirabilis* [8].

Что касается *Klebsiella pneumoniae*, то процент идентификации данного возбудителя из патологоанатомического материала составляет в среднем 15,5%.

Для лечения и профилактики вышеуказанных инфекций апробировано большое количество антибактериальных средств [4].

Однако, при применении химиотерапевтических средств при бактериальных инфекциях не всегда достигается необходимый эффект, что обусловлено развитием резистентности возбудителей к применяемым антибиотикам для лечения желудочно-кишечных заболеваний [5]. К тому же антибактериальные препараты оказывают отрицательное влияние на формирование постинфекционного и поствакцинального иммунитета [2, 3, 9]. Важное место в мероприятиях по борьбе с этими возбудителями занимает специфическая профилактика, которая основана на иммунизации маточного поголовья в период глубокой стельности.

В Республику Беларусь из-за рубежа завозятся вакцины для профилактики желудочно-кишечных инфекций: вакцина ассоциированная инактивированная против колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протейной инфекции молодняка сельскохозяйственных животных и пушных зверей (вакцина ОКЗ) («Агровет», Россия), Комбовак – К. Однако эти вакцины не всегда достаточно эффективны, поскольку не учитывают особенностей эпизоотической ситуации в нашей стране.

Нами разработана технология изготовления ассоциированной вакцины, включающей одновременно антигены *E. coli*, *S. dublin*, *S. typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, – вакцина инактивированная эмульгированная для профилактики колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протееза крупного рогатого скота. Данный биопрепарат уже зарегистрирован в Государственном реестре ветеринарных препаратов Республики

Беларусь (№ 3816–10–12 БВБИЖ от 25.04.2012г.) и производится на опытно-промышленном участке РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Целью настоящих исследований являлось подтвердить эффективность применения разработанной нами вакцины в производственных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для изготовления инактивированной вакцины использовали запатентованные штаммы: адгезивные *E. coli* F41 КМИЭВ – 98, *E. coli* A20 КМИЭВ – 39А, *E. coli* K99 КМИЭВ-38, энтеротоксигенный штамм *E.coli* O18 КМИЭВ – 18, штаммы сальмонелл *S. dublin* КМИЭВ В – 115 и *S. typhimurium* КМИЭВ В – 128, а также штаммы *Proteus mirabilis* КМИЭВ – 44 и *Klebsiella pneumoniae* КМИЭВ-В132. В качестве адьюванта использовали Montanide ISA 206 VG (фирма Seppic, Франция) с массовой долей адьюванта 50%. Это современный адьювант на основе минерального масла, который создает эмульсию вода-масло-вода. Наружная водная фаза придает вакцине высокую текучесть и способность вызывать кратковременный иммунитет. Внутренняя водная фаза, включенная в капельки масла, замедляет высвобождение антигена, поддерживая долговременный иммунитет. Концентрация микробных клеток в 1 см³ готовой вакцины составила $2,5 \times 10^9$ м.т.

Перед проведением производственных испытаний определяли стерильность вакцины, безвредность, реактогенность и иммуногенную активность на лабораторных животных по общепринятым методикам.

Для проведения производственных испытаний выбрали хозяйства, неблагополучные по желудочно-кишечным инфекциям телят: СПК «Доброволец» Кличевского района Могилевской области и ОАО «Весейский Покров» Слуцкого р-на Минской области. В каждом из этих хозяйств сформировали по две группы животных – опытную и контрольную. Животных опытной группы иммунизировали за 45–30 дней до предполагаемого отела. Вакцину вводили внутримышечно однократно в области шеи в дозе 2 см³. Телят, полученных от вакцинированных коров, иммунизировали однократно на 20–25-й день жизни внутримышечно в область шеи в объеме 1,0 см³. Животных контрольной группы иммунизировали вакциной ОКЗ (Россия) в соответствии с инструкцией. За телятами опытных и контрольных групп вели наблюдение, регистрируя их заболеваемость и гибель. После рождения и на 30-й день жизни всех подопытных телят взвешивали для определения общего и среднесуточного прироста живой массы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты лабораторных испытаний вакцины показали, что опытные образцы вакцины были стерильны, безвредны, низко реактогенны и

высоко иммуногенны для лабораторных животных.

У привитых коров и телят мы не отмечаем побочных явлений в виде повышения местной и общей температуры тела.

Результаты клинических наблюдений за телятами, полученными от коров контрольных и опытных групп двух хозяйств, показаны в таблице. Таблица – Определение эффективности вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протеоза крупного рогатого скота

Показатели	Единицы измерения	Опытная группа "Доброволец"	Контрольная группа "Доброволец"	Опытная группа "Весейский покров"	Контрольная группа "Весейский покров"
Количество телят в группах	голов	36	36	150	100
Среднесуточный прирост живой массы 1 головы	г	603	512	538	421
Заболело с признаками гастроэнтерита:	голов	3	14	16	29
	%	8,3	38,9	10,7	29,0
Из них пало	голов	2	10	5	26
Летальность от гастроэнтеритов	%	5,6	27,8	3,3	26,0
Сохранность	%	94,4	72,2	96,7	74,0
Профилактическая эффективность	%	91,7	61,1	89,3	71,0
Экономический эффект, руб. на 1 руб. затрат		7,2	2,3	7,3	2,5

Данные таблицы показывают, что за время опыта среди животных опытной группы в ОАО «Доброволец» заболело с клиническими признаками гастроэнтерита 3 телят (8,3%), в контрольной группе 14 голов (38,9%). Из числа заболевших в опытной группе пало 2 телят (5,6%), а в контрольной – 10 (27,8%). Следовательно, сохранность телят в опытной группе составила 94,4%, в контрольной группе – 72,2%. Среднесуточный прирост живой массы опытных телят составил 603 г, а контрольных – 512 г.

В СПК «Весейский Покров» установлено, что при применении разработанной нами вакцины в опытной группе заболело с клиническими признаками гастроэнтерита 16 телят (10,7 %), в контрольной группе – 29 телят (29%). Из числа заболевших в опытной группе пало 5 животных (3,3%), а в контрольной – 26 (26%). Следовательно, сохранность телят в опытной группе составила 96,7%, в контрольной группе – 74,0%. Среднесуточный прирост живой массы опытных телят составил 538 г, контрольных – 421 г.

Экономический эффект от применения нашей вакцины в ОАО «Доброволец» составил 7,2 руб./руб. затрат, что на 4,9 руб. больше, чем при применении российского аналога; в СПК «Весейский Покров» данный показатель был на уровне 7,3 руб./руб. затрат, что на 4,8 руб./руб. затрат больше, чем в контрольной группе.

ВЫВОДЫ

1 Разработанная в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии имени С.Н. Вышелесского» вакцина инактивированная эмульгированная для профилактики колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протеза крупного рогатого скота – безвредный, низкореактогенный и высокоиммунотенный препарат.

2 Однократное применение вакцины стельным коровам и полученным от них телятам позволяет снизить летальность телят на 22,2 – 22,7 % и повысить профилактическую эффективность на 18,3 – 30,6 % по сравнению с применением российского аналога.

3 Экономический эффект от применения разработанной нами вакцины составил 7,2 – 7,3 рубля на 1 рубль затрат, что на 4,8 – 4,9 рубля выше, чем при применении вакцины ОКЗ.

Вакцина инактивированная эмульгированная для профилактики колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протеза крупного рогатого скота разработана с учетом результатов анализа эпизоотической ситуации в хозяйствах Республики Беларусь и на основании тщательного мониторинга циркулирующих возбудителей. Поэтому ее эффективность доказана не только при производственных испытаниях. Сегодня разработанная нами вакцина успешно применяется более чем в сорока хозяйствах республики, неблагополучных по желудочно-кишечным инфекциям телят.

ЛИТЕРАТУРА

1 Андросик, Н.Н. Эпизоотический и бактериологический мониторинг по сальмонеллезу крупного рогатого скота / Н.Н. Андросик, О.Н. Локтева // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2007. – № 3. – С. 4–11.

2 Блажева-Цонева, Л.С. Роль микробов рода *Proteus* в этиологии желудочно-кишечных заболеваний телят: автореф. дис. канд. биол. наук. 16. 00. 03 /Л.С. Блажева-Цонева, моск. вет. акад. – М., 1990 – 16с.

3 Верещагин, И.А. Чувствительность бактерий рода *Proteus* к антибиотикам / И.А. Верещагин, М.И. Войченко, Л.М. Мартынова // Антибиотики и химиотерапия. – 1995. – т.40. - №9. – С.35 – 37.

4 Карпуть, И.М. Иммунология и иммунопатология болезней молодняка. – Мн.: Ураджай, 1993. – 288 с., – ил.

5 Курлович, Д.В. Доминирующие микроорганизмы при острых желудочно-кишечных заболеваниях телят в хозяйствах Беларуси / Д.В. Курло-

вич, В.К. Карпович // Ветеринарная наука – производству: научные труды / Белорусский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии. – Минск, 1999. – Вып. 34. – С. 146–150.

6 Максимович, В.В. Эпизоотическая ситуация по инфекционным болезням животных в Республики Беларусь / В.В. Максимович // Современные вопросы патологии сельскохозяйственных животных материалы международной научно-практической конференции, Минск. 23 – 24 октября 2003 г. – Минск, 2003. – С. 209–211.

7 Мищенко, В.А. Особенности течения массовых диарей у новорожденных телят / В.А. Мищенко [и др.] // Современные аспекты ветеринарной патологии и животных: матер. конф., Владимир, 1998 / Всерос. НИИ защиты ж-х, редкол.: А. А. Гусев [и др.]. Владимир. 1998. – С. 103 – 106.

8 Опарина, И.В. Эпизоотическая ситуация по острым желудочно-кишечным заболеваниям бактериальной этиологии у телят в Республике Беларусь / И.В. Опарина, Ю.В. Ломако // Экология и животный мир. – 2011. – № 1. – С. 60–66.

9 Профилактика инфекционных болезней животных / Ковалев Н.А., Музычин С.И., Бутьянов Д.Д. [и др.]; под ред. Ковалева Н.А. – Мн.: Ураджай. – 1988. – 175с.

Ковалев Н.А., доктор ветеринарных наук, профессор
Гусев А.А., доктор ветеринарных наук, профессор
Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор
Усеня М.М., кандидат ветеринарных наук
Бучукури Д.В., кандидат ветеринарных наук
Бутько Л.В., кандидат ветеринарных наук *

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

**ГУО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск*

**ВАКЦИНА ПРОТИВ БЕШЕНСТВА, ЧУМЫ,
ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА И ИНФЕКЦИОННОГО
ГЕПАТИТА ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ.
ЧАСТЬ 1. РЕПРОДУКЦИЯ И ИНАКТИВАЦИЯ
ВАКЦИННЫХ ВИРУСОВ**

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство, чума, инфекционный гепатит и парвовирусный энтерит – наиболее распространенные вирусные болезни плотоядных животных, наносящие значительный экономический ущерб и представляющие социальную опасность.

Бешенство является исключительно опасным, абсолютно смертельным заболеванием всех теплокровных животных и человека и занимает одно из ведущих мест в инфекционной патологии. Заболевание бешенством имеет широкое распространение во многих странах мира, в т.ч. и в Беларуси. Причем напряженность эпизоотической ситуации по этой инфекции вследствие ее природно-очагового характера, несмотря на проводимые профилактические мероприятия практически не снижается.

Так, если в 2008 г. на территории республики бешенство было выявлено у 1053 животных, то в 2011 у 1108. Положение усугубляется напряженной эпизоотической обстановкой в сопредельных государствах. Эпизоотия бешенства создает реальную угрозу здоровью и жизни людей, так как обращаемость населения в связи с укусами, оцарапываниями и ослюнениями животными, в том числе и бешеными, в последние годы возросла до 23-28 тыс. случаев в год. В 2000-2011 гг. отмечены 8 случаев гибели от бешенства людей [3, 4, 5, 6, 11].

Одной из основных мер борьбы с бешенством была и остается антирабическая вакцинация. Вакцинопрофилактика бешенства имеет вековую историю. Созданная впервые Л.Пастером мозговая вакцина в свое время сыграла большую роль в борьбе с бешенством. Однако она имела ряд существенных недостатков. За прошедшие годы появилось много различных

модификаций антирабических вакцин, авторы которых стремились повысить их иммуногенные свойства с одной стороны путем отбора новых вакцинных штаммов и повышения стабильности вакцины при хранении, с другой – путем изыскания иных систем (кроме мозга) культивирования вируса бешенства, а также способов очистки вируса от сопутствующих балластных веществ и инактивации инфекционности входящего в состав вакцин вируса.

Для изготовления антирабических вакцин используются следующие штаммы вируса бешенства: Парижский штамм Пастера, PV-11 или PM, SAD, SAD B-19, SAG, CVS, Flury Lep, Flury Hep, Kelev, ERA, VRG, Внуково-32, ТС-80, 71-БелНИИЭВ-ВГНКИ, РВ-97, КМИЭВ-94 и др. [6].

В ветеринарной практике в настоящее время применяются как живые культуральные, так и инаktivированные антирабические вакцины.

Живые аттенуированные вакцины готовят, как правило, на основе культур клеток (Vero, почка сирийского хомячка, ВНК-21, почка поросенка, сайги и др.) или развивающихся куриных эмбрионов.

В Республике Беларусь, России, как и во многих других странах, парентеральное применение живых антирабических вакцин запрещено. В России производятся и используются следующие инаktivированные культуральные антирабические вакцины: – вакцина из штамма Внуково-32; – вакцина из штамма вируса бешенства Щелково-51 [8]; – вакцина из штамма ТС-80 [1]; – вакцина из штамма РВ-97 (дериват штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ) [2].

В Беларуси РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского» разработана и производится жидкая культуральная адсорбированная инаktivированная вакцина из штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ и его модификации КМИЭВ-94 [5,6].

Существенный удельный вес в инфекционной патологии плотоядных животных занимает чума [10]. К чуме плотоядных восприимчивы собаки, норки, песцы, соболи, хорьки, серебристо-черные лисицы и другие звери всех возрастов. При чуме у животных поражаются дыхательная, иммунная, кровеносная, нервная и пищеварительная системы. Летальность молодняка пушных зверей и собак при вспышке чумы плотоядных может достигать 80–100%, а взрослых животных 30–50%. Возбудитель устойчив к действию внешних факторов.

В выделениях больных животных вирус во внешней среде при температуре плюс 4⁰С сохраняется до 15 дней. Источником инфекции являются больные и переболевшие животные, выделяющие вирус различными путями.

Для профилактики чумы плотоядных в Республике Беларусь применяются следующие вакцины: живая культуральная моновакцина российского производства, а также поливалентные вакцины: Гексаканивак, Биофак, Мультикан-4, Мультикан-8, Гексадог, Нобивак, Эурикан, Пентадог.

Парвовирусная инфекция собак, которая впервые была зарегистрирована в 1976 г. в Бельгии, в настоящее время широко распространена во многих странах мира. Парвовирусным энтеритом (ПВЭ) болеют собаки, могут болеть кошки, лисицы, еноты, песцы, норки и другие животные. Данное заболевание, как правило, имеет стационарный характер с охватом значительного количества животных. Наибольшую опасность она представляет для щенят в возрасте до 6 месяцев. У них летальность составляет 25 %, но может достигать и 80 % [9, 10, 12]. Хотя официальной статистики по указанному заболеванию в Беларуси нет, косвенные источники (объемы вакцинаций) позволяют судить о его значительном распространении.

Самым надежным способом профилактики парвовирусного энтерита является вакцинация. Для этой цели используются инаktivированные и живые аттенуированные вакцины [10, 12]. Из инаktivированных вакцин в странах СНГ в настоящее время используют препарат «Биовак. Д» из штамма Геркулес, препарат фирмы «Ветзероцентр» из штамма Д (в моновалентном виде и как компонент ассоциированных вакцин).

Живые вакцины против парвовирусного энтерита готовят из аттенуированных штаммов парвовируса собак (ПВС) или вируса панлейкемии кошек. Для этой цели применяют моновалентные вакцины из ПВС ЗАО «Фирма Ветзероцентр», Вангард Рирру CPV (Пфайзер), Биовак Д (ООО «Биоцентр»), Нобивак Парво-С (Интервет), Квантум Р (Питман-Муур), Коммандер Parvo MLV (Биокар), Неомар (Неотех) и др. [12].

Инфекционный гепатит или болезнь Рубарта – острая контагиозная болезнь плотоядных, протекающая с лихорадкой, воспалением конъюнктивы, слизистой оболочки носовой полости, желудочно-кишечного тракта, печени и желчного пузыря, а иногда и с поражением центральной нервной системы. Возбудителем заболевания является аденовирус 1 го типа (СAB-1) [10].

В естественных условиях к инфекционному гепатиту восприимчивы собаки всех возрастов и пород, а также лисицы, песцы, еноты и другие пушные звери. Продолжается болезнь от нескольких дней до 2 – 3 недель, инкубационный период составляет 3–9 дней. Летальный исход чаще наблюдается у щенков. Возбудитель заболевания устойчив к воздействию физико-химических факторов. В секретах больных животных он сохраняет активность до нескольких месяцев, при замораживании и высушивании до 3 – 5 лет. Высокая температура действует на вирус губительно, при 100⁰С он теряет вирулентность за 1 минуту.

С целью профилактики заболевания в ряде стран применяют инаktivированные вакцины. Эти вакцины после двукратного введения вызывают не менее чем у 85% животных напряженный иммунитет продолжительностью до 1 года. Разработано около 20 живых вакцин на основе аттенуированных штаммов. Вакцины против инфекционного гепатита чаще

всего ассоциируют с другими компонентами – вирусами чумы, бешенства и парвовирусного энтерита плотоядных [9, 12].

Вакцины против указанных заболеваний в Республике Беларусь не производятся, а закупаются по импорту, главным образом в России, Голландии, Франции. Поэтому разработка и налаживание производства поливалентной вакцины против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных будет иметь важное экономическое значение и позволит сократить затраты валюты на закупку за рубежом аналогичного препарата. Особенно если учесть, что в Беларуси ежегодно прививается около 900 тыс. собак против бешенства, парвовирусного энтерита и чумы и свыше 900 тыс. норок против чумы. Наши исследования были посвящены созданию поливалентной вакцины против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита, инфекционного гепатита плотоядных животных. На первом этапе работы необходимо было разработать рациональные способы накопления вакцинного сырья и отработать способы его инактивации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Штаммы вирусов

Фиксированный вирус бешенства штамм КМИЭВ-94 был селекционирован в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» из штамма 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ и адаптирован к культурам клеток Vero, РС, ВНК-21.

Вирусы парвовирусного энтерита собак штамм КМИЭВ-14в, чумы плотоядных штамм КМИЭВ-12В и инфекционного гепатита штамм КМИЭВ-83 селекционированы из выделенных от собак эпизоотических штаммов и адаптированы: парвовирус к культурам клеток CrFK и MDCK, вирус чумы к культуре клеток Vero, вирус инфекционного гепатита – культуре клеток MDCK.

Эталонный фиксированный вирус бешенства штамм CVS в виде мозговой культуры получен из лаборатории профилактики бешенства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. В ИЭВ им. С.Н. Вышелесского депонирована его мозговая культура.

Культуры клеток

Для культивирования фиксированного вируса бешенства использовали перевиваемую культуру клеток ВНК-21/13, вируса парвовирусного энтерита собак – культуру клеток CrFK, вируса чумы плотоядных – культуру клеток Vero, инфекционного гепатита – культуру клеток MDCK.

Фармпрепараты

Для инактивации вакцинных вирусов использовали теотропин по ТУ 931004200495549-М производства ООО «Веда М» ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии (Покров)

Титрация вирусов

Титрование вируса бешенства проводили на белых мышах, а также методом RFFIT по общепринятым методикам [7].

Титрацию вируса парвовирусного энтерита проводили в РГА со свинными эритроцитами и с помощью ИФА. Титрацию вируса чумы плотоядных проводили на культуре клеток Vero, а инфекционного гепатита на культуре клеток MDCK по общепринятым методикам [7, 10].

Определение контаминации вирусных материалов бактериями и грибами проводили по ГОСТ 28085-89 и ГФ 11, вып. 2, с. 196-197, 2000-2001, ГФ Р.Б., Т.1. 2012. На питательных средах с посевами роста колоний бактерий и грибов не допускалось.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение вирусного сырья для изготовления вакцины

Культивирование вирусов проводили роллерным в 2-литровых роллерах или статическим в 1,5-литровых матрасах способами при температуре $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Скорость вращения роллеров составляла 8-12 об/мин. В качестве питательной среды использовали среды Игла или Игла MEM с добавлением 2-10 % сыворотки крупного рогатого скота.

Вируса вносили в питательную среду одновременно с клетками, концентрация которых составляет 0,1-0,2 млн./мл. Для культивирования вируса бешенства использовали клетки ВНК-21/13, вируса чумы плотоядных – клетки VERO, вируса парвовирусного энтерита – клетки CrFK, вируса инфекционного гепатита-клетки- MDCK. Заражающая доза вируса бешенства составляла 0,1-0,6 $\text{MLD}_{50}/\text{кл}$, вируса чумы плотоядных – $0,6\pm 0,14 \text{ TKID}_{50}/\text{кл}$, вируса парвовирусного энтерита – 0,0005 ГАЕ/кл, вируса инфекционного гепатита-0,1-0,3 $\text{TKID}_{50}/\text{кл}$

Контроль состояния зараженного клеточного монослоя осуществляли ежедневно путем просмотра матрасов и роллеров под микроскопом. Урожай собирали через 3-7 суток культивирования. С целью разрушения клеток и высвобождения вирусных частиц в культуральную жидкость матрасы и роллеры замораживали при температуре минус $18-20^{\circ}\text{C}$ в течение 18 и более часов. Нарботанный вирусный материал проверяли на титр вируса, бактериальную и грибковую контаминацию по общепринятым методикам.

Все четыре вирусных материала были стерильными в отношении бактериальной и грибковой флоры.

Наибольшее накопление вирусов происходило при роллерном способе выращивания. Так, титр вируса бешенства при роллерном способе культивирования составлял 7,0 lg и был на 0,2 lg выше, чем при статическом способе, титр вируса чумы плотоядных – 4,5 lg или на 0, 5 lg выше, титр вируса инфекционного гепатита-5,0 lg или на 0, 5 lg выше, титр парвовирусного энтерита - $10,0 \log_2$ или на $2 \log_2$ выше, чем при стационарном способе культивирования (таблица 1).

Таблица 1– Накопление вакцинных вирусов бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита, плотоядных при различных способах культивирования

№ п/п	Наименование вирусов	Наименование культур клеток	Титр вируса при культивировании	
			роллерным способом	в статических условиях
1	Вирус бешенства	ВНК-21/13	7,0±0,2	6,8±0,25
2	Вирус чумы плотоядных	Vero	4,5±0,2	4,0±0,1
3	Вирус парвовирусного энтерита	CrFK	10,0±1,0	8,0±1,0
4	Вирус инфекционного гепатита	MDCK	4,5±0,1	5,0±0,1

Примечание – 1. Титр вируса бешенства указан в lg MLD₅₀/мл, вируса чумы плотоядных, инфекционного гепатита в ТЦД₅₀/мл, вируса парвовирусного энтерита в log₂. Данные приведены по 3 повторностям

Инактивация вирусов

Теотропин добавляли к вирусам до конечной концентрации 0,05; 0,1 и 0,15% и выдерживали в термостате при температуре 37°C, периодически перемешивая. Через 0, 12, 24 и 36 часов отбирали пробы материала и тестировали на инфекционную активность: вирус бешенства путем интрацеребральной инокуляции белым мышам в дозе 0,03 мл, вирус ПВС путем заражения культуры клеток CrFK в дозе 4-8 ГАЕ на пробирку, вирус чумы плотоядных путем заражения культуры клеток Vero в дозе 0,6 ТКИД₅₀/кл. вирус инфекционного гепатита путем заражения культуры клеток МДСК в дозе 0,3 ТКИД₅₀/кл. Исследования проводили в 3-х повторностях.

Было установлено, что теотропин в концентрации 0,1 и 0,15% через 24 и 36 часов при температуре 37°C полностью инактивировал все четыре вируса. В меньшей концентрации и в более короткие сроки препарат лишь снижал титры вирусов (таблица 2).

В дальнейшей своей работе для инактивации вирусов мы использовали временной интервал инактивации 24 часа и 0,15%-ную концентрацию теотропина, как более полно гарантирующие её полноту.

Таблица 2 – Биологическая активность вирусов бешенства, парвовирусного энтерита, чумы и инфекционного гепатита плотоядных после инактивации теотропином

№ п/п.	Концентрация теотропина, %	Титр вируса до инаktivации	Время инаktivации, часов	Титр вируса после инаktivации
Вирус бешенства				
1.	0,05	6,5±0,2	12	6,1±0,2
2.	0,1	6,9±0,3		5,0±0,1
3.	0,15	6,2±0,2		4,0±0,1
4.	0,05	6,8±0,1	24	1,8±0,1
5.	0,1	6,6±0,2		0
6.	0,15	6,5±0,2		0
7.	0,05	6,1±0,1	36	1,5±0,1
8.	0,1	6,2±0,1		0
9.	0,15	6,5±0,2		0
Вирус ПЭС				
1.	0,05	8,0±0,5	12	7,0±0,5
2.	0,1	8,0±0,5		6,0±0,5
3.	0,15	8,0±0,5		4,0±0,5
4.	0,05	7,0±0,5	24	3,0±0,5
5.	0,1	7,0±0,5		0
6.	0,15	7,0±0,5		0
7.	0,05	9,0±0,5	36	2,0±0,5
8.	0,1	9,0±0,5		0
9.	0,15	9,0±0,5		0
Вирус чумы плотоядных				
1.	0,05	3,6±0,2	12	3,5±0,2
2.	0,1	3,6±0,2		3,0±0,2
3.	0,15	3,6±0,2		2,9±0,2
4.	0,05	3,6±0,2	24	1,9±0,2
5.	0,1	3,6±0,2		0
6.	0,15	3,6±0,2		0
7.	0,05	3,5±0,1	36	1,2±0,1
8.	0,1	3,5±0,1		0
9.	0,15	3,5±0,1		0
Вирус инфекционного гепатита плотоядных				
1.	0,05	4,5±0,2	12	4,4±0,2
2.	0,1	4,5±0,2		4,0±0,2
3.	0,15	4,5±0,2		3,4±0,2
4.	0,05	5,0±0,2	24	2,5±0,2
5.	0,1	5,0±0,2		0
6.	0,15	5,0±0,2		0
7.	0,05	5,0±0,1	36	1,5±0,1
8.	0,1	5,0±0,1		0
9.	0,15	5,0±0,1		0

Примечание – титры антител к вирусу бешенства, чумы плотоядных и инфекционному гепатиту указаны в lg, к вирусу ПЭС – в log₂; * P <0,01

ВЫВОДЫ

1 Для конструирования тетравакцины использовали вирус бешенства штамм КМИЭВ-94 с титром 6,8–7,0 lg, вирус чумы плотоядных штамм КМИЭВ-82 с титром 4,5 lg ТЦД, вирус парвовирусного энтерита штамм КМИЭВ-14в с титром 7,0–8,0 log₂, вирус инфекционного гепатита штамм КМИЭВ-83 с титром 4,5–5,0±1,0 lg

2 Эффективной для репродукции вируса бешенства является культура клеток ВНК-21/13, вируса чумы плотоядных – культура клеток Vero, вируса парвовирусного энтерита собак культура клеток CrFK, вируса инфекционного гепатита – культура клеток MDCK.

3 Вирус бешенства с наиболее высокими титрами репродуцируется роллерным способом, остальные вирусы в статистических условиях в 1,5-литровых матрасах или роллерным способом в 2-литровых флаконах. Урожай собирают через 3–7 суток культивирования после замораживания и оттаивания матрасов и флаконов.

4 Вирусное сырье полностью инактивируется теотропином в 0,15%-ной концентрации в течение 24 часов при температуре 37⁰С.

ЛИТЕРАТУРА

1 Вишняков, И.Ф., Инактивированная культуральная вакцина против бешенства. И.Ф. Вишняков, И.В. Никитин, В.В. Недосеков. //Ветеринария, 1998, №1, С.22–24.

2 Гочмурадов, М.Г., Усовершенствование технологии промышленного производства инактивированной вакцины против бешенства животных.// Автореф. дис. канд. вет. наук., Владимир. 1999. – С. 33.

3 Зибицкер, Д.Е., Бешенство и его профилактика. Зибицкер Д.Е., Ковалев Н.А. Мн.,//«Ураджай», 1970. – С. 200.

4 Ковалев, Н.А., Эпизоотическая ситуация и профилактика бешенства в Беларуси. Ковалев Н.А., Усеня М.М., Уласович П.А //Ветеринарная медицина Беларуси, №3, 2002 г. – С. 4-5.

5 Ковалев, Н.А., Разработка и изучение эффективности вакцины из штамма вируса 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ для иммунизации животных против бешенства Ковалев Н.А., Бучукури Д.В., Усеня М.М. // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук, 2007, № 2, -С. 80-87.

6 Ковалев, Н.А. Профилактика бешенства в Беларуси: состояние и проблемы Ковалев Н.А., Бучукури Д.В.// Ветеринарная наука производству: научные труды, выпуск 40: материалы научно-практической конференции «Основные патологии животных и современные технологии профилактики болезней» – Гродно, 2008. – Т. 2.–С – 80-87.

7 Методы лабораторных исследований по бешенству. –Женева, ВОЗ, 1975. – С. 353.

8 Патент РФ № 955577 от 20.04.1993 г. Кузнецов Н.Н., Иванов В.С. и др. Способ получения антирабической вакцины.

9 Сулимов А.А. и др. Парвовирусный энтерит собак. Сулимов А.А. М., 1984.

10 Сюрин В.Н. Вирусные болезни животных. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Т.В., Фомина Н.А. //М., -ВНИТИБП, 1988. – С. 928.

11Таршис М.Г. Бешенство животных. Таршис М.Г., Ковалев Н.А., Кузнецов П.П. //- Мн.: «Ураджай», 1990. – С. 168.

12 Шуляк Б.Ф. Вирусные болезни собак. Шуляк Б.Ф. // М., 2004. – С. 560.

Ковалев Н.А., доктор ветеринарных наук, профессор

Гусев А.А., доктор ветеринарных наук, профессор

Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор

Усеня М.М., кандидат ветеринарных наук

Бучукури Д.В., кандидат ветеринарных наук

Бутько Л.В., кандидат ветеринарных наук *

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

**ГУО «Белорусский государственный медицинский университет»*

ВАКЦИНА ПРОТИВ БЕШЕНСТВА, ЧУМЫ, ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА И ИНФЕКЦИОННОГО ГЕПАТИТА ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ. ЧАСТЬ 2. КОНСТРУИРОВАННЫЕ ВАКЦИНЫ И ИЗУЧЕНИЕ ЕЕ ИММУНОГЕННОСТИ

ВВЕДЕНИЕ

В части 1 была обоснована актуальность разработки отечественной вакцины против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных, представлены результаты отработки рационального способа накопления вакцинного сырья и способ его инактивации.

На втором этапе работы по созданию вакцины перед нами стояла **задача** – изыскать оптимальную концентрацию в ней гидроксала, разработать эффективную схему вакцинации и изучить её иммунологическую эффективность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подопытные животные

Исследования проводили на белых мышах, кроликах и собаках. Для опытов брали мышей массой 15 – 17 г, для титрации вируса и постановки реакции нейтрализации (РН) – массой 6 – 8 г. Использовали кроликов породы Шиншилла, преимущественно самцов, массой 2 – 3 кг и беспородных собак массой 10 – 15 кг.

Препараты. Штаммы вирусов

При конструировании вакцины использовали инаktivированные антигены вируса бешенства – штамм КМИЭВ – 94, вируса чумы плотоядных – штамм КМИЭВ –14В, вируса парвовирусного энтерита – штамм КМИЭВ 12В и вируса инфекционного гепатита – штамм КМИЭВ – 83

При изучении иммунологической эффективности сконструированного образца четырехвалентной вакцины контрольную группу кроликов и собак иммунизировали российской коммерческой вакциной Мультикан–8

(против чумы, аденовирусных инфекций, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, лептоспироза и бешенства).

Для исследований на бешенство мозга животных, а также для титрации вируса бешенства и определения титров антирабических антител в RFFIT использовали флюоресцирующий антирабический гамма-глобулин «Bio-Rad» французского производства и российский препарат.

Для выявления и титрования вируса парвовирусного энтерита собак использовали диагностический набор Парво-тест для ИФА производства компании «Нарвак» (Россия).

Для титрации в РГА парвовируса плотоядных и определения титра противопарвовирусных антител в РНГА использовали эритроциты свиньи.

В качестве адьюванта использовали – гидроксал по ГОСТ 18287.

Определение титров антител

Реакцию нейтрализации для определения титров вируснейтрализующих антирабических антител проводили на белых мышах, а также методом RFFIT по общепринятым методикам [8].

Титрацию антител к вирусу парвовирусного энтерита проводили в РТГА со свиньиными эритроцитами с 4 – 8 гемагглютинирующими единицами вируса. Титрацию антител к вирусу чумы плотоядных проводили на культуре клеток Vero, а к вирусу инфекционного гепатита на культуре клеток MDCK по общепринятым методикам [8, 13].

Определение контаминации вирусных материалов и вакцины бактериями и грибами проводили по ГОСТ 28085-89 и ГФ 11, вып. 2, с. 196-197, 2000 – 2001, ГФ Р.Б., Т.1. 2012. На питательных средах с посевами роста колоний бактерий и грибов не допускалось.

Определение безвредности и реактогенности вакцины

Объединенную пробу из трех флаконов после тщательного смешивания вводили 10 мышам в область подкожной клетчатки спины в объеме по 0,5 мл. Наблюдение за животными проводили в течение 10 дней. Результаты учитывали по отсутствию местных реакций и выживаемости животных.

Определение оптимальной концентрации гидроксала в вакцине

С целью определения оптимальной концентрации гидроксала в четырехвалентной вакцине в культуральные жидкости вируса бешенства, ПВЭ, инфекционного гепатита и чумы плотоядных добавляли 6% -й гидроксал в количестве 5 и 10%. Затем смесь вирусов с различным количеством гидроксала выдерживали, помешивая в течение 18 часов в холодильнике при температуре 4°C и центрифугировали при 4000 об/мин. в течение 20 минут. Надосадочную жидкость вируса бешенства титровали на белых мышах, вируса ПВЭ – в РГА, вируса чумы плотоядных на культуре клеток Vero, а инфекционного гепатита – на MDCK. С целью контроля титрации одновременно подвергали и исходные вирусы без добавления гидроксала. Оптимальным считалась то количество гидроксала, при котором он максимально сорбировал вирус. Опыт проводили в 3 повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты определения оптимальной концентрации гидроксала для сорбции вирусов, используемых для конструирования вакцины, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Титры вирусов бешенства, ПВЭ, чумы и инфекционного гепатита плотоядных в надосадочной жидкости после сорбции их гидроксалом различной концентрации

№ п/п	Количество гидроксала в смеси с вирусом, %	Время сорбции, часы	Температура сорбции, °С	Титры вируса в надосадочной жидкости
<u>Вирус бешенства</u>				
1.	5	18	4	4,3±0,1
2.	10	18	4	3,2±0,1
3.	Без гидроксала	–	–	6,75±0,2
<u>Вирус ПВЭ</u>				
1.	5	18	4	4,0±1,0
2.	10	18	4	2,0±1,0
3.	Без гидроксала	–	–	8,0±1,0
<u>Вирус чумы плотоядных</u>				
1.	5	18	4	3,0±0,2
2.	10	18	4	2,0±0,2
3.	Без гидроксала	–	–	3,6±0,2
<u>Вирус инфекционного гепатита</u>				
1.	5	18	4	4,5±0,2
2.	10	18	4	2,0±0,2
3.	Без гидроксала	-	-	5,0±0,2

Примечание – титры вируса бешенства, инфекционного гепатита и чумы плотоядных указаны в lg, вируса ПВЭ – в log₂; * P <0,01

Оптимальной концентрацией гидроксала для сорбции всех четырех вирусов является 10 об.%. Титр вируса бешенства при этом в надосадочной жидкости по сравнению с контролем снижался на 3,55 lg, титр вируса ПВЭ – на 6,0 log₂, титр вируса чумы плотоядных – на 1,0 lg, титр вируса инфекционного гепатита – на 2,5 log₂. В дальнейшем указанная концентрация гидроксала использовалась нами при изготовлении вакцины.

Конструирование экспериментального образца вакцины и изучение ее стерильности, безвредности иммуногенности

Для конструирования эффективного экспериментального образца вакцины против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных были приготовлены 3 варианта препарата из инактивированных теотропином неконтаминированных вирусов с добавлением 10 об% гидроксала по следующей схеме (таблица 2).

Таблица 2 – Схема компоновки вариантов вакцины

№ п/п	Антиген вируса	Объем антигенов (см ³) на 100 см ³ вакцины		
		1 вариант	2 вариант	3 вариант
1.	Бешенство	25,0	30,0	25,0
2.	Чума плотоядных	30,0	25,0	25,0
3.	Парвовирус	25,0	20,0	25,0
4.	Инфекционный гепатит	20,0	25,0	25,0

С целью проверки безвредности и иммунологической эффективности приготовленных вариантов вакцины в опыт были взяты 24 кролика, разделенных на 8 групп по 3 в каждой. Кроликам 1 группы введено внутримышечно по 2 см³ вакцины первого варианта, второй – такой же объем вакцины второго варианта, кроликам 3 группы – такой же объем вакцины третьего варианта. Кроликам четвертой группы вводили 0,7 см³ антигена вируса бешенства, пятой группе – 0,7 см³ антигена вируса чумы, шестой – 0,7 см³ антигена парвовирусного энтерита плотоядных, седьмой – 0,7 см³ антигена инфекционного вируса гепатита и восьмая группа кроликов вакцинированных вакциной Мультикан – 8 в объеме 2 см³, служила контролем. Препараты вводили дважды с интервалом 21 день.

Через 14 дней после вакцинации в сыворотке крови животных были определены титр антител против вирусов бешенства, чумы парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных. Результаты определения титра антител приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Титр специфических антител у кроликов, вакцинированных вариантами четырехвалентной жидкой культуральной инактивированной сорбированной вакцины против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и вирусного гепатита плотоядных

№ п/п	Варианты вакцин	Объем, см ³	Количество кроликов	Титры антител (log ₂) через 14 дней после вакцинации к вирусам			
				Бешенства log ₂	чумы log ₂	Парвови- русу log ₂	вирусного гепатита
1.	Первый	2,0	3	7,0±1,0	5,0±1,0	7,0±1,0	6,0±1,0
2.	Второй	2,0	3	6,0±1,0	6,0±1,0	7,0±1,0	7,0±1,0
3.	Третий	2,0	3	6,0±1,0	5,0±1,0	8,0±1,0*	7,0±1,0
Контроль							
4.	Антиген вируса бешенства	0,5	3	6,0±1,0			
5.	Антиген вируса чумы	0,5	3		5,0±1,0		
6.	Антиген парвовируса	0,5	3			8,0±1,0	
7.	Антиген вируса гепатита	0,5	3				7,0±1,0
8.	Вакцина Мультикан – 8	2,0	3	6,0±1,0	5,0±1,0	7,0±1,0	7,0±1,0

Примечание – * P < 0,01

Не отмечено достоверных отличий в показателях титра антител у кроликов, вакцинированных тремя вариантами сконструированной вакцины. Титр антител против вируса бешенства в РН на белых мышах составляли $6,0 \pm 1,0 - 7,0 \pm 1,0 \log_2$, титр антигемагглютининов к парвовирусному энтериту $7,0 \pm 1,0 - 8,0 \pm 1,0 \log_2$, титр вируснейтрализующих антител к вирусу чумы плотоядных $5,0 \pm 1,0 - 6,0 \pm 1,0 \log$, титр вируснейтрализующих антител к вирусу инфекционного гепатита $7,0 \pm 1,0$. Примерно такой же титр антител был и при вакцинации животных монокомпонентами вирусов в объемах, входящих в вакцину, а также вакциной Мультикан – 8, что свидетельствует об отсутствии конкуренции вирусов в вакцине, а также о том, что по своей иммуногенной эффективности сконструированная вакцина не уступает коммерческой.

Исходя из этого, за окончательный принят вариант вакцины, включающий антигены вирусов бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита, плотоядных в равных соотношениях.

Проверка иммунологической эффективности экспериментального образца четырехвалентной культуральной вакцины против бешенства, парвовирусного энтерита, вирусного гепатита и чумы плотоядных проведена в комиссионном опыте на собаках. С этой целью 10 собак были разделены на 2 группы, по 5 голов в каждой. Животные первой группы были вакцинированы экспериментальным образцом четырехвалентной вакцины двукратно по $2,0 \text{ см}^3$ с интервалом 21 день. Животные второй группы для контроля по такой же схеме вакцинированы Мультикан – 8. Вакцины вводили внутримышечно в области бедра. Наблюдение за животными вели в течение 40 дней с оценкой общего состояния и с выборочным измерением температуры. Через 14 дней после вакцинации у животных были отобраны пробы крови для определения титра антител.

Об иммунологической эффективности вакцины судили по титру специфических антител у вакцинированных животных. Результаты определения иммунологической эффективности сконструированного экспериментального образца вакцины представлены в табл.4

Таблица 4 – Титр специфических антител против вируса бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных у собак, вакцинированных четырехвалентной вакциной

№ Группы	Вакцина	Доза, см^3	Титр антител ($\log_2$) через 14 дней после вакцинации			
			антирабических	противопарвовирусных	противочумных	противогепатитных
1	4-х валентная	$2,0 \pm 2,0$	$6 \pm 1,0$	$8,0 \pm 1,0$	$5,0 \pm 1,0$	$6,0 \pm 1,0$
2	Мультикан-8	$2,0 \pm 2,0$	$6 \pm 1,0$	$7,0 \pm 1,0$	$5,0 \pm 1,0$	$6,0 \pm 1,0$

У животных, привитых сконструированной четырехвалентной вакциной, титр антител к вирусу бешенства, парвовирусу, вирусу чумы и инфекционного гепатита плотоядных на 14 день после вакцинации были относительно высокими и практически не отличались от титра антител у животных, вакцинированных вакциной Мультикан – 8. Все собаки в течение 40 дней после вакцинации оставались клинически здоровыми. Отсутствовала местная реакция на месте введения вакцин.

Следовательно, сконструированная вакцина является стерильным, безвредным и иммуногенным препаратом, не уступающим по эффективности российской вакцине Мультикан – 8.

Для установления срока годности сконструированной вакцины общая проба из 3-х ее серий была проверена на иммуногенную активность, бактериальную и грибковую контаминацию и безвредность через 6, 12 и 18 месяцев хранения при температуре 4 – 8°C.

Титр антител к вирусам бешенства, чумы, гепатита и ПВС определяли у 3 кроликов, вакцинированных сконструированной вакциной с различным сроком хранения внутримышечно в дозе 2 см³, двукратно с интервалом 21 день.

Установлено, что вакцина оставалась стерильной и безвредной в течение 18 месяцев. Хотя иммуногенная активность ее после 18-месячного срока хранения незначительно снижалась. Поэтому в условиях хранения при температуре 4 – 8°C оптимальным сроком годности вакцины следует считать 18 месяцев с момента изготовления (таблица 5).

Таблица 5 – Биологическая активность, стерильность и безвредность жидкой культуральной инактивированной сорбированной вакцины против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных через различные сроки хранения (n=3)

№	Показатели	Сроки хранения (месяцев) и титры антител (log ₂)		
		6	12	18
1	Иммуногенная активность	6±1	5±1	5±1
		8±1	7±1	6±1*
		5±1	4±1	4±1
		6±1	5±1	5±1
2	Стерильность	+	+	+
3	Безвредность	+	+	+

Примечание – «+» положительный результат; в каждой графе первыми указаны титры антител к вирусу бешенства, затем к парвовирусу, чуме и гепатиту; * P < 0,01

ВЫВОДЫ

1 Вакцина жидкая культуральная инактивированная сорбированная против бешенства, чумы парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных является безвредным, стерильным и высоко иммуногенным препаратом, который по своей иммунологической эффективности не уступает коммерческой вакцине зарубежного производства.

2 Способ изготовления вакцины включает репродукцию вирусов и их инактивацию и конструирование вакцины. Сконструированная вакцина в качестве вирусосодержащего материала включает смешанные в равных объемах антигены вируса бешенства, вируса чумы плотоядных, вируса ПВС, вируса инфекционного гепатита, в качестве адьюванта – гидроксид в концентрации 10 об%.

3 При иммунизации указанной вакциной кроликов и собак двукратно внутримышечно с интервалом 21 день в объеме $2,0 \text{ см}^3$ через 28 – 35 дней от начала иммунизации они имели более высокие титры антител $6,0 \pm 1,0 - 7,0 \pm 1,0 \log_2$ против вируса

бешенства, $5,0 \pm 1,0 - 6,0 \log_2$ против вируса чумы, $7,0 \pm 1,0 - 8,0 \pm 1,0 \log_2$ против ПВЭ, $- 7,0 \pm 1,0 \log_2$ против вирусного гепатита. Примерно такие же титры антител имели животные при иммунизации коммерческой вакциной Мультикан - 8. Следовательно, сконструированная вакцина может быть рекомендована для внедрения в практику.

4 Хранение при температуре плюс 4 – 8⁰С обеспечивает годность вакцины в течение 12 месяцев со дня изготовления.

5 На основании проведенных исследований разработаны ТНПА (ТУ, технологический регламент, инструкция по применению) на вакцину жидкую культуральную инактивированную сорбированную против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита плотоядных.

ЛИТЕРАТУРА

1 Barth, R. Vnukovo – 32 Primary hamster kidney cell vaccines for humans. Barth R. Franke V., Selimov M.A //Laboratory Techniques in Rabies. Word Health Organization. Geneva, 1996. –P.310 – 313.

2 Вишняков, И.Ф., Инактивированная культуральная вакцина против бешенства. Вишняков И.Ф., Никитин И.В., Недосеков В.В. //Ветеринария, 1998, №1. – С.22 – 24.

3 Гочмурадов, М.Г., Усовершенствование технологии промышленного производства инактивированной вакцины против бешенства животных.// Автореф. дис. канд. вет. наук., Владимир. 1999. – 33с.

4 Зибицкер, Д.Е., Бешенство и его профилактика. Зибицкер Д.Е., Ковалев Н.А. Мн.,//«Ураджай», 1970. – 200с.

5 Ковалев, Н.А., Эпизоотическая ситуация и профилактика бешенства в Беларуси. Ковалев Н.А., Усеня М.М., Уласович П.А //Ветеринарная медицина Беларуси, №3, 2002 г. – С. 4 – 5.

6 Ковалев, Н.А., Разработка и изучение эффективности вакцины из штамма вируса 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ для иммунизации животных против бешенства Ковалев Н.А., Бучукури Д.В., Усеня М.М. // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук, 2007, № 2, – С. 80 – 87.

7 Ковалев, Н.А. Профилактика бешенства в Беларуси: состояние и проблемы Ковалев Н.А., Бучукури Д.В // Ветеринарная наука производству: научные труды, выпуск 40: материалы научно-практической конференции «Основные патологии животных и современные технологии профилактики болезней» – Гродно, 2008. – Т. 2.– С. 80–87.

8 Методы лабораторных исследований по бешенству. –Женева, ВОЗ, 1975. – 353с.

9 Назаров, В.П. Бешенство животных. Назаров В.П.// – М., Сельхозгиз, 1961 – 160с.

10 Патент РФ № 955577 от 20.04.1993 г. Кузнецов Н.Н., Иванов В.С. и др. Способ получения антирабической вакцины.

11 Селимов М.А. Бешенство. Селимов М.А. – М., 1978, – 336 с.

12 Сулимов, А.А. и др. Парвовирусный энтерит собак. Сулимов А.А. М., 1984.

13 Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Т.В., Фомина Н.А. //М., –ВНИТИБП, 1988. – 928.с

14 Таршис, М.Г. Бешенство животных. Таршис М.Г., Ковалев Н.А., Кузнецов П.П. // – Мн.: «Ураджай», 1990. – 168с.

15 Шуляк, Б.Ф. Вирусные болезни собак. Шуляк Б.Ф. // М., 2004. – 560с.

Пунтус И.А., младший научный сотрудник
Бабак В.А., кандидат ветеринарных наук
Гусев А.А., доктор ветеринарных наук, профессор
Згировская А.А., кандидат биологических наук
Филипкова А.Е., ведущий биолог
Гром А.А., биолог
Волчецкая А.Ю., ведущий ветврач

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

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИН

ВВЕДЕНИЕ

Ветеринарная биологическая промышленность Республики Беларусь нуждается в современных технологиях, которые позволят сделать нашу продукцию «привлекательной» на внутреннем рынке и конкурентоспособной на внешнем. Промышленное производство биопрепаратов представляет собой сложный комплекс взаимосвязанных физических, химических, биохимических процессов.

Одним из ключевых моментов производства вакцин является процесс масштабирования поверхностнозависимых и суспензионных культур клеток.

В криобанке отдела культуры клеток и питательных сред РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» в настоящее время хранится более 30 линий перевиваемых культур клеток, из них 9 находятся в постоянной работе и применяются для проведения научно-практических исследований и в производственных целях. Наиболее часто используемые в работе линии – Marc-145, BHK-21(c-13), SPEV (СПЭВ), MDBK, PK-15, 3КГ.

Кроме того, 3–4 линии первично-трипсинизированных клеток актуальны для работы с вирусами и не могут быть заменены в силу высокой специфичности и чувствительности к отдельным вирусным штаммам. Например, в ветеринарной практике в настоящее время остаются актуальными вопросы культивирования вируса болезни Марека, реовируса, накопление которых проводится на первичной культуре фибробластов SPF-эмбрионов (specific pathogen free – свободные от специфических патогенов) перепелов (ФЭП) [4, 5, 7].

Питательные среды, на которых выращиваются культуры клеток, являются источником питательных веществ, поэтому они должны содержать весь спектр аминокислот, витаминов и солей в соотношениях, строго

соответствующих потребности клеток. Недостаток или избыток тех или иных компонентов в среде может стать фактором торможения клеточного роста. Большинство стандартных культуральных питательных сред не отвечают потребностям каждого вида клеток, что в свою очередь не дает возможность получить высокие коэффициенты пролиферации клеток и обеспечить получение высококачественного биологического материала для последующего изготовления конкурентоспособных вирусных препаратов.

Разработка новых или модификация уже используемых в работе питательных сред необходима в связи с особенностями энергетического метаболизма разных культур клеток. Вся работа в этом направлении основана на особенностях физиологии каждой конкретной линии. Кроме вышеперечисленного, некоторые клетки являются весьма чувствительными к определенным факторам роста, содержащимся в питательных средах (сыворотка крови, глюкоза, витамины, инсулин, аминокислоты), которые способны обеспечить высокие коэффициенты пролиферации клеток. Немаловажным показателем является и концентрация водородных ионов (pH) в питательной среде, который в ряде случаев является лимитирующим фактором в процессе роста клетки. Добавление HEPES-буфера (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) позволяет получать более стабильные в буферном отношении среды, обеспечивающие высокую пролиферативную активность клеток [2].

Не только химический состав питательных сред обеспечивает их высокое качество. Питательные среды должны быть стерильными, нетоксичными и обеспечивать возможность корректно вести визуальный контроль за ростом клеток. Соблюдение технологии изготовления, стерилизации и хранения питательных сред является важным этапом в работе с линиями клеток.

Широкий спектр использования культур клеток и предлагаемых для работы культуральных питательных сред поставил перед нами **задачу** подобрать оптимальные культуральные питательные среды собственного изготовления к конкретной линии клеток, изучить посевные концентрации и ростовые свойства клеточных культур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для эффективного роста перевиваемых и первичных культур клеток различного происхождения в отделе была проведена работа по подбору синтетических и ферментативных питательных сред, различающихся аминокислотным, витаминным и солевым составом для конкретной производственной линии клеток в условиях определенных схем и методов культивирования [5]. В экспериментальных исследованиях использовались монокомпонентные синтетические и ферментативные среды, а также их различные модификации, приведенные в таблице 1, которые готовились в условиях отдела культур клеток и питательных сред.

Таблица 1 – Питательные среды, используемые для культивирования клеток

Синтетические	Ферментативные
Minimum Essential medium Eagle (MEM) на солевом растворе Хенкса (Sigma)	ФГМ-С (ферментативный гидролизат мышечных белков) 0,3%
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) на солевом растворе Хенкса (Sigma)	ГЛА (гидролизат лактальбумина) 0,5%
Medium 199 на солевом растворе Хенкса (Sigma)	

Воду для приготовления культуральных питательных сред получали с помощью системы очистки воды «Sartorius» и системы деионизации воды «Milli-Q Academic» с финишной очисткой через картридж Millipak-40 на 0,22 мкм.

Растворение синтетических питательных сред осуществляли путем разведения сухих порошков в небольшом количестве деионизированной воды с последующим доведением до требуемого объема. Ферментативные питательные среды готовили на солевом растворе Хенкса путем растворения навесок солей в строгой последовательности согласно прописи [2].

Для обогащения питательных сред использовали раствор глюкозы, L-глутамин. Обогащение сред D-глюкозой проводили на этапе подготовки к стерилизации, так как глюкоза обладает хорошей растворимостью и не разрушается при хранении питательных сред при температуре +2–8°C в течение всего срока годности среды. Добавление L-глутамин проводили непосредственно перед работой с питательной средой, так как он весьма нестабилен – время полураспада в среде при 4°C около 3 недель, при 37°C – около недели. В связи с этим порошок глутамин, расфасованный во флаконы, подвергали γ -стерилизации и хранили при температуре +4–8°C. Глутамин вносили непосредственно перед использованием в работе, предварительно растворив порошок глутамин в небольшом объеме питательной среды.

Показатель концентрации водородных ионов (pH) питательной среды определяли после растворения компонентов, корректируя его в диапазоне 7,2–7,3. В качестве стабилизатора pH использовали 1 М раствор Пересбуфера.

Стерилизацию питательных сред осуществляли путем фильтрации под давлением 0,2–0,7 атм. через мембранные фильтры MCE «Millipore» 142 mm, с диаметром пор мембраны 1,2–0,8–0,45–0,22 мкм, сложенных по принципу «бутерброда» – sandwich filtration. Для фильтрации ферментативных сред использовали добавление префильтров типа AP-15. Основным ростостимулирующим фактором, применяемым для культивирования всех клеточных линий в отделе, является сыворотка крови. В состав сыворотки

входят факторы роста, которые способствуют клеточной пролиферации, а также факторы адгезии и вещества, обладающие антитрипсиновой активностью, способствующие прикреплению клеток. Сыворотка является так же источником минеральных веществ, липидов и гормонов, многие из которых могут быть связаны с белком [2, 3]. При работе с перевиваемыми культурами клеток использовали эмбриональную сыворотку крови крупного рогатого скота и нормальную сыворотку крови крупного рогатого скота, приготовленную в отделе центрифугированием при 3000 оборотах в течение 30 мин и стерилизованную гамма-облучением (25 кГр, экспозиция 4–6 часов) в ГНУ «ОИЭЯИ-Сосны» НАН Беларуси.

Подбор питательных сред проводили на производственных линиях перевиваемых культур клеток, выращиваемых в отделе, приведенных в таблице 2.

Таблица 2 – Перевиваемые культуры клеток, используемые в экспериментальных исследованиях

Название	Происхождение	Способ культивирования	Среда по паспорту	Чувствительность к вирусам
1	2	3	4	5
Магс – 145	почка эмбриона макаки резус	стационарный монослойный, роллерно-монослойный	ДМЕМ + 10 % ЭТС	альфавирусы, парагрипп 2 и 3, ротавирусы, флавивирусы, краснуха, коровья оспа, ветряная оспа, респираторно-синцитиальный вирус
В Н К – 21 (с – 13)	почка новорожденного сирийского хомячка	роллерно-монослойный, суспензионный, роллерно-суспензионный	0,5%ФГМ-С, 0,5% ГЛА, ИглаМЕМ+199 (3:1)+5–7%КРС	псевдобешенство, коровья оспа, простой герпес, реовирус 3, везикулярный стоматит, краснуха, аденовирус 25, ящур, вирус Коксаки, вирус бешенства, арбовирусы
SPЕV (СПЭВ)	почка эмбриона свиньи	стационарный монослойный, роллерно-монослойный	199+ 7–10%КРС	арбовирусы А и В, энтеровирусы свиней, грипп, ротавирусы, коронавирусы, энцефаломиокардит свиней, ящур, ринопневмония лошадей
МДВК	почка быка	стационарный монослойный, роллерно-монослойный	Игла МЕМ +10%КРС	альфавирусы, везикулярный стоматит, инфекционный ринотрахеит, парвовирус, аденовирусы I и III и диарея КРС, парагрипп 3

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
РК-15	почка свиньи	стационарный моно-слойный	игла МЕМ, ФГМ-С, ДМЕМ +10%КРС	везикулярный стоматит, коровья оспа, реовирус 2,3, аденовирус 4,5, Коксаки В-2, В-3, В-4, В-5, В-6, псевдобешенство, вирусы лихорадки и чумы свиней.
ЗКГ	коза, гонады	стационарный моно-слойный, роллерно-монослойный	игла МЕМ +10%КРС	ящур А, О, С, Азия-1, африканская чума лошадей, оспа овец

Примечание – цикличность пересева культур клеток 5–7 дней, а для культуры РК-15 3–4 дня

Культивирование клеток проводилось по общепринятой методике на пластиковых матрасах ($V=50-200 \text{ см}^3$), стеклянных матрасах ($V=1500 \text{ см}^3$) и стеклянных роллерных флаконах ($V=2000-3000 \text{ см}^3$). Для определения количества клеток, индекса пролиферации и процента жизнеспособных клеток ежедневно снимали по три матраса или роллера и в течение жизненного цикла (4–7 дней в зависимости от клеточной линии) проводили подсчет клеток в камере Горяева, используя 0,5% водный раствор трипанового синего по общепринятым методикам [2]. Каждые 24 ч в течение цикла культивирования проводили микроскопирование исследуемой линии, оценивая состояние культуры, морфологию, процент формирования клеточного монослоя.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимальной рассматривалась культуральная питательная среда, на которой отмечалось максимальное накопление клеток с высокой пролиферативной активностью, сохраняющейся от пассажа к пассажу, без морфологических изменений и признаков дегенерации испытуемой культуры клеток, а также питательная среда, позволяющая получать полный монослой клеток к 48–72 часам интактного культивирования.

- Для масштабного накопления вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней проводилась работа по подбору оптимальной питательной среды для культивирования перевиваемой линии клеток **Marc-145** в матрасах и роллерных флаконах на протяжении 15–20 пассажей [6].

В ходе опытов была подобрана оптимальная посевная концентрация в 2-литровый роллер для получения полного монослоя через 48–72 часа – $45-50 \times 10^6$ клеток. Посевная концентрация в $30-35 \times 10^6$ кл/рол обеспечивала формирование полного монослоя через 120–144 часа и оказалась оптималь-

ной для выращивания клеток в качестве репродуктивного материала. Концентрация $40-45 \times 10^6$ кл/рол обеспечивала формирование монослоя через 72–96 часов.

Для подбора оптимальной ростовой среды использовали синтетические питательные среды Игла и ДМЕМ на солевом растворе Хенкса в различных комбинациях с добавлением во всех вариантах 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота.

Таблица 3 – Исследование ростовых свойств клеток MARC-145 при культивировании роллерным способом

Компоненты среды	Проведено пассажей	Выход клеток с роллера, млн. кл.	Выход клеток с роллера, ср.знач., млн. кл.	Индекс пролиферации
ИглаМЕМ*	15	60–75	69,33±4,2	2,0–2,5
DMEM	15	60–73	67,46±4,82	2,0–2,4
ИглаМЕМ+DMEM (1:1)	15	84–118	106,60±13,39	2,8–3,9
ИглаМЕМ+DMEM (2:1)	15	77–98	88,87±5,99	2,5–3,2
ИглаМЕМ-Hepes + DMEM (1:1) (12,5мМ Hepes)	20	87–122	111,85±11,80	2,9–4,1
ИглаМЕМ-Hepes + DMEM (2:1) (16,7мМ Hepes)	20	103–128	118,85±7,41	3,4–4,3
ИглаМЕМ+DMEM (1:1) + 10 мМ Hepes	20	102–158	143,75±16,37	3,4–5,3
ИглаМЕМ+DMEM (1:1) +12,5 мМ Hepes	20	110–158	143,10±14,86	3,7–5,3
ИглаМЕМ+DMEM (1:1) +15 мМ Hepes	20	106–156	142,10±15,81	3,5–5,2

Примечание –* базовый вариант культивирования и сравнения $P < 0,05$

Как видно из таблицы 3, лучший результат показала комбинация сред ИглаМЕМ+DMEM (1:1), позволившая получить $106,60 \pm 13,39 \times 10^6$ кл/рол против базового варианта $69,33 \pm 4,62 \times 10^6$ кл/рол, при этом ИПА увеличился с 2,0–2,5 до 2,8–3,9. Добиться максимальной пролиферативной активности клеток удалось при использовании Hepes-буфера. Наилучшие результаты были получены при комбинированном использовании сред ИглаМЕМ+DMEM (1:1) с добавлением 10, 12,5 и 15 мМ Hepes: $143,75 \pm 16,37$, $143,10 \pm 14,86$ и $142,10 \pm 15,81 \times 10^6$ кл/рол соответственно.

• В связи с переходом на масштабное культивирование вируса бешенства в биоферментерах и для накопления вируса болезни Ауески была проведена работа по оптимизации ростовой среды для перевиваемой культуры клеток **ВНК-21(с-13)** и технологии ее культивирования роллерным способом.

Таблица 4 – Результаты исследования ростовых свойств клеток ВНК-21 (с-13) при культивировании роллерным способом

Компоненты среды	Выход клеток с 2-хлитр. роллера, ср.знач., млн.кл.	Выход клеток с 4-хлитр.роллера, ср.знач., млн.кл.	Индекс пролиферации
ДМЕМ*	157,8±30,9	295,8±38,4	11–15
ДМЕМ+ГЛА*	161,6±46,6	–	11,5–23,0
Игла МЕМ+ФГМ-С*	226,6±78,4	380,55±72,0	15–30
ФГМ-С	143,3±27,0	–	10–16
ФГМ-С+ГЛА	228,3±65,3	405,8±45,5	16,5–32,0
ФГМ-С+ДМЕМ	290,0±36,40	535,0±65,3	25–35

Примечание –* базовый вариант культивирования и сравнения $P < 0,05$

Как видно из таблицы 4, использование гидролизатной питательной среды ФГМ-С в различных модификациях позволяет увеличить средний выход клеток с роллера в 1,8–2,1 раза в сравнении с базовыми вариантами (ДМЕМ*, ДМЕМ+ГЛА* и ИглаМЕМ+ФГМ-С*). Подобранный нами оптимальная питательная среда ФГМ-С+ДМЕМ 3:1 показала стабильные результаты с высоким выходом клеток.

С целью увеличения выхода клеток ВНК-21(с-13) в суспензию при культивировании роллерным способом была проведена серия экспериментов по модифицированному роллерно-суспензионному культивированию клеток. Для этого мы увеличили скорость вращения роллеров до 1,0–2,5 об/мин, довели объем питательной среды до 200 и 400 мл, при посевной концентрации клеток 100 тыс./мл, что стало основой двух опытных групп. При базовом варианте культивирования скорость вращения роллеров составляла 0,4–0,7 об/мин, объем питательной среды – 100 мл, посевная концентрация клеток – 100 тыс./мл. Контролем опыта служили роллеры с заполнением на 200 и 400 мл, скоростью вращения 0,4–0,7 об/мин и посевной концентрацией клеток 100 тыс./мл. Базовый вариант культивирования клеток стандартно используется при накоплении клеток ВНК-21(с-13) при проведении пассажей и для заправки в биореактор 5-ти литров суспензии клеток.

Установлено, что максимальный выход клеток отмечался в опытной группе №2 при объеме заполнения роллеров 400 мл и скорости вращения до 1,5–2,5 об/мин, который в 3–5 раз был выше, чем в базовом варианте культивирования, и в 1,35 раза больше, чем в идентичной контрольной группе, но со скоростью вращения роллеров 0,4–0,7 об/мин – (таблица 5). Максимальное общее количество клеток в этой группе с монослоя и суспензии достигало 975–1210 млн.кл/рол, а в соответствующей контрольной группе

№2– на 200–410 млн. клеток меньше.

Таблица 5 – Результаты культивирования клеток ВНК-21(с-13) роллерно-суспензионным и роллерным способом

Данные экспериментальных групп	Объем среды, мл	Скорость вращения, об/мин	Выход клеток в моно-слое, млн.кл/рол	Выход клеток в суспензии, тыс.кл/мл*	Всего клеток в отношении к базовому варианту, %
Опытная №1	200	1,0–2,5	160–280	720–980	140 и >
Контрольная №1	200	0,4–0,7	150–250	550–800	120 и >
Опытная №2	400	1,0–2,5	210–370	870–2100	270 и >
Контрольная №2	400	0,4–0,7	180–320	600–1260	200 и >
Базовый вариант	100	0,4–0,7	140–250	50–300	100

Примечание –*приведен выход клеток в логарифмической фазе роста $P < 0,05$

По данным изучения роста клеток ВНК-21(с-13) роллерно-суспензионным способом был определен оптимальный срок получения биомассы клеток в суспензии на пике логарифмического роста, который составлял 72 часа культивирования.

Индекс пролиферативной активности клеток ВНК-21(с-13), полученных роллерно-суспензионным способом, был высокий – 8,0–16,5 и сохранялся в последующих 2–3 пассажах при роллерном выращивании (срок наблюдения). Максимальное количество клеток, полученных в пересчете с одного роллера (с монослоя и суспензии), достигало 975–1210 млн.кл/рол.

Данный метод культивирования позволил сократить объем работ по накоплению клеток для заправки биореактора с 15–20 роллеров до 4–6, снизить расход питательных сред и реактивов, а также дополнять свежеприготовленную питательную среду культуральной жидкостью, полученной после выращивания гомологичных клеток, получая тем самым кондиционированную питательную среду.

Предложенный роллерно-суспензионный метод культивирования клеток ВНК-21(с-13) позволяет получить выход клеток минимум в 2,7 раза выше, чем в базовом варианте культивирования, и используется для накопления биомассы клеток.

Разработка технологии изготовления культуральной живой лиофилизированной вирус-вакцины для иммунизации против оспы овец поставила перед нами задачу подбора из имеющихся в работе синтетических и ферментативных питательных сред оптимальной среды для выращивания культуры клеток **3-КГ**. Перевиваемую культуру клеток гонады козы адаптировали к нормальной сыворотке крови крупного рогатого скота и проводили

опыты по определению оптимальной посевной концентрации клеток и по накоплению вируса оспы овец.

Культивирование перевиваемой линии клеток 3-КГ проводили с использованием синтетических и ферментативных питательных сред. Базовым вариантом являлись среды ПСС и ДМЕМ. В опытах по подбору и модификации среды использовали ферментативные и синтетические питательные среды: 0,25% гидролизат мышечных белков (ФГМ-С), среда 199, ЕМЕМ. Во всех вариациях питательных сред присутствовала эмбриональная сыворотка крови КРС (10%). В качестве компонентов обогащения модифицированных питательных сред использовали добавления глюкозы (до 2000 мг/л) и глутамина (100–150 мг/л). Результаты исследований роста перевиваемой линии клеток 3-КГ представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Данные исследования ростовых свойств клеток 3-КГ при культивировании стационарным способом

Компоненты среды	Проведено пассажей	Выход клеток с матраса, ср. знач., млн.кл.	Индекс пролиферации
ПСС *	8	41,8±4,94	4,2
ДМЕМ	6	31,67±6,63	3,2
199	6	25,27±5,48	2,5
ЕМЕМ	4	33,33±4,08	3,3
ФГМ-С	6	28,33±5,35	2,8
ФГМ-С+ДМЕМ	10	39,0±5,2	3,9
ДМЕМ+ЕМЕМ	8	30,0±7,05	3,0

Примечание – * базовый вариант культивирования $P < 0,05$

Как видно из таблицы 6, хорошие результаты получены на среде ФГМС+ДМЕМ 3:1, которые сопоставимы с базовой средой ПСС и выше, чем на других отработываемых питательных средах в 1,4–1,6 раза.

На следующем этапе мы провели замещение эмбриональной сыворотки крови телят на нормальную сыворотку крови КРС, заменяя в течение 4-х пассажей ЭТС пошагово на 30, 50, 70 и 100% нормальной сыворотки на 4-м пассаже соответственно. В ходе проведенных работ культура клеток несколько изменила морфологию, стала более вытянутая, веретеновидная. Оптимальная посевная концентрация составила 70–110 тыс.кл/мл для проведения 5 суточных пассажей.

В дальнейшем была подобрана посевная концентрация клеток 3-КГ для получения полного монослоя через 48 и 72 часа, которая составила 170 и 130 тыс.кл/мл ±15% соответственно. С посеянных матрасов на 2-е и 3е сутки снимали монослой для определения концентрации выросших клеток, что учитывалось при расчете дозы заражения вирусом. Так, при 2-х суточном цикле культивирования (170 тыс.кл/мл) на вторые сутки в монослое

было 30–35 млн. кл. / матр, а на третьи сутки (130 тыс. Кл / мл) – 34 – 39 млн. кл. /матр.

При культивировании клеток 3-КГ роллерным способом отработали посевную концентрацию клеток 30–35 млн.кл./рол. для проведения пассажей и 50–55 млн.кл./рол. для выдачи на 48 ч на заражение.

Для накопления вируса классической чумы свиней была проведена изыскательная работа с перевиваемой линией клеток **РК-15**.

Таблица 7 – Ростовые свойства культуры клеток **РК-15** на базовой и модифицированных питательных средах

Компоненты среды	Выход клеток с матраса, млн.кл.	Выход клеток с матраса, ср.знач., млн.кл.	Индекс пролиферации
ИглаМЕМ*	48–55	53,34±3,42	4,8–5,5
ДМЕМ	41–49	45,25±4,17	4,1–4,9
199	49–55	52,19±3,21	4,9–5,5
ПСС	45–51	47,51±3,89	4,5–5,1
ФГМС	47–56	53,42±3,09	4,7–5,6
ИглаМЕМ+199(1:1)	59–67	57,46±3,53	5,9–6,7
ИглаМЕМ+199(2:1)	49–56	53,41±3,55	4,9–5,6
ИглаМЕМ+199(1:2)	54–60	57,32±3,51	5,4–6,0
ИглаМЕМ+199(1:1) + 4 мкг/мл глюкозы	60–67	64,19±3,38	6,0–6,7
ИглаМЕМ+199(1:1) + 0,3 мкг/мл глутамина	68–77	71,19±3,38	6,8–7,7
ИглаМЕМ+199(1:1)+ 0,3 мкг/мл глутамина + 4 мкг/мл глюкозы	61–67	64,48±3,15	6,1–6,7

Примечание – * базовый вариант культивирования P < 0,05

Анализируя данные таблицы 7, монокомпонентные синтетические (ИглаМЕМ, ДМЕМ, 199), полусинтетические (ПСС) и гидролизатные (ФГМС) питательные среды не позволили получить высокие индексы пролиферативной активности клеток РК–15. Наилучшие результаты были получены на комбинированной питательной среде ИглаМЕМ+199 в соотношении 1:1 с добавлением глутамина из расчета 0,3 мкг/мл -71,19±3,38 млн.кл./матр. (ИПА на протяжении 10 пассажей колебался от 6,8 до 7,7).

Для культивирования возбудителя вирусной диареи, вируса парагриппа-3, рота- и коронавируса, ИРТ и других вирусов крупного рогатого скота проводили оптимизацию выращивания клеточных линий MDBK и СПЭВ.

Таблица 8 – Ростовые свойства культуры клеток **MDBK** на базовой и модифицированных питательных средах

Компоненты среды	Выход клеток с матраса, млн.кл.	Выход клеток с матраса, ср.знач., млн.кл.	Индекс пролиферации
ИглаМЕМ*	25–41	28,45±6,96	6,3–10,3
ДМЕМ	38–47	39,21±3,82	9,5–11,8
ДМЕМ F12	35–43	39,21±3,82	8,8–10,8
199	21–35	40,54±3,89	5,3–8,8
ИглаМЕМ+ДМЕМ (1:1)	48–54	57,41±5,19	
ИглаМЕМ+ДМЕМ (1:2)	42–50	43,75±4,51	10,5–12,5
ИглаМЕМ+ДМЕМ (2:1)	37–45	48,87±4,99	9,3–11,3
ИглаМЕМ+ДМЕМ (1:1) Hepes 10,0 мМ	42–51	46,16±6,54	10,5–12,8
ИглаМЕМ+ДМЕМ (1:1) Hepes 12,5 мМ	50–58	57,41±5,19	12,5–14,5
ИглаМЕМ+ДМЕМ (1:1) Hepes 15,0 мМ	44–52	47,56±8,71	11,0–13,0
ИглаМЕМ+ДМЕМ (1:1) Hepes 12,5 мМ + 0,3 мкг/мл глутамина	54–62	59,62±4,53	13,5–15,5

Примечание – *базовая паспортная питательная среда $P < 0,05$

При выращивании на комбинированных питательных средах средние выходы клеток с матраса во всех комбинациях ИглаМЕМ+ДМЕМ были выше, чем при использовании базового варианта и монокомпонентных сред. Наилучший результат культура клеток показала на комбинации сред ИглаМЕМ+ДМЕМ (1:1) – средний выход с матраса 57,41±5,19 млн.кл./матр. (ИПА 12,0–13,5).

Перевиваемая линия клеток MDVK культивируется 7-мисуточными циклами. В связи с тем, что одним из лимитирующих факторов роста клеток является показатель концентрации водородных ионов (pH), была подобрана оптимальная нецитотоксичная молярная концентрация HEPES-буфера, которая позволила поддерживать pH на уровне 7,2–6,9. При культивировании MDVK на среде с добавлением 12,5 мМ HEPES-буфера удалось получить до 58 млн.кл./матр., при этом ИПА составил от 12,5 до 14,5, что в 1,5–2,0 раза больше базового варианта. Добавление к питательной среде ИглаМЕМ+ДМЕМ (1:1) 0,3 мкг/мл глутамина увеличило средний выход с матраса до 59,62±4,53 млн.кл.

Таблица 9 – Ростовые свойства культуры клеток **СПЭВ** на базовой и модифицированных питательных средах

Компоненты среды	Выход клеток с матраса, млн.кл.	Выход клеток с матраса, ср.знач., млн.кл.	Индекс пролиферации
199*	57-61	58±3,15	5,7-6,1
ИглаMEM	65-71	68±2,81	6,5-7,1
DMEM	68-73	69±3,27	6,8-7,3
ИглаMEM+199 (1:1)	69-75	72±4,03	6,9-7,5
ИглаMEM+199 (1:2)	60-68	64±4,57	6,0-6,8
ИглаMEM+199 (2:1)	65-73	69±4,11	6,5-7,3
ИглаMEM+199 (1:1) +4мкг/мл глюкозы	70-75	72±3,91	7,0-7,5
ИглаMEM+199 (1:1) + 0,3мкг/мл глутамина +4мкг/мл глюкозы	79-84	81±3,45	7,9-8,4
ИглаMEM+199 (1:1) +0,3мкг/мл глутамина	81-85	86±3,15	8,1-8,5

Примечание –*базовая паспортная питательная среда $P < 0,05$

Выращивание перевиваемой культуры клеток СПЭВ 7-ми суточными циклами на базовой питательной среде 199 позволяет получать до 61 млн. кл./матр. (ИПА – 5,7–6,1). Использование монокомпонентных питательных сред (ИглаMEM, DMEM) обеспечивает выход не более 73 млн.кл. с матраса. Комбинация синтетических питательных сред ИглаMEM+199 в соотношении 1:1 наиболее оптимальная для культивирования перевиваемой линии СПЭВ. Так, культивирование на ней позволило увеличить индекс пролиферативной активности клеток в 1,3 раза (ИПА составил 6,9–7,5, средний выход с матраса в среднем увеличился на 14 млн.кл.).

В качестве компонентов обогащения питательных сред для культуры клеток СПЭВ были испытаны L-глутамин и глюкоза. Добавление глюкозы в конечной концентрации 4мкг/мл среды существенно не повлияло на ростовые свойства комбинированной питательной среды ИглаMEM+199. Введение в среду L-глутамина из расчета 0,33 мкг/мл увеличило средний выход клеток в 1,2 раза, а индекс пролиферативной активности увеличился до 8,1–8,5. Пролиферативная активность клеток сохранялась на протяжении 15 пассажей. С целью стабилизации уровня pH в период культивирования линии СПЭВ в пассажах в питательную среду введен HEPES-буфера из расчета 10–12,5 мМ.

Необходимость накопления вируса болезни Марека кур потребовала отработать методику выращивания первичной культуры клеток фибробластов эмбрионов перепелов (ФЭП), которые являются чувствительной моделью для вируса, вызывающего данное заболевание.

С целью подбора оптимальной ростовой питательной среды использовали среды, выбранные на основании проведенного анализа литературных данных (ЕМЕМ, 199, ГЛА). Во всех вариантах к питательной среде добавляли 10% сыворотки крови КРС. Результаты по подбору оптимальной ростовой питательной среды для культивирования ФЭП приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Ростовые свойства ФЭП на разных питательных средах

Питательная среда	Выход клеток с матраса, млн.кл.	Выход клеток с матраса, ср.знач., млн.кл.	Индекс пролиферации
Игла MEM	127-157	148,35±15,80	1,7– 2,1
199	105-128	115,35±12,30	1,4– 1,7
ГЛА	126-152	138,15±12,10	1,7–2,0
Игла MEM +199 (1:1)	111-143	124,41±39,60	1,5–1,9
Игла MEM+ГЛА (1:1)	163-192	187,50±18,25	2,2-2,6
ГЛА+199 (1:1)	131-153	141,30±12,60	1,7–2,0
Игла-MEM+199+ГЛА (1:1:1)	164-186	164,71±43,15	2,2-2,5

Как видно из таблицы 10, наиболее оптимальной питательной средой для культивирования ФЭП оказались комбинированные среды, состоящие из синтетического и ферментативного компонентов: ИглаMEM+ГЛА в соотношении 1:1 и ИглаMEM+199+ГЛА (1:1:1) с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота при pH среды 7,2, которые обеспечивали формирование полного монослоя при посевной концентрации 5×10^5 кл/см³ ($75,0 \times 10^6$ клеток на 1,5-литровый матрас Ру) через 96 часов, с выходом через 5 суток – $187,5 \pm 18,25 \times 10^6$ и $164,71 \pm 43,15 \times 10^6$ кл/матрас соответственно (ИПА составил 2,2-2,6 и 2,2-2,5). При использовании монокомпонентных синтетических питательных сред выходы по сравнению с комбинацией ИглаMEM+ГЛА были значительно ниже: Игла MEM на 26,4%, среда 199 – на 62,5%, ИглаMEM+199 (1:1) – на 50,7%, на монокомпонентной гидролизной среде ГЛА – в среднем на 35,7%.

ВЫВОДЫ

1 Подобраны оптимальные питательные среды для культивирования в научно-исследовательских и экспериментально-производственных целях перевиваемых линий клеток Магс-145, ВНК-21(с-13), 3-КГ, РК-15, MDBK, СПЭВ и первично-трипсинизированной ФЭП, изучены их посевные концентрации и ростовые свойства.

2 Предложен роллерно-суспензионный метод культивирования для накопления биомассы клеток ВНК-21(с-13) для последующей заправки биореактора, позволяющий получить выход клеток в 2,7 раз выше, чем в базовом варианте роллерного культивирования. При этом получали до 975–1210 млн.кл/рол., культивируя клетки ВНК-21(с-13) роллерным способом.

3 Отработана методика культивирования фибробластов эмбрионов перепелов для выращивания вируса болезни Марека кур.

ЛИТЕРАТУРА

1 Бабак, В.А. Культивирование суспензионной линии клеток ВНК-21(с-13) / В.А. Бабак, К.Э. Чаплыго, Т.П. Кураш, А.А. Гусев // Журн. эпизоотология, иммунология, фармакология, санитария. – Мн., 2009. – № 1. – С. 63–70.

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

3 Костина, Г.А. Исследование свойств различных видов сывороток и разработка технологии их получения для использования в культивировании культур клеток : дис. ... канд. биол. наук : Г.А. Костина. – Новосибирск, 1990. – 133с.

4 Патент «Штамм "ВНИИЗЖ/№ 110" вируса герпеса индеек для изготовления вакцины против болезни Марека», 2144562 / Ш.К. Куляшбекова, А.А. Гусев; Ж.А. Шажко; В.Г. Андреев; Е.В. Гусева; патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных. – №99113380/13; заяв. от 20.01.2000 г.

5 Применение однослойных клеточных культур. Выращивание вируса в однослойной культуре [Электронный ресурс] / Медицинская микробиология. – 2012. – Режим доступа: <http://meduniver.com/Medical/Microbiology/917.html> – Дата доступа: 15.06.2012.

Красочко П. А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор
Борисовец Д. С., кандидат ветеринарных наук
Станкуть А. Э., аспирант
Радько В. Л., биолог*

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

**УО «Международный государственный экологический университет имени
А.Д. Сахарова» г. Минск*

ВЛИЯНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК MDBK

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в медицине и ветеринарии все большее значение приобретают наночастицы благородных металлов, которые могут быть использованы для конструирования на их основе высокоэффективных препаратов, обладающих комплексным антибактериальным, противовирусным и иммуностимулирующим действием.

Наноматериалы и наночастицы, являющиеся продуктом современных нанотехнологий, обладают комплексом уникальных свойств, которые открывают широкие перспективы их промышленного применения. Тем не менее, многие наночастицы токсичны и представляют потенциальную опасность для организма. В связи с этим подчеркивается важность исследования механизмов биологического действия наночастиц и определения условий их безопасного применения [1, 2].

Данные, полученные в различных исследованиях о влиянии наночастиц на организмы достаточно противоречивы, поэтому забывать об актуальности данной проблемы не стоит. Во всем мире нет однозначного ответа по поводу опасности наночастиц, поскольку нет полного понимания их физико-химических свойств, воздействия на организм и отдаленных последствий такого воздействия [3, 4].

Для того, чтобы подтвердить научные исследования и расширить наше понимание влияния наночастиц на здоровье и окружающую среду, возникает необходимость изучения токсикологического воздействия наносеребра на живые организмы, особенно на уровне клеточных систем.

Цель работы: оценить влияние препарата на основе наночастиц серебра на морфологические характеристики перевиваемой линии клеток почки эмбриона крупного рогатого скота MDBK.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован препарат на основе наночастиц серебра «Наноарговир», произведенный в отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Для изучения цитоморфологии клеточной линии MDBK на фоне влияния наночастиц серебра клетки выращивали на 24-луночных полистироловых планшетах на покровных стеклах в течение 48 часов. На сформировавшийся монослой клеток наносили препарат в трех последовательных разведениях от 1:10 до 1:40. Экспозиция клеток с препаратом составляла 24 часа, после чего покровные стекла извлекали из лунок при помощи пинцета и окрашивали гематоксилин-эозином по общепринятым методам.

Световую микроскопию окрашенных препаратов проводили при помощи инвертированного светового микроскопа OLYMPUS OM-4 при увеличении объективов 10, 20, 40.

Определяли следующие морфологические изменения культуры клеток под влиянием наночастиц: общий вид культуры, форму клеток и ядер, структуру цитоплазмы, наличие многоядерных клеток и др.

Для исследования морфологии клеток методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) культуру клеток MDBK инкубировали с раствором наночастиц серебра при комнатной температуре 22°C в течение 15 минут. Затем клетки фиксировали 1,5% глутаровым альдегидом в течение 30 минут, после чего двукратно отмывали раствором фосфатного буфера (PBS), а затем дважды – дистиллированной водой и наносили на предметные стекла.

АСМ исследования проводились на микроскопе HT-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь) в контактном режиме сканирования с использованием зонда CSC38 («MicroMash»), радиусом закругления 41 нм и жесткостью консоли 0,03 Н/м.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение окрашенных цитологических препаратов показало, что в норме культура MDBK образует сплошной клеточный монослой с равномерным распределением клеток по поверхности стекла. Границы клеток четко различимы. Клетки плотно прилегают друг другу. Морфологически клетки эпителиоподобного типа полигональной формы. Ядра крупные, овальной или округлой формы, расположены в центральной части цитоплазмы. Цитоплазма неоднородна, имеет рыхлый матрикс (рисунк 1).

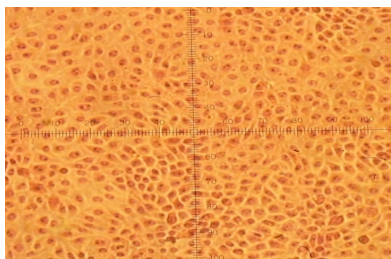
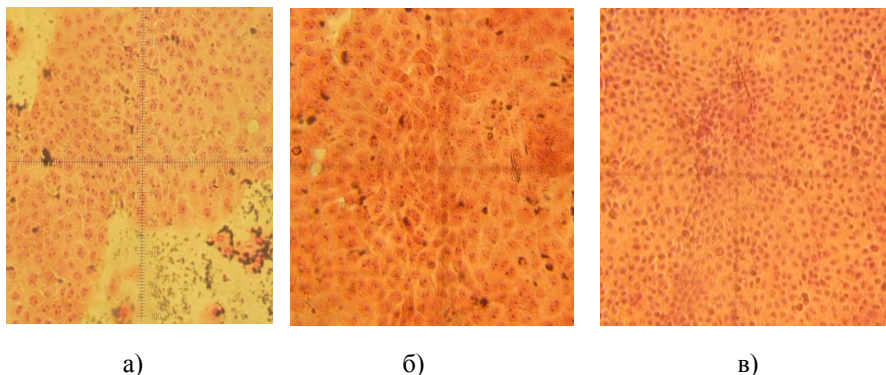


Рисунок 1 – Культура клеток MDBK (контроль) (x 20)

Препарат наночастиц серебра в разведении 1:10 вызывал задержку развития клеточного монослоя, нарушал целостность сформировавшихся участков клеточного пласта вследствие возникновения очагов дегенерации различной интенсивности. Отмечалось расширение межклеточных контактов, в монослое образовались «окна» и разрывы значительных размеров. Клетки имели нехарактерную округлую форму. Наблюдались множественные случаи многоядерности. По частоте встречаемости двоядерных клеток при длительном культивировании данные по препарату превосходили контрольный показатель более чем в 2 раза (рисунок 2)



**Рисунок 2 – Культура MDBK при экспозиции с препаратом на основе наночастиц серебра в разведениях:
а – 1:10 (х 20); б - 1:20 (х 20); в – 1:40 (х 10).**

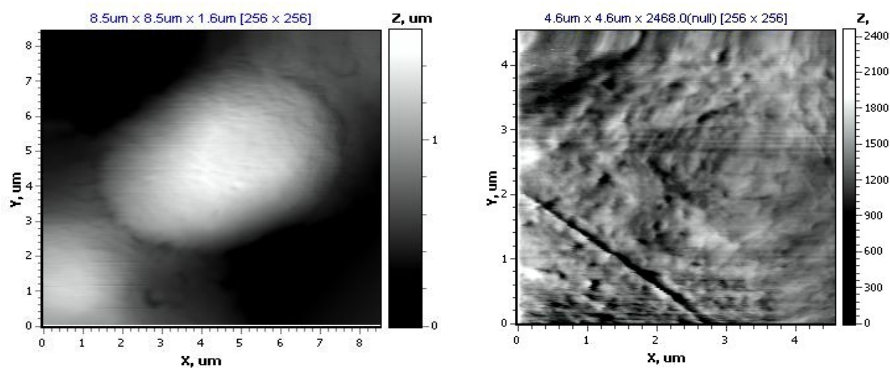
Препарат наночастиц серебра в разведении 1:20 вызывал такие же цитоморфологические изменения, как в предыдущем разведении – 1:10, но в меньшей степени. Под воздействием наночастиц серебра наблюдалось расширение межклеточных контактов, но при этом не отмечалось образование «окон» и разрывов.

В разведении 1:40 препарат наночастиц серебра не влиял на морфологию клеток, внешний вид культуры соответствовал норме. Границы клеток четкоразличимы. Клетки плотно прилегают друг другу. Морфологически клетки эпителиоподобного типа полигональной формы. Ядра крупные, овальной или округлой формы, расположены в центральной части цитоплазмы.

Таким образом, цитоморфологические исследования изменений в культуре клеток MDBK свидетельствуют о наличии цитотоксического эффекта препарата наночастиц серебра при концентрациях 1:10 и 1:20.

На рисунке 3 представлены изображения отдельной клетки MDBK и участка поверхности мембраны в режиме латеральных сил. Проведено

исследование топографии поверхности клеток MDBK методом.

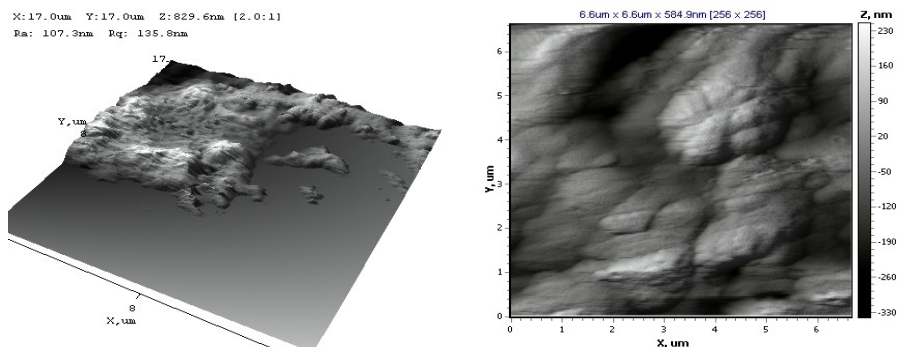


а)

б)

**Рисунок 3 – АСМ-изображения поверхности клеток MDBK:
а – топография поверхности, область сканирования
8,5х8,5 мкм²; б – изображение в режиме латеральных сил,
область сканирования 4,6х4,6 мкм²**

На рисунке 4 представлено 3-хмерное изображение и топография поверхности клетки линии MDBK, полученные с помощью атомно-силового микроскопа.



а)

б)

Рисунок 4 – АСМ изображение клеток линии MDBK (контрольные образцы): а – трехмерное АСМ изображение, размер поля сканирования 17х17 мкм; б – топография поверхности мембраны клетки, размер поля сканирования 7х7мкм

Исследование топографии показало, что поверхность клеток MDBK гладкая и ровная, без явно выраженных структурных элементов.

Результаты исследования топографии поверхности после инкубации с раствором наночастиц Ag при температуре 37°C представлены на рисунке 5.

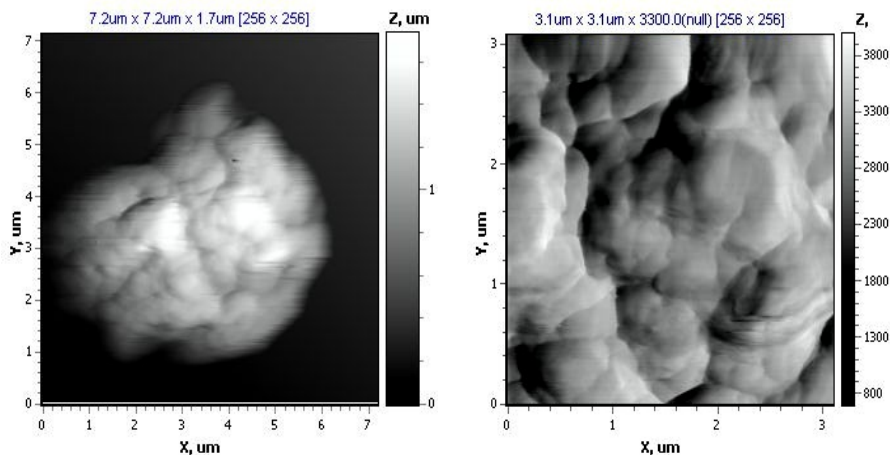


Рисунок 5 – АСМ-изображения поверхности клеток MDBK после их инкубации с Ag; а – топография поверхности, область сканирования 7,2х7,2 мкм²; б – изображение в режиме латеральных сил, область сканирования 3,1х3,1 мкм²

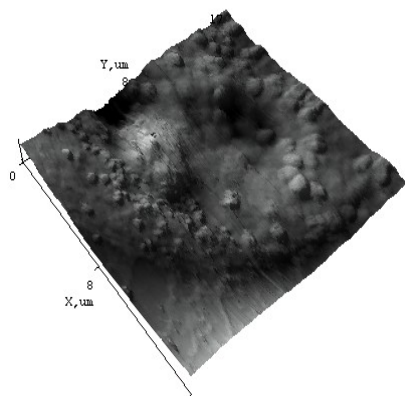
После взаимодействия клеток линии MDBK с наночастицами Ag наблюдались изменения формы поверхности клеток по сравнению с контрольным образцом. Поверхность клеток стала более рельефной с ярко выраженными выступами округлой формы.

На рисунке 6 представлено 3-хмерное изображение клеток, инкубированных с наночастицами серебра, получено с помощью атомно-силового микроскопа.

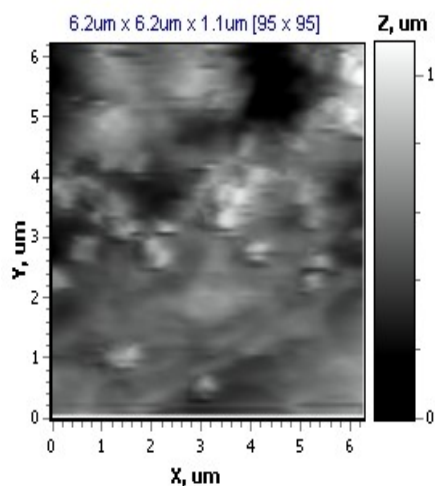
Размеры частиц серебра определяли по профилю сечения поверхности изображения подложки с наночастицами, который проводится в обрабатывающей программе после сканирования исследуемого образца. На профилях маркерами отмечают края каждой частицы.

Оценка размера частиц методом АСМ показала, что средний размер частиц на поверхности клеток составляет в среднем 220–250 нм.

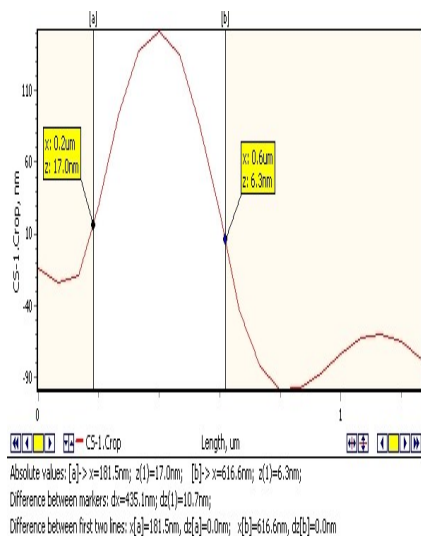
X:17.0um Y:17.0um Z:2.6um [0.7:1]
Ra: 0.3um Rq: 0.3um



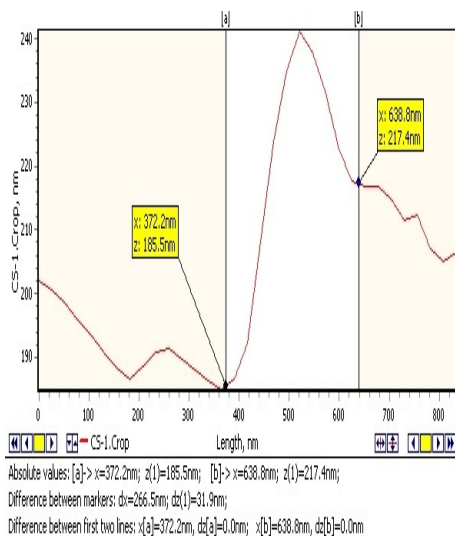
а)



б)



в)



г)

Рисунок 6 – АСМ 3-мерное изображения клеток инкубированных с наночастицами (Ag): а – трехмерное изображение клетки, б - топография поверхности мембраны клетки с наночастицами на поверхности, область сканирования 6,2х6,2 мкм; в, г – профили сечения наночастиц

ВЫВОДЫ

1 Использование специфических методов окраски позволило установить, что препарат на основе наночастиц серебра оказывает цитотоксическое действие в разведениях 1:10 и 1:20, которое проявляется в округлении клеток, расширении и нарушении межклеточных контактов, нарушении развития клеточного монослоя и т.д.

2 При анализе трехмерных изображений клеток MDBK после 20 мин инкубации их с препаратом установлено, что наночастицы затрагивают морфологию поверхности мембраны клеток, которая становится более рельефной с ярко выраженными выступами округлой формы.

ЛИТЕРАТУРА

1 Трифонова, Т. А. Экологическая безопасность наночастиц, наноматериалов и нанотехнологий : учеб. пособие / Т. А. Трифонова, Л. А. Ширкин; Владим. гос. ун-т. – Владимир : Изд-во Владим. гос. ун-та, 2009. – 64 с.

2 Сергеев, Г. Б. Нанохимия: учеб. пособие / Г. Б. Сергеев. – М. : КДУ, 2006. – 336 с.

3 Lansdown, A.B. (2006). Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Current Problems in Dermatology*, 33, 17–34.

4 Gopinath, P.; Gogoi, S.K.; Chattopadhyay, A. & Gosh, S.S. (2008). Implications of silver nanoparticle induced cell apoptosis for in vitro gene therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 19, 075104.

Сусский Е.В., кандидат ветеринарных наук*

Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор

**Армавирская биофабрика, г.Армавир, Краснодарский край*

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского»

г.Минск

ОЦЕНКА СУБЛИНИЙ КЛЕТОК MDBK ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ПАРАГРИППА-3 И ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

ВВЕДЕНИЕ

Промышленное производство вакцин и гипериммунных сывороток для активной и пассивной иммунизации животных против вирусных инфекций предусматривает накопление вирусной массы. При этом для их накопления используются культуры клеток и развивающиеся куриные эмбрионы. Для культивирования вирусов парагриппа-3 (ПГ-3) и инфекционного ринотрахеита (ИРТ) крупного рогатого скота в настоящее время широко используются различные культуры клеток: 1 первичные (почки эмбрионов коров - ПЭК, тестикулов бычка – ТБ), 2 перевиваемые – почки теленка (ПТ, ПТ-80 –Таурус, MDBK), трахеи теленка, легких теленка и т.д. Особенно активно вирус накапливается на перевиваемой линии клеток почки эмбриона крупного рогатого скота MDBK. Перевиваемая линия клеток почки бычка (MDBK – *Bos taurus*) получена в Калифорнийском университете в 1957 г S.H. Madin, N.B. Darby. Тест-культура (ТК) на уровне 88 пассажа депонирована в ATCC и ECACC [1]. В Россию ТК поступила в 1984 г, поддерживается *in vitro* и сохраняется в жидком азоте в коллекциях ВНИИВВиМ (MDBK-Е) и ВНИИЗЖ (MDBK-В) в соответствии с требованиями паспорта.

Обоснование выбора сублиний клеток MDBK для производства и контроля антигенов парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (КРС) основывалось на высокой чувствительности данных клеток к вирусам, максимального титра вирусов [2].

Для оценки морфологических характеристик клеток в настоящее время используется проточная цитометрия и сортировка, с помощью которой производится быстрое измерение характеристик клеток, их органелл и возможности физического отделения субпопуляции клеток с заданными свойствами. Проточная цитометрия базируется на широком спектре цитохимических и флуоресцентных методов анализа как структурных компонентов (ДНК, РНК, белка) клеток, параметров клеточного цикла и морфоло-

гической характеристики популяции клеток. Метод отличается чрезвычайно высокой производительностью (анализируются от 1 тыс. до 1 млн клеток) и возможностью индивидуального анализа клеток, входящих в выборку.

Целью исследований было проведение кариологической оценки различных сублиний перевиваемых клеток почки эмбриона крупного рогатого скота MDBK.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали производственные, вакцинные штаммы ПТК 45/86 и ТК-А/ВИЭВ вирусов парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Предварительно вирусы адаптировали в течение 3–5 пассажей к сублинии клеток MDBK. Активность вирусов оценивали при помощи микротитрования в ТК клеток MDBK на плашках. Гемадсорбирующие свойства вируса ПГ-3 определяли в РГА (реакции гемагглютинации) с использованием 0,5 %-ной суспензии эритроцитов морской свинки по общепринятой методике.

При работе с клеточными культурами использовали среды Игла MEM, Игла DMEM, ГЛА на растворе Хенкса (рН 7,2-7,4); фосфатно-буферный раствор (ФБР) рН 7,2-7,4; 3%-ный раствор глутамина, диметилсульфоксид (DMSO); 0,25%-ный раствор трипсина и 0,02%-ный раствор версена; сыворотки крови (СК): фетальная фирмы Sigma (USA), крупного рогатого скота и телят.

При аттестации и паспортизации сублиний клеток оценивали культуральные, цитоморфологические, кариологические показатели, чувствительность к вирусам парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и контаминацию тканевых культур микоплазмами и вирусами в соответствии с общепринятыми методами [3,4].

Методом проточной цитометрии были охарактеризованы прошедшие 30 и 43 пассажа после криоконсервирования сублинии клеток MDBK-E и MDBK-B предназначенные для серийного пассирования вирусов ПГ-3 и ИРТ по следующим показателям:

- размеры клеток ;
- гранулярность;
- распределение ДНК по фазам клеточного цикла;
- программированная клеточная гибель - апоптоз.

Для цитометрического анализа сублиний клеток MDBK сублинии MDBK-E и MDBK-B выращивали в стационарных условиях в течение 48 часов при температуре 37⁰С. Клетки отделяли от субстрата 0,02%-ным раствором версена (500 мл) с 50 мг химопсина. От ростовой ПС клетки трижды отмывали с использованием центрифугирования (7 мин, 450 g) в 3 мл охлажденного фосфатно-буферного раствора (ФБР) с рН 7,2, содержащего 0,15 М NaCl (ФБР). Осадок клеток фиксировали 70% этанолом в течение 3-х

часов при температуре 4⁰С. Зафиксированные клетки трижды отмывали от фиксатива центрифугированием (7 мин, 450 g) в 3 мл охлажденного до 4⁰С ФБР. Затем осадок клеток ресуспендировали в 0,5 мл ФБР, содержащем 40 мг/мл иодита пропидия (Calbio-chem) и 0,5 мг/мл рибонуклеазы (Sigma, USA). После 60 мин контакта клетки анализировали методом проточной цитометрии.

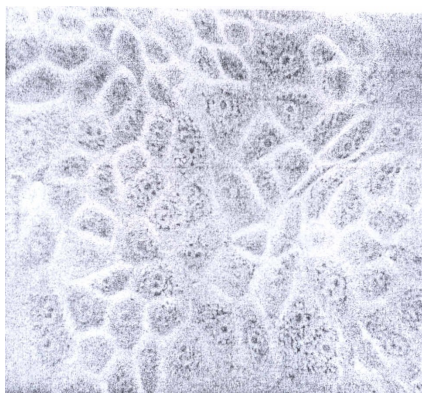
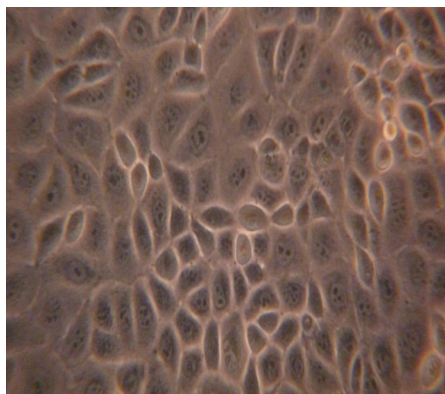
Анализ не менее 10⁶ клеток сублиний MDBK-E и MDBK-B проводили на лазерном проточном цитофлуориметре-сортере EPICS «Elite» (Coulter, USA), оборудованном аргоновым лазером CYONICS (Uniphase, USA) с длиной волны возбуждения 488 нм и мощностью луча 15 мВт. Полученные гистограммы подвергали математической обработке с использованием программ EXPO 32 (Beckman-Coulter, USA) и Multi Cyse (Phoenix Flow Systems, USA). Цитометрический метод оценки клеток апробирован и зарегистрирован Министерством здравоохранения России за № 2000/257 от 26 июня 2000 года.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенных исследований экспериментально установлено, что сублинии клеток MDBK-E (ВНИИВВиМ) и MDBK-B (ВНИИЗЖ) существенно различались по культуральным, цитоморфологическим и кариологическим показателям, уровню контаминации и чувствительности к вирусам парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита.

Тест-культура MDBK-E представлена мелкими эпителиоподобными клетками с четко выраженными границами. Цитоплазма клеток не зернистая, интерфазные ядра округлой формы содержат 1-4 ядрышка. Напротив, клетки сублинии MDBK-B были более крупными, зернистыми с незначительной вакуолизацией цитоплазмы. Цитопатических изменений в монослойных ТК на протяжении 10 суток наблюдения не установлено (рисунок 1).

Анализ метафазных пластинок сублиний MDBK-E и MDBK-B выявил, что число хромосом в клетках ТК колеблется соответственно от 43 до 58 и от 49 до 104, а модальное число представлено 51 и 52 хромосомами, составляющими в популяции 30 и 58%(таблица 1, рисунок 2). В кариотипе сублинии клеток MDBK-E кроме того, выявлены две маркерные хромосомы - большой мегацентрик и большая субмегацентрическая хромосома - характерные для линии MDBK-NBL1 из американской коллекции (ATCC) клеточных культур.



Примечание – микрофото, ок. x 10, об X 90, нативные препараты

Рисунок 1 – Цитоморфологическая характеристика сублиний клеток MDBK-ECACC (А) и MDBK-ВНИИЗЖ (В)

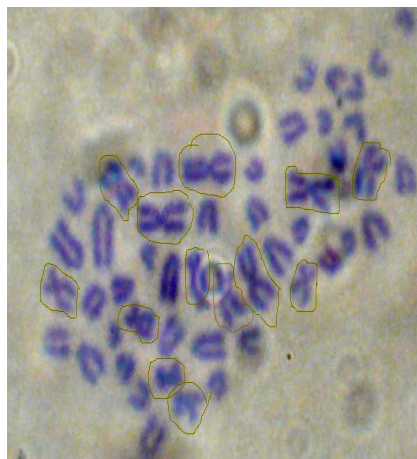
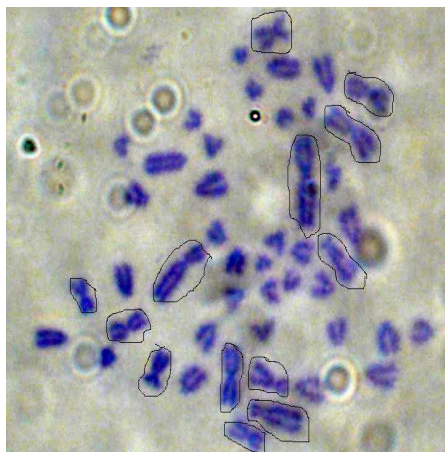


Рисунок 2 – Кариотипы сублиний клеток MDBK-ECACC (А) и MDBK-ВНИИЗЖ (В)

В таблице 1 приведены данные культуральных и цитометрических показателей сублиний клеток MDBK методом проточной цитометрии.

Таблица 1– Сравнительная характеристика культуральных и цитометрических показателей сублиний клеток MDBK методом проточной цитометрии

Показатели		Значение показателей	
		Наименование тест-культур	
		MDBK-E	MDBK-B
Источник получения		Англия ECACC (Е)	ВНИИЗЖ (В)
Культуральные свойства			
Пассаж		30	43
Сроки образования монослоя		48	48–72
Индекс пролиферации (ИП)		3–5	2–3
Морфология		Клетки мелкие, эпителиоподобные с четкими границами. Цитоплазма не зернистая. Ядра округлой формы с 1–4 ядрышками.	Клетки более крупные эпителиоподобные, зернистые со слабо выраженными границами. Незначительная вакуолизация цитоплазмы.
Контаминация: - PPLO - BVD		– –	+ +
Кариологические показатели			
Пределы изменчивости числа хромосом в клетках		43–58	49–104
Модальное число хромосом: - количество, шт - процент, %		51 30	52 58
Цитометрический анализ			
Размеры клеток, мкм		18,6±3,65	21,3±4,53
Гранулярность, (МЕАМ)		387	444
Апоптоз, %		3,9	6,8
Чувствительность к вирусам			
Накопление вирусов (Lg ТЦД ₅₀ /мл)	ПГ-3	7,47 ± 0,06	7,10 ± 0,14
	ИРТ	7,60 ± 0,04	7,23 ± 0,10

В дальнейшем тестируемые сублинии клеток MDBK были проконтролированы на контаминацию посторонними агентами. Инфицированность ТК микоплазмами оценивали микробиологическим и цитохимическим методами и в полимеразной цепной реакции (ПЦР) по общепринятым методам [4,5].

Цитохимическим методом и в ПЦР микоплазменная инфекция была установлена в клетках сублинии MDBK-B. Контаминация указанной культуры вирусом диареи также была подтверждена.

Напротив, клетки сублинии MDBK-E не содержали вирусной и микоплазменной контаминации, характеризовались выраженным ростовым потенциалом, сохраняли исходную морфологию клеток в культуре и являлись наиболее перспективным субстратом для производства антигенов ПГ-3 и ИРТ.

При определении среднестатистических размеров клеток, что характеризует изменение среднестатистических размеров неокрашенных (интактных) клеток сублиний MDBK-E и MDBK-B в процессе длительного культивирования. Увеличение или уменьшение размеров клеток, как правило, свидетельствует о нарушении процессов деления и появлении в образцах аномальной популяции клеток в культуре (рисунок 3).

В результате цитометрического анализа было показано, что интактные клетки сублиний MDBK-E и MDBK-B варьируют по величине и на уровне 30 и 43 пассажей после криоконсервирования, а также имеют среднестатистические размеры $18 \pm 3,65$ и $21,3 \pm 4,53$ мкм соответственно, что характерно для ПЛК клеток почек телят на стадии становления.

Показатель гранулярности (MEAM) характеризует состояние внутренней структуры клеток, соотношение ядра и цитоплазмы, а также свидетельствует о наличии аномальных и апоптотических клеток в ТК. Данные изменения клеток сублиний MDBK-E и MDBK-B отражают параметр MEAM, показывающий среднестатистическое положение максимума пика рассеивания света клетками ТК под углом 90^0 , т.е. распределение клеток в зависимости от их гранулярности. Цитометрическому анализу подвергались неокрашенные клетки. Для дискриминации клеток, не соответствующих по размерам и гранулярности живым клеткам, в программу анализа вводили логические ограничения.

Результаты распределения клеток сублиний MDBK-E и MDBK-B по показателю гранулярности цитоплазмы представлены на рисунке 3. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что изолированные клетки сублиний MDBK также существенно различались по показателю гранулярности. В частности, более гранулярными были клетки сублинии MDBK-B (444). Для клеток сублинии MDBK-E показатель MEAM не превышал 387. Отмеченные факты свидетельствуют о нарушении процессов деления и появлении в популяции сублинии MDBK-B аномальных клеток.

Таким образом, полученные данные дают основание заключить, что

среднестатистические размеры и показатели гранулярности исследуемых сублиний клеток MDBK существенно различаются. Эти факты свидетельствуют о неадекватных условиях поддержания сублинии клеток MDBK-B в культуре.

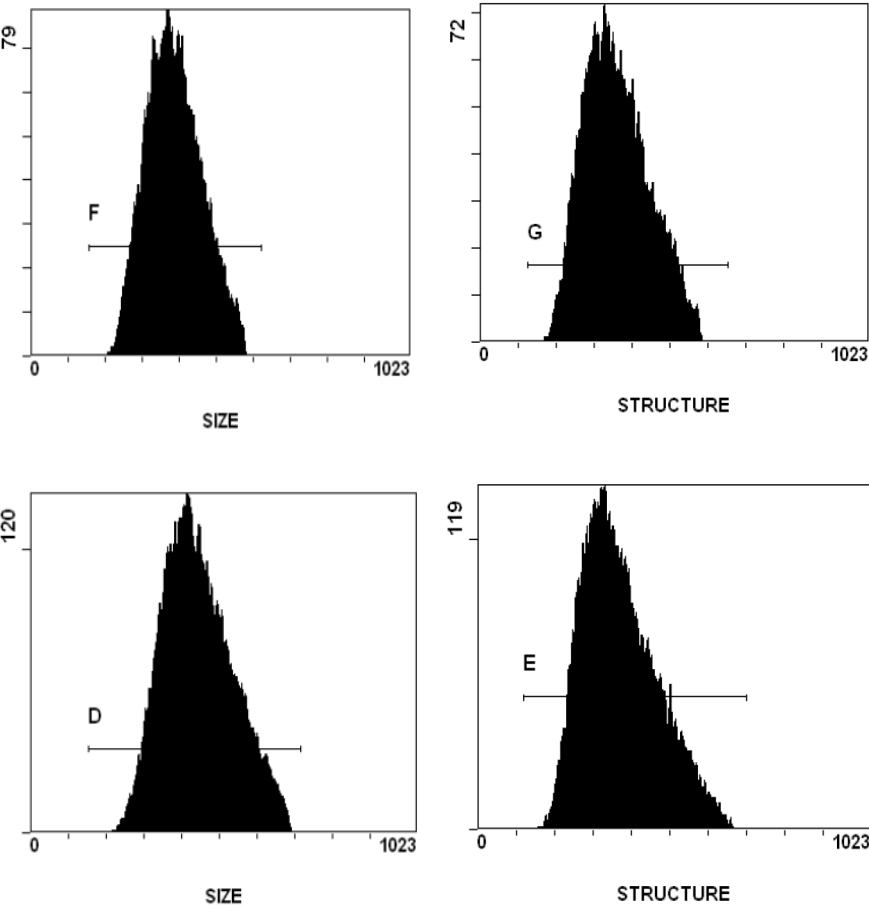


Рисунок 3 – Гистограммы распределения клеток сублиний MDBK-E и MDBK-B по размерам (A и A1) и гранулярности (B и B1)

Чрезвычайно важной характеристикой клеток перевиваемых линий, определяющей перспективность их использования в практике является программированная (физиологическая) клеточная гибель - апоптоз. Данный показатель характеризуется сморщиванием клеток, межнуклеосомной фрагментацией ДНК с последующей дезинтеграцией мембран и образованием апоптотических телец. Напротив, при некрозе наблюдается набухание и разрыв клеточных мембран с выбросом содержимого во внеклеточное пространство. В наших экспериментах количество клеток, находящихся в состоянии спонтанного апоптоза, оценивали по распределению клеток окрашенных иодитом пропидия, в логарифмическом канале флюоресценции с использованием барьерных фильтров 488 ВК, 488 ВР и 625 ВР. Клетки, содержащие ДНК меньше $2n$ считали апоптотическими. Этот показатель отражает состояние клеточной популяции в период исследования. При оптимальных условиях культивирования и качественной ТК количество клеток, находящихся в состоянии спонтанного апоптоза, не превышает 14–19%. При ухудшении условий пассирования или в результате воздействия цитостатиков количество апоптотических клеток, как правило, существенно возрастает.

По показателю апоптоза исследуемые сублинии MDBK-E и MDBK-B не превышают нормативного показателя и находятся на уровне 3,9 и 6,8% соответственно. В тоже время высокие ростовые свойства, отсутствие контаминации и удовлетворительные показатели фаз клеточного цикла и апоптоза дают основание рекомендовать сублинию клеток MDBK-E как для производства антигенов, так и контроля активности вирусов ПГ-3 и ИРТ. Напротив, контаминация микоплазмами и вирусом BVD, более низкие показатели ростового потенциала и чувствительности к вирусам, также менее стандартные значения показателей клеточного цикла свидетельствуют о несоответствии сублинии MDBK-B требованиям отечественных и международных стандартов и непригодности данной КМ для практических целей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для оценки качества сублиний клеток MDBK апробирован и рекомендуется для практического применения достаточно эффективный экспресс-метод проточной цитометрии, который при 1000 раз большей выборке изолированных клеток позволяет в 20 раз быстрее получить статистически достоверные результаты о жизнеспособности, размерах, гранулярности, фазах клеточного цикла и апоптозе. С учетом полученных данных в качестве тканевого субстрата для производственных целей подобрана высокочувствительная сублиния клеток MDBK-E, характеризующаяся оптимальными цитометрическими показателями и высоким ростовым потенциалом, а также чувствительностью к модельным вирусам.

ЛИТЕРАТУРА

1 Глаголева, И.С. Репродукция производственных штаммов вирусов на культуре клеток новорожденных крольчат / Автореф. Дисс... канд. биол.н. 06.02.02 и 03.01.06, ФГБУ «ФЦТРБ–ВНИВИ», Казань : 2013. – 19 с.

2 Ковалев, Н.А., Вирусы и прионы в патологии животных и человека. / Красочко П.А. и др. Минск, Беларуская навука, 2012. – 426 с.

3 Методические рекомендации по выделению, культивированию и идентификации микоплазм, ахлеплазм и уреоплазм. – М., 1982. – 25с.

4 Методические рекомендации по способу выявления микоплазм в культурах перевиваемых клеток – М., – 1983.

5 Методические указания по диагностике возбудителей микоплазмоза методом полимеразной цепной реакции – М., – 1997.

Скрыпник В.Г., доктор ветеринарных наук
Колесникова Е.Ю., аспирант

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

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТОВ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СРЕДСТВ СТАНДАРТИЗАЦИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ВВЕДЕНИЕ

В начале становления бактериологии и получения первых культур микроорганизмов использовались примитивные способы обеспечения их питательным субстратом. В этот период применялись только "натуральные" среды - молоко, кровь, моча, сахар, настои и экстракты различных трав и растительных продуктов, дрожжей [1].

Природные среды подбирались эмпирически, на основании таких показателей, как пригодность питательного субстрата для роста того или иного микроорганизма.

Острая необходимость выделения из организма человека и животных патогенных микроорганизмов, возникавшая при выяснении причин многих распространенных в те времена инфекционных заболеваний человека и животных, стимулировала изобретение сложных питательных сред. С этой целью исследователи вынуждены были прибегнуть к использованию питательных сред из отваров и переваров мяса, а также различных органов животных [2].

Особенно большое значение для приготовления питательных сред имели исследования Martin L. (1898), открывшие новые возможности по приготовлению и использованию гидролизатов белка из мяса и других белковых продуктов [3].

К настоящему времени накоплен огромный научно-практический потенциал по изготовлению питательных сред для самых разнообразных физиологических групп микроорганизмов, используемых в диагностической работе различных медицинских и ветеринарных учреждений, а также при производстве противобактерийных биологических препаратов.

Существующая практика использования мясных переваров по Хоттингеру для накопления бактериальной массы оказалась эффективной, но в связи с большим дефицитом и высокой стоимостью этого продукта, а также нерациональностью использования мяса не по прямому назначению, мясо не является оптимальным продуктом для изготовления бактериологических

сред [4].

Мясные среды не могут обеспечить специфические потребности целого ряда микроорганизмов, что вызывает необходимость дополнительного внесения в питательные среды таких ингредиентов как пептон, печеночные и дрожжевые экстракты и т.д.

Кроме этого, мясные среды нестандартны, неустойчивы при хранении, нетранспортабельны.

Между тем многочисленные попытки заменить мясо другими белковыми продуктами - казеином, кровью и кровяными сгустками, мясо - костной, рыбной и китовым мукой, соей и горохом - оказались безуспешными.

Так, вопрос разработки технологии получения, стандартизации, оценки питательных сред из природного сырья имеют определенные нерешенные проблемы. Это обусловлено, прежде всего снижением качества самого сырья, в том числе мяса и растительных объектов, в связи со сложной экологической обстановкой и антропогенным воздействием на окружающую среду. В таком сырье чаще всего содержатся антибиотики, химикаты, нитраты, токсичные продукты, которые негативно влияют на культивирование и конечный выход биомассы микроорганизмов и снижает результативность диагностических исследований.

Морские гидробионты это источник новых биологически активных веществ. Исследование биохимического состава гидробионтов и их пищевой ценности доказали, что мясо беспозвоночных характеризуется высоким содержанием незаменимых аминокислот, микроэлементов и витаминов, в том числе и В12. По питательной ценности продукты из мидий находятся на одном уровне с яйцом, молоком и мясом наземных животных, а по усвояемости значительно превосходят его. В мясе беспозвоночных открыто более 38 микроэлементов [6,7,8,9].

Сведения о реальных результатах использования морских гидробионтов для культивирования микроорганизмов – единичные: использование пептона " Каспий ", ГРМ сред для культивирования широкого спектра микроорганизмов, азотсодержащей основой которых является ферментативный гидролизат рыбной муки; культивирование ряда условно - патогенных микроорганизмов рода *Listeria*, и *Yersinia* азотсодержащей основой которых является отвар молок лососевых рыб и т.п.

Так как в настоящее время одной из острых проблем становления и развития биологической промышленности в Украине является изобретение недорогих и качественных питательных сред для культивирования в промышленных условиях широкого спектра микроорганизмов при производстве профилактических, диагностических и лечебных средств, то поиск новых, экологически чистых и экономически оправданных источников сырья, а также путей повышения их биологической полноценности с целью разработки высококачественных питательных сред, является актуальной и своевременной задачей [10,11].

Цель работы –оценить эффективность и качество сконструированных питательных сред из гидролизатов морских гидробионтов с использованием средств стандартизации микробиологических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований использовали гидролизаты из таких морских гидробионтов, как мидия Черноморская *Mytilus galloprovincialis* и килька черноморская *Sprattus sprattus* производства Института биологии южных морей НАН Украины: Мидийный гидролизат (МГ) и рыбный автолизат (РА).

В качестве эталона использовали основной перевар Хоттингера (ОПХ) производства Херсонского государственного предприятия - биологическая фабрика.

С целью выяснения оптимального соотношения мидийного и килечного гидролизата в качестве азотсодержащей основы для дальнейшего конструирования питательных сред мы использовали смеси мидийного гидролизата и автолизата кильки в шести различных вариантах, которые приведены в таблице 1.

Таблица 1–Подбор азотсодержащих оснований для конструирования питательных сред

Варианты сред	Состав	pH среды	Содержание аминного азота, мг%
Перевар Хоттингера (Эталон)	мясо говядины	7,1	700
№1	100% МГ	7,0	270
№2	75%МГ+25%ГК	7,06	490
№3	50%МГ+50%ГК	7,03	600
№4	33%МГ+67%ГК	6,98	680
№5	25%МГ+75%ГК	7,04	740
№6	100%ГК	7,0	900

На основе шести вариантов азотсодержащих смесей морских гидробионтов изготавливали экспериментальные жидкие, твердые и полужидкие питательные среды для бактерий и грибов по аналогии с МПБ, МПА и средой Сабуро агаризованной, а также для контроля полужидкий МПА согласно действующей нормативной документации[12,13].

Оценку качества исследуемых питательных сред проводили согласно действующей нормативной документации по следующим показателям: физико-химические (внешний вид, цвет и однородность; консистенция, концентрация водородных ионов, содержание аминного азота), контаминация бактериальной и грибной микрофлорой, продуктивность и стабильность культуральных свойств тест - штаммов микроорганизмов.

Внешний вид, цвет, однородность и консистенцию исследуемых питательных сред определяли визуально при пронизывающем дневном свете.

Концентрацию водородных ионов определяли электрометрическим методом, используя потенциометр рН -150 МА.

Продуктивность – способность среды к накоплению биомассы и выхода целевого продукта.

Определение продуктивности жидких и твердых сред проводили количественным методом.

Определение продуктивности жидких сред проводили пробирочным методом.

Три крайние разведения тест-штаммов (*Corinebacterum xerosis* 1911, *St. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O55): 10^6 , 10^7 , 10^8 высевали на исследуемые и эталонные среды. Инкубацию посевов проводили при температуре ($37 \pm 0,3$) $^{\circ}\text{C}$.

После инкубации через 24 часа проводили учет результатов.

Накопление бактериальной массы микроорганизмов оценивали визуально. Интенсивность роста оценивали в баллах:

0 - отсутствие роста ;

1 - незначительная мутность, слабый рост;

2 - интенсивный рост.

Среды считали пригодными по показателю "продуктивность", если через 24 часа инкубации посевов, визуально наблюдался характерный, интенсивный рост (2 балла) тест-культуры не менее чем в двух пробирках из трех засеянных из среднего (оценочного) разведение – 10^7 .

Согласно методике допустимо также наличие интенсивного роста (2 единицы) не менее чем в двух пробирках из трех засеянных, которые были засеяны из предварительного разведения (10^6) и одновременно не менее, чем в одной пробирке из трех засеянных в обоих следующих разведениях (т.е. 10^7 и 10^8).

Определение «продуктивности» твердых сред проводили количественным чашечным методом.

Три крайние разведения тест-штаммов (*Pseudomonas aeruginosa* 27/9, *Serratia marcescens* 1 *St.aureus* ATCC 25923; *Candida albicans* 885-653 для среды Сабуро агаризованной): 10^5 , 10^6 , 10^7 высевали на исследуемые и эталонные среды. Учет результатов проводили через 24–48 часов при инкубации посевов при температуре ($37 \pm 0,3$ $^{\circ}\text{C}$) и для *Candida albicans* 885-653 ($24 \pm 0,3$ $^{\circ}\text{C}$). После инкубации посевов подсчитывали количество выросших колоний на всех засеянных чашках отдельно для эталонных и исследуемых сред и определяли коэффициент продуктивности по формуле:

$P_R = N_S/N_O$, где

P_R – продуктивность среды;

N_S – общее количество колоний, которое выросло на исследуемой питательной среде;

N_O – общее количество колоний, которые выросли на эталонной среде, которая равняется или больше 100 КОЕ.

Продуктивность среды считали удовлетворительной, если коэффициент продуктивности исследуемых сред составлял не менее 0,7.

Исследование стабильности тест-штаммов микроорганизмов на испытываемых и эталонных средах определяли отношением числа атипичных по морфологическим, биохимическим, серологическим и другим свойствам колоний к общему количеству колоний использованных тест-штаммов, выросших на исследуемой среде.

Оценку культуральных свойств для твердых сред проводили на чашках с разведением 10^7 КОЕ/см³.

Для жидких и полужидких сред определяли качественным методом по наличию типичного роста, изменению цвета среды и т.д.

Определение стабильности свойств исследуемых и эталонных твердых сред проводили "количественным чашечным методом".

Три крайние разведения тест-штаммов (*Pseudomonas aeruginosa* 27 /99, *Serratia marcescens* 1 *St.aureus* ATCC 25923 ; *Candida albicans* 885–653 – для среды Сабуро агаризованной): 10^6 , 10^7 , 10^8 высевали на исследуемые среды пипеткой по 0,1 см³ и равномерно распределяли по поверхности среды шпателем. Учет результатов проводили через 24–48 часов при инкубации посевов при температуре ($37 \pm 0,3^\circ\text{C}$) и для *Candida albicans* 885–653 ($24 \pm 0,3^\circ\text{C}$).

Среды считали пригодными по показателю «стабильность», если отсутствует рост нетипичных колоний или допускается наличие не более 5 нетипичных колоний в разведении 10^7 .

Исследование стабильности свойств жидких и полужидких сред определяли «качественным пробирочным методом» по наличию типичного роста, изменению цвета среды и т.д.

Подготовленный инокулят тест штаммов (*Corinebacterium xerosis* 1911, *St. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O55) в разведении 10^4 КОЕ/см³ бактериологической петлей в 1 мкл высевает в толщу среды для полужидких и в среду для жидких сред. Посевы инкубировали 24 часа при температуре ($37 \pm 0,3^\circ\text{C}$).

Стабильность оценивали в баллах:

0 - отсутствие роста, изменения цвета среды, газообразование и т.д.;

1 - рост, ферментация, газообразование и т.д. выражены слабо;

2 - рост, ферментация, газообразование и т.д. выражены хорошо.

Для тест-штаммов показатель стабильности свойств исследуемых и эталонных сред должен составлять два балла в двух засеянных пробирках.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты проверки качества испытываемых питательных сред по физико-химическим показателям исследуемых и эталонных питательных сред представлены в таблицах 2,3. Из данных таблиц 2, 3 следует, что испытываемые варианты питательных сред по внешнему виду, цвету и концентрации водородных ионов отличались как от эталона, так и между собой.

Следующим этапом нашей работы было проведение исследований по контролю качества ростовых свойств исследуемых питательных сред по показателям «продуктивность» и «стабильность свойств» тест штаммов микроорганизмов по сравнению с эталоном с целью отбора наиболее эффективного варианта среды при изготовлении противобактериальных препаратов. Результаты исследований представлены в таблицах 4, 5. Как видно из данных таблиц 4, 5, исследуемые питательные среды не уступали эталонным как по показателю «продуктивность», так и по стабильности культуральных свойств тест-штаммов. Лучшим образцом смеси мидийного и килечного гидролизата в качестве азотсодержащей основы для изготовления питательных сред признан образец в составе которого 25%МГ и 75%РГ, результаты исследования которого максимально приближены к эталонному.

Таблица 2 – Физико-химическая характеристика исследуемых и эталонных питательных сред

Физико-химические показатели качества сред	Эталонная питательная среда	Варианты исследуемых питательных сред					
		100% МГ	75% МГ+25% ГК	50% МГ+50% ГК	33% МГ+67% ГК	25% МГ+75% ГК	100%ГК
	МПА	Твердые питательные среды					
Внешний вид	Гель без посторонних включений						
Цвет	Желтый	Темно-коричневый	Темно-коричневый	Коричневый	Желто-коричневый	Желтый	Желтый
Консистенция	Однородная						
рН	7,0±0,1	7,1±0,1	7,05±0,1	7,02±0,1	7,0±0,1	7,04±0,1	7,09±0,1
Аминный азот (мг%)	110,0±5,0	110,0±5,0	110,0±5,0	110,0±5,0	110,0±5,0	110,0±5,0	110,0±5,0
	Среда Сабуро агаризованная	Твердые питательные среды					
Внешний вид	Гель без посторонних включений						
Цвет	Желтый	Темно-коричневый	Темно-коричневый	Коричневый	Желто-коричневый	Желтый	Желтый
Консистенция	Однородная						
рН	5,8±0,2	5,7±0,2	5,8±0,2	5,75±0,2	5,8±0,2	5,7±0,2	5,8±0,2
Аминный азот (мг%)	75,0±5,0	75,0±5,0	75,0±5,0	75,0±5,0	75,0±5,0	75,0±5,0	75,0±5,0

Таблица 3 – Результаты физико-химических характеристик исследуемых и эталонных питательных сред

Наименование физико-химических показателей качества сред	Наименование эталонной питательной среды	Варианты исследуемых питательных сред					
		100% МГ	75% МГ+25% ГК	50% МГ+50% ГК	33% МГ+67% ГК	25% МГ+75% ГК	100%ГК
	МПБ	Жидкие питательные среды					
Внешний вид	Прозрачная жидкость	Не прозрачная жидкость	Не прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость	Прозрачная жидкость
Цвет	Желтый	Темно-коричневый	Темно-коричневый	Коричневый	Желто-коричневый	Желтый	Желтый
Консистенция	Однородная	Однородная	Однородная	Однородная	Однородная	Однородная	Однородная
pH	7,1±0,1	7,0±0,1	7,06±0,1	7,03±0,1	7,0±0,1	7,04±0,1	7,0±0,1
Аминный азот (мг%)	100,0±5,0	100,0±5,0	100,0±5,0	100,0±5,0	100,0±5,0	100,0±5,0	100,0±5,0
	Полужидкий МПА	Полужидкие питательные среды					
Внешний вид	Гель без посторонних включений	Гель без посторонних включений	Гель без посторонних включений	Гель без посторонних включений	Гель без посторонних включений	Гель без посторонних включений	Гель без посторонних включений
Цвет	Желтый	Темно-коричневый	Темно-коричневый	Коричневый	Желто-коричневый	Желтый	Желтый
Консистенция	Однородная полужидкая	Однородная полужидкая	Однородная полужидкая	Однородная полужидкая	Однородная полужидкая	Однородная полужидкая	Однородная полужидкая
pH	7,1±0,1	7,09±0,1	7,07±0,1	7,03±0,1	7,0±0,1	7,02±0,1	7,04±0,1
Аминный азот (мг%)	115,0±5,0	115,0±5,0	115,0±5,0	115,0±5,0	115,0±5,0	115,0±5,0	115,0±5,0

Таблица 4 – Результаты контроля качества исследуемых и эталонных питательных сред по ростовым свойствам

Показатели качества среды	Наименование эталонной питательной среды	Варианты исследуемых питательных сред					
		100% МГ	75% МГ+25% ГК	50% МГ+50% ГК	33% МГ+67% ГК	25% МГ+75% ГК	100%ГК
	МПБ / полужидкий МПА	Жидкие и полужидкие питательные среды					
Коэффициент продуктивности	1,0/1,0	0,5/0,6	0,7/0,7	0,8/1,0	1,2/1,0	1,2/1,3	0,9/1,0
Показатель стабильности – форма клеток	2,0/2,0	1,0/1,0	1,0/1,0	1,0/1,0	1,0/1,0	2,0/2,0	2,0/2,0
Окраска по Граму: – <i>Corinebacterium xerosis</i>	Короткие палочки, иногда булаво-видной формы, Г ⁺	Длинные, не типичные палочки, Г ⁺	Длинные, не типичные палочки, Г ⁺	Длинные, не типичные палочки, Г ⁺	Длинные, не типичные палочки, Г ⁺	Короткие палочки, иногда булаво-видной формы, Г ⁺	Короткие палочки, иногда булаво-видной формы, Г ⁺
– <i>St.aureus</i>	Единичные иногда парами кокки, Г ⁺	Мелкие Г ⁺ кокки	Мелкие Г ⁺ кокки	Мелкие Г ⁺ кокки	Мелкие Г ⁺ кокки	Единичные иногда парами кокки, Г ⁺	Единичные иногда парами кокки, Г ⁺
– <i>E.coli</i>	Г [–] единичные палочки	Толстые, не типичные Г [–] палочки	Толстые, не типичные Г [–] палочки	Толстые, не типичные Г [–] палочки	Толстые, не типичные Г [–] палочки	Г [–] единичные палочки	Г [–] единичные палочки

Таблица 5 – Результаты контроля качества исследуемых и эталонных питательных сред по ростовым свойствам

Показатели качества среды	Наименование эталонной питательной среды	Варианты исследуемых питательных сред					
		100% МГ	75% МГ+25% ГК	50% МГ+50% ГК	33% МГ+67% ГК	25% МГ+75% ГК	100%ГК
	МПА / агар Сабуро	Твердые питательные среды					
Коэффициент продуктивности	1,0/1,0	0,5/0,6	0,5/0,7	0,8/1,0	1,2/1,0	1,2/1,0	1,0/0,9
Показатель стабильности - форма клеток,	2,0/2,0	1,0/1,0	1,0/1,0	1,0/1,0	1,0/1,0	2,0/2,0	2,0/2,0
- <i>St.aureus</i>	Единичные иногда парами кокки, Г ⁺	Мелкие Г ⁺ кокки	Мелкие Г ⁺ кокки	Мелкие Г ⁺ кокки	Мелкие Г ⁺ кокки	Единичные иногда парами кокки, Г ⁺	Единичные иногда парами кокки, Г ⁺

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследуемые питательные среды на основе гидролизатов морских гидробионтов обеспечивают необходимые ростовые и культурально морфологические свойства тест штаммов, которые являются основным показателем эффективности использования питательных сред при изготовлении противобактериальных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Слесаревский, В.М. Приготовление панкреатического пептона из рыбы в растворе и сухом виде //Лабораторная практика. – 1931. – С. 11 – 12.
- 2 Гах, И.В Рыбные питательные среды //Полулях Н.Ф.Архив иологических наук. – 1936.– С.2 – 41.
- 3 Куперман, Т.М Эффективность применения сухих рыбных питательных сред // ., Фишер Г.М.Труды Хабаровского медицинского и нститута. –1940.С.115 – 118.
- 4 Георгиев, Т.Б Об использовании отходов рыбного промысла для

приготовления питательных сред/Триков В.Н. Авторефераты научных работ к итоговой научной конференции 1955г Днепропетровского НИИ микробиологии, эпидемиологии и гигиены им. Гамалея. М., 1955. – С. 5 – 17.

5 Лихварь, Н.А. Сухие питательные среды из свежих и замороженных отходов рыбной промышленности // Ученые записки Дагестанского научно-исследовательского института по производству питательных сред. – Махачкала, 1956.– С.2 – 5.

6 Лихварь, Н.А., Опыт производственного получения рыбных автолизатов из отходов Каспийской кильки для приготовления сухих питательных сред. Чанпалов П.Ф, Затурский А.В и др. - Махачкала, 1956.– С.3 – 57.

7Егоян, С.Г. Питательная среда из сухого бульона триптического гидролизата кильки //Ветеринария. –1989. –№7.– С.32 – 65

8 Деклараційний патент на корисну модель "Спосіб отримання поживної основи мікробіологічних середовищ". Бюл.№ 6 от 25.03.2008. Заявка у 2007 13089 от 26.112007. Авторы: Рябушко В.І., Голуб М.О., Єрохін В.Є., Пархоменко Н.А., Кисельова Т.Ф.

9 Деклараційний патент на корисну модель "Поживне середовище "Аквamedia" для культивування мікроорганізмів" Бюл. №16 от 26.08.2008. Заявка у 2008 00653 от 21.01 2008. Авторы:Єремєєв В.Н., Рябушко В.І., Голуб М.О, Єрохін В.Є., Пархоменко Н.А., Кисельова Т.Ф., СкрипникВ.Г.

10 Пархоменко, Н.А., Кисельова Т.Ф., Голуб М.О., Рябушко В.І. Рости́ві властивості поживних середовищ з чорноморських гідробіонтів /. – Ветеринарна біотехнологія.– К., 2006. – №8. – С.197 – 202.

11 Колеснікова, К.Ю. Використання бактеріальних поживних середовищ з морепродуктів для культивування промислових штамів мікроорганізмів в умовах Херсонського державного підприємства – біологічна фабрика./.- Ветеринарна біотехнологія.Н.А. Пархоменко, В.І. Рябушко, М.О. Голуб, В.Г.Скрипник – К., 2008.- № 13(1). – С.273 – 277.

12 ДСТУ 4483:2005 Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначення бактерійної і грибної контамінації / Пархоменко Н.А., Акименко Л.І., Кисельова Т.Ф., Ординська Д.О. Остапєць М.Г.,/ Держспоживстандарт України – К.2006. – 20с.

13 Середовища поживні для ветеринарної медицини. Гідролізати з м'яса морських риб і молюсків. Технічні умови / Н. Пархоменко, Т. Кисельова, Д. Ординська, В. Рябушко, М. Голуб. // Проект ДСТУ, К., 2008. – 25с.

Якубовский М.В., доктор ветеринарных наук, профессор

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

ИММУНИТЕТ ПРИ ПАРАЗИТАРНЫХ БОЛЕЗНЯХ ЖИВОТНЫХ

В течение жизни практически все животные в той или иной степени подвергаются поражению экто- или эндопаразитами, при этом наблюдается или моноинвазия, или в организме чаще проявляются ассоциативные паразитозы. Только гельминтов у животных насчитывается более 900 видов. Наиболее распространенными паразитозами животных являются нематодозы желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей, инвазированность которыми в некоторых хозяйствах достигает более 80-85 %, а также фасциоз, эймериозы, криптоспоридиоз, гиподерматоз, болезни вызываемые нападением на животных клещей, гнуса и другие. Они наносят существенный вред животному, снижают уровень его роста и развития, уменьшают продуктивность, снижают выход молодняка и качество животноводческой продукции. При этом снижается племенная ценность животных, их функциональные качества. Однако одним из наиболее выраженных патогенных влияний паразитов на организм животного является снижение и изменение иммунного ответа.

У паразитов выработалось множество механизмов, позволяющих им избежать воздействия иммунного ответа хозяина. Шистосомы, например, могут терять поверхностные антигены после того, как они попадают в организм хозяина, соединять антигены хозяина и маскироваться под ткани хозяина или выделять антигены, блокирующие эффекторные клетки и антитела. Токсоплазмы после заглатывания макрофагом препятствуют слиянию фагосом с лизосомами. Некоторые возбудители, такие как филярии, лейшмании и другие индуцируют сильные супрессирующие механизмы, включающие Т – лимфоциты – супрессоры, которые снижают или сводят к нулю эффективность иммунного ответа хозяина. Например, *Taenia* sp. разрушают компоненты системы комплемента, амёбы продуцируют нейтрализующие факторы против макрофагов, аскариды обладают поверхностным слоем, играющим роль антигена, и могут индуцировать иммунный ответ, но сами устойчивы к этому воздействию.

Эффекторными механизмами хозяина против паразитов являются антитела, цитотоксические Т-лимфоциты, активированные Т-лимфоцитами макрофаги, естественные клетки-киллеры и различные клетки, ответственные за антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность. Сюда относятся также усиление иммунной системы за счет действия лимфокинов и системы комплемента. Иммуитет против ряда паразитов (шистосом, трипаносом и других) является гуморальным, но клеточные реакции также

участвуют в развитии иммунитета против этих и других паразитов, как, например, против возбудителей токсоплазмоза, шистосомозов, филяриатозов, трихинеллеза.

Проявление иммунитета при паразитарных болезнях животного в принципе укладывается в общие закономерности, характерные для инфекционных болезней, но при этом есть и существенные особенности. Общим патологическим воздействием возбудителей паразитарных болезней на организм животного, в первую очередь гельминтов, является аллергизация и иммуносупрессия. Способность паразитов угнетать и изменять иммунный ответ животного необходимо относить к факторам патогенности, так как уровень тяжести иммунодефицита напрямую зависит от степени вирулентности возбудителя.

Особенности проявления иммунного ответа при гельминтозах во многом зависят от морфологических и биологических особенностей возбудителей – антигенного состава их, размеров, своеобразной цикличности развития. Поэтому **иммунитет при паразитозах отличается слабой напряженностью и недостаточной специфичностью**. Более выраженные иммунологические изменения в организме животного проявляются при паразитировании личинок паразитов. При этом ведущим патогенетическим фактором в этот период является аллергия. Роль аллергенов в данном случае могут играть как соматические, так и функциональные антигены гельминтов, на которые вырабатываются антитела различных классов иммуноглобулинов – в большей степени Ig E, меньше Ig A и Ig G.

Мелкие и внутриклеточные паразиты могут уничтожаться активированными макрофагами путем фагоцитоза. Макрофаги, нейтрофилы, а также NK-клетки способны вести контактный цитоллиз пораженной паразитом клетки. Однако это, как правило, антителозависимый процесс и на ранних стадиях он возможен только при соответствующем количестве естественных антител. При формировании иммунного ответа на те или иные паразитарные антигены эффективность защитных реакций зависит в значительной степени от характера паразитирования возбудителя, а также от того, насколько значимы нейтрализуемые антигены в патогенезе и жизнеобеспечении паразита.

Антитела чрезвычайно важны для иммунитета при паразитарных болезнях, которые участвуют во многих защитных реакциях. Они собираются на поверхности эозинофилов, макрофагов, нейтрофилов, тромбоцитов, тучных клеток и базофилов, придавая процессам дегрануляции этих клеток антиген-специфическую направленность. При этом процессы внеклеточного цитоллиза становятся не только целенаправленными, но и значительно более интенсивными.

Антитела, сорбированные на поверхности макрофагов, нейтрофилов, а также NK-клеток, позволяют этим лейкоцитам вести контактный цитоллиз пораженных клеток. Антитела (наряду с комплементом) усиливают меха-

низмы фагоцитоза. Они также запускают механизмы активации комплемента непосредственно на поверхности паразита. Антитела могут нейтрализовать токсины, выделяемые гельминтами, а также блокировать рецепторы, позволяющие мелким паразитам прикрепляться к клетке или проникать в нее, что обрывает весь процесс паразитирования.

Фагоциты и гранулоциты в ответ на активацию и распознавание паразитарных клеток активируются и начинают процесс внеклеточного цитолиза. Механизмы этого процесса сводятся к высвобождению содержимого гранул лейкоцитов во внеклеточное пространство (дегрануляция). Поскольку этот процесс происходит, как правило, в непосредственной близости от паразита, то на поверхность последнего обрушивается масса протеолитических и других ферментов, токсических метаболитов кислорода и азота, а также все другие цитолитические компоненты гранулоцитов. В результате даже плотные покровы многоклеточных паразитов могут быть лизированы.

Особенно важную роль в процессах противопаразитарного внеклеточного цитолиза играют эозинофилы и нейтрофилы. Эозинофилы специализируются на осуществлении внеклеточного цитолиза крупных паразитов, которые развиваются в тканях, но из-за своих размеров не могут быть уничтожены фагоцитированием.

Эозинофилы содержат в своих гранулах чрезвычайно токсичный для паразитов «главный основной белок», который не вызывает значительных повреждений собственных клеток хозяина. Нейтрофилы также содержат в составе своих гранул весьма токсичные для паразитов продукты, особенно дефензины.

В процессе разрушения структуры паразитов (как одноклеточных, так и многоклеточных) значительную роль играет комплемент. Помимо непосредственного лизиса паразитарных клеток, компоненты комплемента выполняют и опсонизирующую функцию. Это облегчает распознавание и контакт с паразитарной клеткой фагоцитов, эозинофилов и других клеток, имеющих соответствующие рецепторы.

Макрофаги, в ответ на некоторые антигенные компоненты паразитов (в частности, на фосфолипидсодержащие антигены) секретируют цитокины, которые активируют как сами фагоциты, так эозинофилы и тромбоциты. Кроме того, цитокины макрофагов могут влиять не только на клетки иммунной системы, но и на другие соматические клетки организма. В результате эти клетки становятся более устойчивыми к воздействию паразитов.

Эозинофилы впервые описаны Р. Ehrlich в 1879 г. Их размеры у различных животных неодинаковы: у коров, например, диаметр этих клеток в среднем составляет 13,1 мкм, у лошадей – 15,0 мкм, свиней – 13,2 мкм, овец – 12,1 мкм. Количество эозинофилов также различно у животных и составляет в среднем (%): у коров – 4,0; лошадей – 4,5; свиней – 2,5 и овец – 5,0.

Эозинофил по своему строению состоит из клеточной мембраны,

цитоплазмы, ядра и гранул. Ядро эозинофила состоит из двух долек, связанных между собой нитью. Особенностью цитоплазмы их является наличие двух типов специфических гранул – больших и малых, красного или оранжевого цвета. **Большие гранулы** содержат основные протеины, являющиеся уникальными для эозинофилов. Малые гранулы содержат ферменты арилсульфатазу «В» и кислотную фосфатазу.

Эозинофилы непрерывно образуются в костном мозге из единой стволовой клетки. Этот процесс регулируют Т-лимфоциты. Продолжительность жизни эозинофилов составляет 10-12 дней. Из костного мозга, где они созревают в течение 3-4 дней, эозинофилы попадают в кровь и несколько часов там циркулируют, а затем уходят в периваскулярные ткани, главным образом легкие, желудочно-кишечный тракт и кожу, где остаются до 10-14 дней (1, 3).

При паразитарных болезнях наблюдается гиперэозинофилия. Высокое содержание эозинофилов наблюдается при стронгилоидозе, токсокарозе, аскаридозе, фасциолезе, трихинеллезе, описторхозе, других гельминтозах, при гиподерматозе, чесотках. Эозинофилы способны прикрепляться к паразитам, локально высвобождать содержимое гранул и вводить их содержимое в цитоплазму паразита.

К клеткам иммунной системы относят лимфоциты, макрофаги и другие антиген – представляющие клетки. Взаимодействие клеток в иммунном ответе осуществляется с помощью гуморальных медиаторов – цитокинов. Основные клетки иммунной системы – **Т- и В-лимфоциты**. Лимфоциты имеют общую морфологическую характеристику, но их функции, поверхностные CD- маркеры индивидуального (клонального) происхождения, различны. По наличию поверхностных CD – маркеров лимфоциты разделяются на функционально различные популяции и субпопуляции.

Т-лимфоциты находятся в так называемых Т-зависимых зонах периферических лимфоидных органов – в белой пульпе селезенки и паракортикальных зонах лимфоузлов. Они отвечают за клеточный иммунитет и иммунные реакции клеточного типа. Хотя отдельные субпопуляции их помогают В-лимфоцитам реагировать на Т-зависимые антигены выработкой антител.

Известны три основные группы Т-лимфоцитов: помощники (активаторы), эффекторы и регуляторы. Первая группа включает Т-хелперы, индукторы Т-хелперов и индукторы Т-супрессоров. Вторая группа состоит только из одной субпопуляции Т-киллеров. Третья группа – Т-клетки – регуляторы. Известны также Т-супрессоры и Т-контрсупрессоры. Количество Т-лимфоцитов может изменяться в зависимости от уровня развития организма.

В-лимфоциты принимают эффекторное участие в гуморальных иммунных реакциях, дифференцируются при антигенной стимуляции в плазматические клетки, продуцирующие антитела. Образование В-клеток у пло-

да происходит в печени, затем в костном мозге, при этом процесс созревания В-клеток происходит в две стадии – антиген – независимую и антиген – зависимую.

В формировании иммунного ответа принимают участие все звенья иммунной системы – макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, комплемента, интерферонов и главная система гистосовместимости, что происходит в следующей последовательности: поглощение и процессинг антигена макрофагом, представление антигена Т-хелперам, узнавание ими данного антигена, узнавание антигена и активация В-лимфоцитов и, наконец, дифференциация В-лимфоцитов в плазматические клетки и синтез антител. После взаимодействия антител с антигеном, происходит активация систем комплемента, макрофагов и интерферонов, после чего идет разрушение инфицированных чужеродными антигенами клеток Т-киллерами и в заключении происходит индукция Т- и В-клеток иммунной памяти для вторичного иммунного ответа.

Основными формами иммунного ответа на попадание антигена в организм являются биосинтез антител, образование клеток иммунной памяти, реакция гиперчувствительности замедленного типа, иммунологическая толерантность и другие реакции (1).

Гуморальный иммунитет характеризуется выработкой антител (иммуноглобулинов). По международной классификации ВОЗ совокупность сывороточных белков, имеющих свойства антител, называют **иммуноглобулинами (Ig)**. В зависимости от места нахождения иммуноглобулины подразделяются на три группы:

- сывороточные (в крови);
- секреторные (в молоке, слюне, содержимом желудочно-кишечного тракта). Они обеспечивают местный иммунитет (иммунитет слизистых);
- поверхностные (на поверхности иммунокомпетентных клеток, особенно В-лимфоцитов).

Выявлено пять классов иммуноглобулинов, которые отличаются строением тяжелых цепей, молекулярной массой, биологическими, физическими и химическими свойствами: Ig G, Ig M, Ig A, Ig E и Ig D.

Основным классом иммуноглобулинов является **Ig G**, которые защищают организм от паразитов, вирусов, бактерий, токсинов. Они участвуют в формировании иммунитета и иммунологической памяти. Концентрация их в крови более высокая по сравнению с другими иммуноглобулинами. Так как Ig G имеют небольшие размеры – около 150 кДа, они свободно диффундируют из сосудистого русла во внеклеточное пространство, а также проникают через плацентарный барьер из крови матери в кровь плода.

Количество Ig в крови увеличивается при паразитарных и бактериальных болезнях, при хронических болезнях печени, при аутоиммунных и других болезнях.

Самыми крупными иммуноглобулинами являются **Ig M**. Это наибо-

лее ранний класс антител, образующихся в организме при попадании в него антигена. Ig M является единственным классом иммуноглобулинов, которые синтезируются до рождения животного. Если в крови новорожденных кроме Ig M обнаруживают иммуноглобулины других классов, то это свидетельствует о внутриутробном заражении плода каким-либо возбудителем. Ig M связывают комплемент активнее, чем Ig G. В-лимфоциты имеют поверхностные рецепторы к Ig M и секретируют Ig M первыми – это первичный ответ на внедрение антигена. Концентрация Ig M в крови ниже, чем Ig G, но они способны агглютинировать бактерии, нейтрализовать вирусы, активизировать фагоцитоз, связывать токсины. Повышение Ig M происходит при паразитарных болезнях, вирусной инфекции.

Иммуноглобулины класса А – основные иммуноглобулины в биологических секретах: слюне, слезной жидкости, слизи бронхиального и кишечного эпителия, молоке. Кроме этого имеются еще и сывороточные Ig A. Основная роль Ig A – обеспечение местного иммунитета слизистых. Они нейтрализуют токсины, активизируют фагоцитоз и систему комплемента.

Иммуноглобулины класса Е играют важную роль в антипаразитарном иммунитете, но главное значение Ig Е – участие в развитии аллергических реакций. Эти иммуноглобулины опсонизируют клеточную поверхность тучных клеток и базофилов. При встрече Ig Е с антигеном клетка – носитель Ig секретирует гистамин и другие подобные вещества, которые вызывают аллергическую реакцию.

Иммуноглобулины класса D находятся в крови в очень низких концентрациях, они образуются В-лимфоцитами и остаются к ним прикрепленными. Считают, что Ig D принимают участие в дифференциации В-лимфоцитов, участвуют в аутоиммунных процессах.

Все указанные иммуноглобулины изменяются при паразитарных болезнях животных, количественные и качественные характеристики этих изменений зависят от вида возбудителя, первичного или повторного заражения, возраста животных, условий их кормления и содержания (рис. 1).

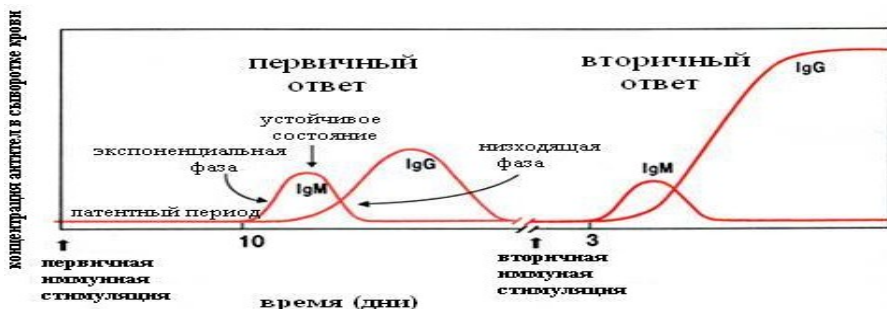


Рисунок 1 – Особенности первичного и вторичного иммунного ответа организма на внедрение антигена

В течение иммунологического процесса образуются **циркулирующие иммунные комплексы**.

Циркулирующие иммунные комплексы обеспечивают в организме реализацию многих иммунологических процессов. Но повышенное содержание их и длительная циркуляция приводит к отложению иммунных комплексов на эндотелии сосудов паренхиматозных органов, в том числе почек. Иммунные комплексы эффективно разрушаются мононуклеарными фагоцитами. При их отложении развиваются реакции, опосредуемые компонентом и эффекторными клетками – так называемые реакции гиперчувствительности III типа или болезнь иммунных комплексов.

Патогенные свойства циркулирующих иммунных комплексов антиген-антитело определяются следующими факторами:

- структурами и функциональными свойствами комплексов антиген – антитело, в частности размерами комплексов и структурой их решетки;
- продолжительностью циркуляции иммунных комплексов в организме;
- местом образования комплексов.

Циркулирующие иммунные комплексы состоят из антигена, антитела и связанных с ними компонентов комплемента C_3 , C_4 , C_{1q} . Циркулирующие иммунные комплексы способны повреждать ткани собственного организма.

В норме иммунные комплексы, образовавшиеся в кровотоке, фагоцитируются и разрушаются. В крови иммунные комплексы не только связаны с эритроцитами, но присутствуют также в свободной форме. Связанные с эритроцитами комплексы реже оказывают повреждающее действие.

Система комплемента – группа по меньшей мере 25 сывороточных белков (компонентов комплемента), синтезируются в основном в печени. Основные функции их в защитных реакциях – стимуляция фагоцитоза, нарушение целостности клеточных стенок микроорганизмов, индукция синтеза медиаторов воспалительного ответа, стимуляция воспалительных реакций, участие в развитии иммунных и анафилактических реакций (3).

Таким образом, в организме животного сложилась сложная система иммунитета для защиты от паразитических простейших, гельминтов, клещей и насекомых.

В течение многих лет нами проводились комплексные исследования иммунитета различных видов животных с использованием современных приборов и оборудования. Результаты наших многолетних исследований совместно с сотрудниками отдела паразитологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» показывают, что при ассоциативных кишечных нематодозах поросят происходит сложная иммунологическая перестройка в организме, при этом в крови животных уровень лейкоцитов увеличился на 30,42 % ($P < 0,02$), количество эозинофилов достигает $6,40 \pm 0,95$ % ($P < 0,001$), повышается количество Т- и В- лимфоцитов в 2-2,5 раза.

Соотношение и динамика появления иммуноглобулинов различных классов в сыворотке крови поросят меняется в зависимости от вида гельминта и стадии его развития, обуславливающих поступление в организм хозяина качественно различных антигенов. При смешанных нематодозах количество Ig A в сыворотке крови увеличивается на 62,96 % ($P < 0,05$), Ig M – в 3,5 раза и Ig G – на 69,27 % ($P < 0,01$). При экспериментальном заражении кишечными нематодами свободных от паразитов поросят наблюдается первичный иммунный ответ с резким увеличением Ig M, меньше – Ig G и Ig A.

В то же время в крови животных резко снижается уровень гормонов – кортизола, инсулина, тироксина и трийодтиронина, витаминов – ретинола, рибофлавина и аскорбиновой кислоты, нарушается обмен микроэлементов – калия, кальция, натрия, магния и микроэлементов – железа, меди, цинка, кобальта и йода. Одновременно в организме свиней происходит значительная аллергизация – в крови и органах – печени, легких, мезентеральных лимфоузлах, селезенке, тонком и толстом кишечнике наблюдается увеличение гистамина в 2-4 раза. Все это приводит к нарушению работы иммунной системы в организме свиней.

Увеличение уровня гистамина в организме животных при ассоциативных кишечных нематодозах нарушает передачу управляющих сигналов от регуляторов систем к их объектам управления. Гистамин – это растворимое в воде основание, непрерывно синтезирующееся в тканях. Он выводится из клетки и активизируется при раздражении или разрушении клетки. Главными клетками, синтезирующими гистамин, являются тучные клетки соединительной ткани и их функциональные аналоги в крови – базофилы. Инвазирование свиней кишечными нематодами приводит к снижению привесов животных на 29,13 %.

Многообразие патогенеза при гельминтозах в основном определяется вторичными неспецифическими факторами, среди которых доминирующую роль играют нервно-рефлекторные, гуморальные, иммунологические и аллергические процессы (Р.С. Шульц и соавт., 1961). Установлено, что при гельминтозах большую роль играет эндокринная система, в т.ч. повышение ее активности и, в первую очередь, гормонов надпочечников. При этом происходит подавление иммунитета зараженного организма, что способствует его заражению и повышению приживаемости гельминтов.

При исследовании аскаридоза свиней в организме установлено увеличение кортизола через 2 недели после заражения на 57,82 %. При этом обычно снижается количество инсулина и тироксина. Так, при нематодозах свиней количество тироксина снижается на 74,0 %, что в конечном счете оказывает отрицательное влияние на иммунитет животных (М.В. Якубовский, 1987).

Стронгилятозы желудочно-кишечного тракта коров имеют широкое распространение (до 85 %) и наносят существенный ущерб. Нами, наряду с

эпизоотологией, изучался уровень иммунитета при стронгилятозах желудочно-кишечного тракта коров и разрабатывались меры борьбы с ними (2).

При спонтанном инвазировании коров стронгилиятами наблюдали лейкоцитоз, эозинофилию, уровень Т- и В-лимфоцитов был понижен. Количество общего белка у инвазированных стронгилиятами коров было повышено и составило 86–96 г/л, уровень Ig A составил $0,37 \pm 0,08$ – $0,73 \pm 0,17$ мг/мл. Несколько выше было содержание Ig M – $2,61 \pm 0,09$ – $2,94 \pm 0,15$ мг/мл и самое высокое было содержание Ig G – $12,91 \pm 1,60$ – $14,09 \pm 1,98$ мг/мл. В сыворотке крови зараженных стронгилиятами желудочно-кишечного тракта коров наблюдалось также повышенное содержание иммунных комплексов – до 0,35 ед/мл.

Приведенные данные свидетельствуют о глубоком нарушении клеточного и гуморального иммунитета у коров при стронгилятозах желудочно-кишечного тракта, что отрицательно сказывается на продуктивности животных, их устойчивости к различным заболеваниям.

При фасциолезе крупного рогатого скота наблюдается угнетение клеточного иммунитета – эритроцитопения, лимфоцитопения, снижение уровня Т- и В-лимфоцитов, активность макрофагов снижается на 28,73%, уровень эозинофилов увеличивается на 32,52%. При этом общий белок снижается на 20,12%, концентрация IgA и IgG – на 47,50% и 56,60%, количество иммунных комплексов увеличивается на 42,85% (4).

При клиническом проявлении гиродерматоза крупного рогатого скота количество лейкоцитов увеличивается на 34,12%, при этом наблюдается повышение эозинофилов в крови в 2,4 раза. Уровень Т-лимфоцитов снижается на 23,91%, В-лимфоцитов – на 18,56%. Количество общего белка снижается на 9,71%, IgG – на 42,17%, но увеличивается количество IgM – на 30,06% и IgA – на 10,0%. Характерным также является снижение активности щелочной фосфатазы на 15,26%, лактатдегидрогеназы – на 21,63%. Количество аспартатаминотрансферазы повышалось на 5,73% и аланинаминотрансферазы – на 16,48% (5).

Кроме прямого иммуносупрессивного влияния на животных паразитические организмы оказывают **угнетающее воздействие на поствакцинальный иммунитет**. Наши многолетние исследования показали, что при ассоциативных нематодозах кишечного тракта поросят снижается поствакцинальный иммунитет против болезни Ауески. Результаты иммунологических исследований в РНГА сывороток крови свободных от нематод поросят, вакцинированных сухой вирус - вакциной ВГНКИ против болезни Ауески показали, что на десятый день после применения вакцины среднегеометрический титр антител в сыворотке крови составил $4,5 \log_2$, тогда как у зараженных гельминтами и вакцинированных против болезни Ауески титры антител составили только $2,75 \log_2$.

Следовательно, у инвазированных кишечными нематодами поросят нарушается иммуногенез при их вакцинации против инфекционных болез-

ней, животные более тяжело переносят вакцинацию и в результате вырабатывается недостаточно напряженный иммунитет (М.В. Якубовский, 1985 г.).

ВЫВОДЫ

1 Паразитарные болезни вызывают существенное снижение иммунитета животных, что приводит к снижению продуктивности, поствакцинального иммунитета, уменьшаются работоспособность и функциональные качества животных.

2 Профилактика паразитозов и, следовательно, сохранение иммунитета должна быть комплексной. Прежде всего, необходима ранняя диагностика паразитозов, применение иммуномодуляторов, а также комплексных противопаразитарных средств с иммуномодуляторами, имеющими широкий спектр действия. К таким препаратам не будет быстрого привыкания паразитических организмов.

3 Важным является применение патогенетических средств после дегельминтизации животных – витаминов, ферментов, микроэлементов, аминокислот и др., обеспечивающих в более короткий срок полное выздоровление животных.

4 Эффективными способами профилактики паразитозов и сохранения иммунитета животных являются технологические приемы – на свиноводческих комплексах – гидросмыв навоза, применение системы содержания животных – «пусто-занято» и др., для жвачных животных – пастбищная профилактика паразитарных болезней, химиопрофилактика и др. Перспективным способом профилактики ряда паразитозов является ранняя иммунодиагностика и вакцинопрофилактика.

ЛИТЕРАТУРА

1 Даугалиева, Э.Х. Иммунный статус и пути его коррекции при гельминтозах сельскохозяйственных животных/, Э.Х. Даугалиева. В.В.Филиппов// М.:Колос, 1991. – 336 с.

2 Кузьминский, И.И. Стронгилятозы желудочно-кишечного тракта коров (эпизоотический процесс, особенности иммунного ответа, эффективность применения иммуностимуляторов и комплексных антгельминтиков)/Автореф....канд.дисс., Минск. 2012. – 20 с. Chauvin, A. Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* in cattle and sheep/ A.Chauvin, G.Bouvet/J. Parasitology, 1995.– Vol. 25.– P. 72 – 76.

4 Щурова, Н.Ю. Иммунологические показатели у крупного рогатого скота при фасциозе/Н.Ю. Щурова, М.В.Якубовский//Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: матер. науч. конф. Москва 23– 25 мая 2006 г./ВИГИС, Всерос.об-во гельминтол., Москва, 2006.– С. 449– 451.

5 Якубовский, М.В. Паразитарные зоонозы/М.В. Якубовский, Т.Я. Мясцова, Е.А.Степанова, Н.Ю. Щемелева// Минск: Наша Идея, 2012. – 384 с.

Ятусевич А.И., доктор ветеринарных наук, профессор
Субботин А.М., доктор биологических наук, доцент
Самсонович В.А., кандидат сельскохозяйственных наук

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

ФУНКЦИОНИРУЮЩАЯ ПАРАЗИТАРНАЯ СИСТЕМА ДОМАШНЕЙ И ДИКОЙ СВИНЬИ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ВВЕДЕНИЕ

Свиноводство в Республике Беларусь является ведущей отраслью животноводства. В мясном балансе государства свинина занимает 42%. Для нормального функционирования данной отрасли и понижения себестоимости производимой ею продукции необходимо эффективно решить целый спектр проблем, среди которых особое место занимают болезни свиней паразитарной этиологии. В этой связи нами и было выбрано направление исследований, изучить структуру паразитарной системы у свиней, выращиваемых на промышленной основе.

Говоря про дикую свинью или кабана нужно отметить, что он, как биологический вид, занимает особое место среди диких копытных. Его численность в Беларуси превышает 80 000 особей, а плотность достигает более 7 особей на 1000 га лесной площади. Большая плотность кабана на территории Беларуси, его всеядность и регулярное посещение агробиотопов обуславливают его высокую инвазированность гельминтами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на кафедре паразитологии УО “Витебская государственная академия ветеринарной медицины” и в свиноводческих хозяйствах Республики Беларусь.

Гельминтологические исследования проводили по общепринятым паразитологическим тестам: флотационными, методами полного и частичного гельминтологического вскрытия.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Наши исследования паразитарной системы домашней свиньи показали (таблица 1), что на свинофермах с традиционной технологией и племхозах кишечные паразиты распространены достаточно широко. Так, на фермах максимальная инвазированность отмечена у молодняка старше 4 месяцев, но только при зараженности двумя видами паразитов – 34,28 %,

при трех и четырех – показатель был чуть ниже (13,37%, 7,01%), у поросят-отъемышей соответственно 29,56% – двумя; 21,69% – тремя ; 10,0 % – четырьмя разными видами. У свиноматок показатель также был высоким, в пределах 34,19% – 5,15%. Значительная экстенсивность смешанной инвазии имела место у молодняка старше 4 месяцев: 29,57% (два вида паразитов), 20,19 % (три возбудителя), 7,31% (четыре инвазионных начала). Самый низкий процент был у хряков (7,07% – 3,03%). У поросят сосунов инвазий, состоящих из 4 видов паразитов зафиксировано не было. Двух – паразитные инвазии были на уровне 16,69%, трех – 0,97%.

Таблица 1 – Смешанные ассоциации желудочно-кишечного тракта свиней

ПОКАЗАТЕЛИ	СВИНОФЕРМА				ПЛЕМХОЗЫ			
	Обслед. жив.	2 вида паразитов	3 вида паразитов	4 вида паразитов	Обсл. животных	2 вида паразитов	3 вида паразитов	4 вида паразитов
Животные: поросыта-сосуны	623	113/18,13	53/8,5	25/4,01	515	86/16,69	5/0,97	
поросыта-отъемыши	1194	353/29,56	259/21,69	120/10,05	651	206/31,64	125/19,2	51/7,83
молодняк старше 4 месяцев	770	264/34,28	103/13,37	54/7,01	629	186/29,57	127/20,19	46/7,31
свиноматки	1188	330/27,77	178/14,98	76/6,39	582	199/34,19	88/15,12	30/5,15
хряки	111	6/5,4	3/2,7	3/2,7	99	7/7,07	7/7,07	3/3,03
откормочное поголовье	756	203/26,85	84/11,11	44/5,82	44	21/47,72	7/15,09	1/2,27
Итого	4642	1269/27,33	680/14,64	322/6,93	2520	705/27,97	359/14,24	131/5,19

Как свидетельствуют результаты исследований, чаще отмечается инвазия 2 паразитами (27,97 %). Сочетания с 3 видами возбудителей диагностировались значительно реже (14,24 %), а с четырьмя видами – только у 5,19%. Изучение паразитологической ситуации на свиноводческих комплексах различной мощности показало (таблица 2), что смешанная инвазия в этих хозяйствах регистрируется реже (20,82%–3,58%, 17,3%–2,54% и 12,2%–1,16%). Причем, чем крупнее комплекс, тем ниже показатель. Наиболее часто смешанная инвазия двумя видами паразитов в комплексах на 24 тысяч голов свиней встречается у поросят-отъемышей (26,65%), но четырьмя видами – низкая 3%. У поросят-сосунов показатель невысок (10,09% – 0,1%), как и у хряков (7,4%–1,23%), а у свиноматок (22,54%–4,4%), молодняка старше 4 месяцев (26,18%–5,83%) и откормочного поголовья (22,53% – 5,79%), смешанная инвазия регистрируется часто.

Таблица 2 – Смешанные ассоциации паразитов желудочно-кишечного тракта свиней

	Свиноводческие комплексы мощностью 24 тыс.				Свиноводческие комплексы мощностью 54 тыс. и 108 тыс. (производственное стадо)							
	Обсл. животных	инвазировано			Обслед. живот.		инвазировано					
		2 вида паразитов	3 вида паразитов	4 вида паразитов			2 вида паразитов	3 вида паразитов	4 вида паразитов			
Животные: Поросята- сосуны	911	92/10,09	16/1,75	1/0,1	54 тыс.	108 тыс.	54 тыс.	108 тыс.	54 тыс.	108 тыс.	54 тыс.	108 тыс.
					677	348	55/8,12	-	4/0,59	-	1/0,14	-
Поросята- отъемыши	964	257/26,65	124/12,86	29/3	726	366	149/20,5	68/18,57	70/9,64	40/11,49	12/1,65	8/2,18
Молодняк старше 4 месяцев	634	166/26,18	102/16,08	37/5,83	521	356	146/28	81/22,75	6/14,58	24/6,74	15/2,87	1/0,28
Свином.	794	179/22,54	70/8,81	35/4,4	582	379	87/14,94	37/9,76	49/8,41	14/3,69	27/4,63	6/1,58
Хряки	162	12/7,4	4/2,46	2/1,23	84	61	3/1,85	1/1,63	-	1/1,63	-	-
Откорм, поголовье	914	206/22,53	94/10,28	53/5,79	707	383	133/18,81	41/10,7	7/10,85	16/4,17	29/4,1	7/1,82
Итого	4379	912/20,82	410/9,36	157/3,58	3297	1893	573/17,3	231/12,2	76/8,3"	95/5,54	84/2,54	22/1,16

В свиноводческих комплексах мощностью 54 и 108 тыс. голов распространение смешанной инвазии схоже с хозяйствами мощностью 24 тыс. голов. Поросята-сосуны заражены не сильно (8,12 % – 0,14 %), а на комплексах со 108 тысячами голов вообще случаев полиинвазии у этих групп не зарегистрировано. Поросята-отъемыши инвазированы примерно одинаково: 20,5 % – 1,65 %; 18,57 % – 2,18 %. Самая большая пораженность двумя паразитами отмечена у молодняка старше 4 месяцев: 28 % – 2,87 %; 22,75 % – 0,28 %. Свиноматки поражены на 14,94 % – 4,63 %; 9,76 % – 1,58 %. У хряков 4-членная паразитарная инвазия не зарегистрирована вообще, 3 возбудителя выявлены только на 108 тыс. комплексе (1,63 %). Откормочное поголовье заражено на 18,81 % – 4,1 % и 10,7 % – 1,82 % соответственно.

Среди поросят-сосунов (таблица 3) наиболее распространенным гельминтом был стронгилоид (35,55 %), часто встречались эймерии (35,55 %). Балантидии обнаружены у 6,4 % обследованных поросят. Имелись единичные случаи заражения аскариозом (4,13 %), трихоцефалезом (2,7 %), эзофагостомозом (3,25 %). Животные этой группы были инвазированы гельминтами незначительно. Невысокая экстенсивность гельминтозной инвазии обусловлена сроками эндогенного развития. Для большинства указанных паразитов требуется до 1,5 месяца, чтобы достигнуть половой зрелости. Отъем поросят и перевод в группу отъемышей производится в 50 – 60 дней. Вероятность массового заражения поросят в первые дни рождения невелика.

Таблица 3 – Инвазированность свиней кишечными паразитами

Возр. группы	Возбудители					
	Аскарисы	Стронгилоиды	Трихоцефалы	Эзофагостомы	Эймерии	Балантидии
Поросята-сосуны	127/4,13 %	1093 /35,55 %	83/2,7 %	100/3,25	1073/35,55	197/6,4
Поросята-отъемыши	936/23,99	1742/44,56	829/21,25	561/14,38	1333/34,17	474/12,15
Поросята старше 4 месяцев	760/25,58	1233/41,5	692/23,29	715/24,06	1150/38,7	382/12,85
Свиноматки	764/22,05	1082/31,23	428/12,35	812/23,44	1081/31,2	416/12
Хряки	25/4,83	54/10,44	25/4,83	64/12,37	78/15,08	21/4,06
Откорм	789/28,13	764/27,24	650/23,18	637/22,71	635/22,64	273/9,73
ВСЕГО	3401/20,32	5968/35,67	2707/16,17	2889/17,26	5350/31,97	1763/10,53

Вместе с тем к концу подсосного периода многие гельминты не успевают достигнуть половой зрелости.

У поросят-отъемышей наиболее распространены стронгилоиды (44,56 %), эймерии (34,17 %), трихоцефалы (21,25 %), а также аскарисы (23,99 %). Балантидии регистрировались в пределах 12,15 %, и эзофагостомы – 14,38 %.

Сходная паразитологическая ситуация отмечена среди поросят старше 4 месяцев: стронгилоиды (41,5 %) и эймерии (38,7 %) преобладают. На высоком уровне находится зараженность аскаридами (25,58 %), трихоцефалами (23,29%), эзофагостомами (24,06 %). Наиболее низкий показатель по заражению балантидиями – 12,85 %.

Такую же тенденцию можно отметить у свиноматок, и хряков. У них также больше всего стронгилоидозной инвазии (31,23 % – 10,44 %) и эймериозной (31,2 % – 15,08 %), а самый низкий показатель по балантидиозу (12 % – 4,06 %). Инвазированность другими гельминтами колеблется в пределах 22,05 % – 12,35 % у свиноматок, 4,83 % – 12,37 % у хряков.

Немного отличается ситуация в откормочном поголовье, чаще всего у них регистрируется аскариоз (28,13 %), но уровень инвазированности стронгилоидами тоже очень высокий (27,24 %), как и трихоцефалами (23,18 %), эзофагостомами (22,71 %), эймериями (22,64 %). Меньше всего встречаются балантидии (9,73 %).

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что в свиноводческих комплексах наиболее часто встречается смешанная инвазия двумя видами паразитами, иногда тремя и более. На распространение смешанной инвазии также влияет принятая технология выращивания свиней. В целом по Республике Беларусь, стронгилоидоз среди домашних свиней является самым распространенным (35,67 %), он доминирует почти во всех возрастных группах, нанося колоссальный экономический ущерб. Широко распространенными являются и остальные компоненты протогельминтозов свиней, способствуя массовым экономическим потерям и недополучению прибыли от свиноводства.

В результате изучения паразитарной системы кабана установлено, что на территории Беларуси она включает 16 видов гельминтов, относящихся к 3 типам, 4 классам, 12 семействам и 14 родам. Класс трематод представлен 2 видами, цестод – 3 видами, нематод – 10 видами и 1 вид принадлежит классу акантоцефал. По всем таксонам без исключения доминируют нематоды, исходя из чего паразитарную систему кабана можно охарактеризовать как нематодозную. Такой высокий процент поражения кабана гельминтами легко объясняется его экологией: широким спектром рациона (от растений до насекомых и падали), высокой плотностью популяции и обитанием в стадах (до 10 особей в обычный период и до 15 – 18 голов во время гона). В среднем на одну зараженную особь приходилось $3,5 \pm 0,7$ видов гельминтов.

Общая инвазированность кабана на территории Беларуси составила 89,52%.

Структура паразитарной системы кабана представлена в таблице 4. Из нее видно, что паразитарная система кабана характеризуется высоким разнообразием гельминтов, низкой выравненностью видов гельминтов. По встречаемости у данного животного доминировали представители рода *Metastrongylus* – они регистрировались практически у каждого инвазированного животного. Такую особенность паразитарной системы кабана в Беларуси отметили Н. С. Назарова в 60-х годах и В.А Пенькевич в 90-х годах прошлого века. Высокая встречаемость этих видов гельминтов объясняется тесными биотическими отношениями между кабаном и дождевым червем (промежуточным хозяином метастронгилюсов), в частности личинки метастронгилюсов длительно сохраняются в теле дождевого червя и легко переживают там неблагоприятные климатические условия, а кабан, роя почву, находит и поедает этих олигохет, тем самым заражаясь.

Помимо этих паразитов в классе нематод доминирующих видов отмечено не было, хотя наиболее часто встречались *G. urosulatus* (27,62%) и *T. suis* (33,6%). Остальные виды регистрировались намного реже. Среди класса цестод доминирующих видов также отмечено не было, а наиболее часто встречался *Sparganum erinacei-europaei* (*S. erinacei-europaei*, larvae) (25,71%). Такой высокий процент этой цестоды обеспечивает южная зона Беларуси (в национальном парке «Припятский» зараженность спарганумами кабанов превышает 75%). Такая особенность является следствием оптимальных экологических условий для развития и распространения этого вида паразита и высокой численности промежуточных и дополнительных хозяев в полесском регионе Беларуси.

Из анализа биологической структуры паразитарной системы кабана видно, что в сообществе доминируют биогельминты – 75% по отношению к 25% геогельминтов.

Рассматривая сходство паразитарных систем домашней и дикой свиньи, мы также приводим виды гельминтов, зарегистрированные нами у домашней свиньи на протяжении 10 лет при массовых убоях на мясокомбинатах и частных подворных (таблица 5). Анализируя данные, можно сделать вывод, что все гельминты, выделенные нами у домашней свиньи, регистрируются и у кабана. А нематодозы, зарегистрированные у кабана, регистрируются рядом авторов у домашней свиньи. Показатель фаунистического сходства – коэффициент Сьеренсена-Чикановского (K_s) – также достаточно высок и составляет 73,68%. Все это говорит не только о близком сходстве паразитарных систем, но и филогенетическом родстве домашней и дикой свиньи в отличие от других копытных. Изменение в видовом составе сообщества гельминтов обусловлено сугубо влиянием человека на экологию и рацион кормления животных. Данный факт подтверждает и то, что трематоды, заражение которыми возможно только при свободном выпасе на

неокультуренных пастбищах или в дикой природе, встречаются только у кабана.

Таблица 4 – Встречаемость и интенсивность гельминтозной инвазии у кабана (N = 105)

Вид паразита	N ₁	В (%)	ИИ min-max (X)	ИО	ИД (%)
Класс Trematoda Rudolphi, 1808					
<i>Dicrocoelium lanceatum</i>	8	7,62	2-8 (4)	0,30	0,3
<i>Alaria alata</i> , larvae	2	1,90	3-17 (10)	0,19	0,19
ИТОГО ПО ТРЕМАТОДАМ				0,5	0,49
Класс Cestoda Rudolphi, 1808					
<i>Spirometra erinacei-europaei</i> , larvae	27	25,71	1-50 (4)	1,03	1,02
<i>Taenia hydatigena</i> , larvae	11	10,48	1-4 (2)	0,21	0,21
<i>Echinococcus granulosus</i> , larvae	17	16,49	1-10 (3)	0,49	0,48
ИТОГО ПО ЦЕСТОДАМ				1,72	1,71
Класс Nematoda Rudolphi, 1808					
<i>Oesophagostomum dentatum</i>	11	10,48	1-19 (8)	0,84	0,83
<i>Globocephalus urosubulatus</i>	29	27,62	1-327 (104)	28,72	28,47
<i>Metastrongylus pudendotectus</i>	70	66,67	14-78 (41)	27,33	27,09
<i>Metastrongylus elongatus</i>	65	61,90	2-57 (34)	21,05	20,86
<i>Metastrongylus salmi</i>	45	42,86	3-36 (21)	9	8,92
<i>Ascarops strongylina</i>	9	8,57	2-21 (7)	0,6	0,59
<i>Physocephalus sexalatus</i>	13	12,38	2-125 (34)	4,21	4,17
<i>Trichinella spiralis</i> , larvae*	4	3,81	2-26 (16)	0,61	0,6
<i>Trichocephalus suis</i>	32	33,6	2-32 (4)	5,49	5,44
<i>Ascaris suum</i>	17	16,19	2-7 (4)	0,65	0,64
ИТОГО ПО НЕМАТОДАМ				98,5	97,61
Класс Acanthocephala Rudolphi, 1801					
<i>Macracanthorhynchus hirudinaceus</i>	5	4,76	1-9 (4)	0,19	0,19
ИТОГО				100,9	100

Примечание – * количество личинок в 48 срезах

Таблица 5 – Сравнительные данные о гельминтах, зарегистрированных у кабана, домашней свиньи и других животных

ПАРАЗИТ	Домаш- няя сви- нья	Кабан	Жвач- ные	Хищ- ные
Класс Trematoda Rudolphi, 1808				
<i>Fasciola hepatica</i>		*	+	
<i>Dicrocoelium lanceatum</i>		+	+	+
<i>Alaria alata</i> , larvae		+		+
Класс Cestoda Rudolphi, 1808				
<i>Taenia hydatigena</i> – larvae (= <i>Cysticercus tenuicollis</i>)	+	+	+	+
<i>T. solium</i> , larvae – larvae (= <i>Cysticercus cellulosae</i>)	*			
<i>Echinococcus granulosus</i> – larvae	+	+	+	+
<i>Spirometra erinacei europaei</i> - larvae		+		+
Класс Nematoda Rudolphi, 1808				
<i>Oesophagostomum dentatum</i>	+	+		
<i>O. longicaudum</i>	*	*		
<i>Trichocephalus suis</i>	+	+		
<i>Globocephalus urosubulatus</i>	*	+		
<i>Physocephalus sexalatus</i>	*	+	**	
<i>Ascarops strongylina</i>	*	+	**	
<i>Ascaris suum</i>	+	+		
<i>Trichinella spiralis</i>	*	+		+
<i>Metastrongylus elongatus</i>	+	+	**	**
<i>Metastrongylus pudendotectus</i>	+	+	**	
<i>Metastrongylus salmi</i>	+	+		
<i>Metastrongylus confusus</i>		*		
<i>Strongyloides ransomi</i>	*	**		
<i>Hyoststrongylus rubidus</i>	*		*	
<i>Trichostrongylus columbriformis</i> Л	*		+	
<i>Gongylonema pulchrum</i> Л	*	**	*	**
Класс Acanthocephala Rudolphi, 1801				
<i>Macracanthorhynchus hirudinaceus</i>	+	+	*	

Примечание – + - зарегистрировано нами;

* - зарегистрированы в Республике Беларусь;

** - зарегистрированы на территории СНГ

Л – зарегистрирован у непарнокопытных

Помимо этого, в паразитарных системах этих животных встречаются виды, общие свиньям, жвачным, хищным и даже лошадям. Данную особенность можно объяснить всеядностью этих видов копытных и схожестью экологии как с хищными, так и с другими видами копытных, что и привело к эволюционно сложившейся схеме формирования промежуточного (по видовому составу) гельминтоценоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, все гельминты зарегистрированные нами у домашней свиньи регистрируются и у кабана. А нематодозы, зарегистрированные у кабана регистрируются рядом авторов у домашней свиньи. Высокий показатель фаунистического сходства (коэффициента Сьеренсена-Чикановского) говорит о близком сходстве паразитарных систем домашней и дикой свиньи. Отличия в видовом составе сообщества гельминтов обусловлены изменением экологии и рациона в связи с одомашниванием.

Степанова Е.А., кандидат ветеринарных наук
Якубовский М.В., доктор ветеринарных наук, профессор
Кузьминский И.И., кандидат ветеринарных наук
Степанов С.Н., соискатель

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

ДИАГНОСТИКА ФАСЦИОЛЕЗА НА РАННИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

ФАО, ВОЗ, МЭБ рассматривают фасциолез как часть экологической и продовольственной проблемы. По данным ВОЗ (1995) около 24% населения живут в зонах риска заражения этим гельминтом, а примерное число ежегодно заболевших достигает 20 тыс. человек. В связи с тем, что фасциолез является зоонозом, борьба с ним у животных способна значительно уменьшить число случаев заболевания людей.

Фасциолез является одним из экономически значимых гельминтозов сельскохозяйственных животных и представляет не только экологическую, но и экономическую проблему как для Беларуси, так и для других регионов мира. Широкое распространение инвазии обусловлено повсеместным расселением промежуточного хозяина фасциолы обыкновенной – моллюска малого прудовика.

Экономический ущерб при фасциолезе складывается из гибели животных и потери продуктивности: привесов – 8,17-17,25%, удоев молока – 12,69%, выбраковки печени – 11,68-22,92%. При заболевании выход телят уменьшается на 4,88%, масса новорожденных телят снижается на 8,30%, себестоимость прироста живой массы увеличивается на 11,72% (М.В. Якубовский, 2000).

Сложившаяся эпизоотическая ситуация определяет необходимость проведения комплекса оздоровительных и профилактических мероприятий. В этом комплексе важным звеном является современная и достоверная диагностика. Однако используемые в настоящее время методы диагностики фасциолеза не позволяют объективно оценивать эпизоотическую ситуацию, их эффективность не превышает 50%.

Так, низкая эффективность используемых методов диагностики фасциолеза приводит к необходимости поголовной дегельминтизации животных противотрематодозными препаратами. Совершенствование же способов выявления фасциолезной инвазии делает возможным индивидуальную дегельминтизацию животных, при которой затрачивается меньшее количество антгельминтиков. Все применяющиеся противофасциолезные препара-

ты имеют сроки ожидания для мяса и молока. При ранней диагностике и индивидуальной обработке животных существенно снижается экономический ущерб, наносимый фасциолезом, а также обеспечивается получение экологически чистой продукции.

Целью наших исследований является разработка набора для ранней иммунодиагностики фасциолеза крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа.

На первом этапе провели подбор соматических и экскреторно-секреторных антигенов и их фракций для ранней диагностики фасциолеза крупного рогатого скота с использованием его в ИФА и изучили их основные свойства.

Исходный материал (имаго трематоды *F. hepatica*), извлеченный из образцов печени при убое больных фасциолезом животных, собрали на мясоперерабатывающих предприятиях республики.

Всего было получено по 150 мл цельных экскреторно-секреторного антигена и соматического антигена.

Для разделения цельных антигенов фракционировали их с использованием электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Полученные фракции характеризовали концентрацией растворенных в них белков.

В результате разделения цельных антигенов методом ВЭЖХ было получено 17 фракций: соматический антиген был разделен на 8 фракций с концентрацией белков 60, 150, 50, 30, 70, 40, 30, 110 мкг/мл, а экскреторно-секреторный – на 9 (30, 60, 30, 30, 20, 30, 50, 210, 130 мкг/мл).

Видоспецифические фракции выявляли в иммуноферментном анализе (ИФА) после выравнивания концентраций белков до 20 мкг/мл.

Для постановки ИФА использовали наработанные на свободном от фасциол крупном рогатом скоте гипериммунные (HIBSsa и HIBSesa) и фетальную сыворотку в разведении 1:100. Для гипериммунизации использовали цельные антигены. Реакцию ставили, взяв за основу методику в модификации Э.Х. Даугалиевой и соавт. (1990). Для оценки результатов использовали усредненный показатель превышения оптической плотности (экстинкции) над отрицательным контролем (S/N).

Анализ результатов проведения ИФА показал целесообразность дальнейшей работы с цельными антигенами и их фракциями (СА – № 1, 7, 8; ЭСА – № 1, 2, 7).

Полноценность антигенов и их фракций испытали на сыворотках крови иммунизированных кроликов. Сыворотки крови в различных разведениях проверили в РИД по общепринятой методике. Установлено (при постановке реакции иммунодиффузии (РИД) с гипериммунными кроличьими сыворотками), что полученные антигены являются полноценным.

При проведении исследований по определению сроков годности полученных белковых растворов антигенов *F. hepatica* установлена возмож-

ность хранения антигенов на протяжении 1 года в условиях холодильника при температуре +2 – +4 °С.

Видовую специфичность полученных образцов проверили согласно руководства «Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии» (Минск, 2007) методом анафилаксии на морских свинках, которых вначале сенсибилизировали малыми дозами антигенов (0,25 мл с концентрацией белков 1,25 мг/мл), а спустя 19 дней свинкам вводили внутрисердечно разрешающие дозы (по 2 мл с концентрацией белков 1,25 мг/мл) гомологичных и гетерологичных антигенов (туберкулин, антиген из личинок подкожного овода).

Для проверки каждого антигена использовали группы по 3 морские свинки. У всех животных, которым для сенсибилизации и в качестве разрешающих вводились полученные нами антигены, наблюдали быстрое развитие тяжелой формы анафилактического шока.

Для получения антисыворотки к полученным антигенам *F. hepatica* иммунизировали 4 бычка в возрасте 3 месяцев по схеме Axelsen et al. (1974). Цикл гипериммунизации включал 4 подкожные инъекции (в 2 точки) с интервалом в 12 суток. Полученные антисыворотки испытывали в РИД и ИФА с соответствующим антигеном *F. hepatica* после 2, 3 и 4 инъекции. После 4 инъекции провели отбор крови в количестве 25 мл от каждого животного. Полученную сыворотку центрифугировали в течение 30 минут при 1500 g.

На следующем этапе провели комплектацию образцов набора. Каждый набор укомплектовали 9 компонентами.

Состав набора:

- № 1 Антиген - 1 флакон;
- № 2 Планшет для иммуноферментного анализа – 1 планшет;
- № 3 ФСБ-Т - концентрат фосфатно-солевого твинсодержащего буферного раствора - 1 флакон;
- № 4 ПК - положительный контроль - 1 флакон;
- № 5 ОК - отрицательный контроль - 1 флакон;
- № 6 Конъюгат - 1 флакон;
- № 7 СБР - субстратный буферный раствор - 1 флакон;
- № 8 ОФД - ортофенилендиамин - 1 флакон;
- № 9 КББ - карбонат-бикарбонатный буферный раствор - 1 флакон.

Для испытания диагностической эффективности полученных наборов с сыворотками крови гипериммунных, спонтанно инвазированного и свободного от фасциол крупного рогатого скота был поставлен ряд опытов. Реакцию ставили, взяв за основу методику в модификации Э.Х. Даугалиевой и соавт. (1990). Для оценки результатов использовали усредненный показатель превышения S/N.

На первом этапе провели отбор проб сыворотки от спонтанно инвази-

рованного и свободного от фасциол крупного рогатого скота. Формирование животных в группы проводили на основании результатов аллергической диагностики фасциоза с использованием аллергена из *F. hepatica* (ТУ 600049853.134 – 2009) и копрологического исследования (метод последовательных промываний). Для этого обследовали 200 животных МТФ «Едки» СПК «Едковский» Лидского района и 20 животных МТФ «Дуличи» КСУП ППР «Правда» Минского района. Копрологически было выявлено 17 животных с МТФ «Едки». Диагноз был подтвержден с использованием внутрикожной аллергической пробы (ВАП).

От этих животных провели отбор проб крови. Всего было получено 17 образцов сыворотки от спонтанно инвазированного и 20 от свободного от фасциол крупного рогатого скота. В качестве отрицательного контроля (N) использовали фетальную сыворотку, полученную на УП «Минский мясокомбинат».

Установлено, что при исследовании образцов сывороток крови животных, спонтанно инвазированных фасциолами, в ИФА во всех образцах превышение оптической плотности составило 2,14–2,64 раза по сравнению с нормальной сывороткой.

Таким образом, уровень специфичности и чувствительности ИФА тест-системы при использовании сывороток крови составил 100%.

На следующем этапе для определения эффективности ИФА для ранней иммунодиагностики фасциоза крупного рогатого скота с использованием набора нового поколения для ранней иммунодиагностики фасциоза крупного рогатого скота отобрали образцы крови от животных спонтанно инвазированных фасциолами и от не инвазированных животных на МТФ «М.Обрино» СПК «им. Царюка» Кореличского района и на МТФ «Дуличи» КСУП «ППЗ Белорусский отделение Чачково» Минского района. Формирование животных в группы проводили на основании результатов аллергической диагностики фасциоза с использованием аллергена из *F. hepatica* и копрологического исследования (метод последовательных промываний). Всего было получено 13 образцов крови от спонтанно инвазированного и 6 от свободного от фасциол крупного рогатого скота.

Для постановки ИФА использовали наработанные на свободном от фасциол крупном рогатом скоте гипериммунную (в качестве положительно-го контроля), фетальную сыворотку (в качестве отрицательного контроля) и исследуемые пробы в разведении 1:100.

Установлено, что при исследовании образцов сывороток крови животных, спонтанно инвазированных фасциолами, в ИФА во всех образцах превышение оптической плотности составило 2,02–2,74 ($2,30 \pm 0,13$) раза по сравнению с нормальной сывороткой. У животных, свободных от фасциол, превышение оптической плотности образцов по сравнению с нормальной сывороткой составило в 1,45–1,49 ($1,47 \pm 0,01$) раза.

Таким образом, уровень специфичности и чувствительности ИФА

тест-системы в данной серии опыта при использовании сывороток крови составил 100%.

Заключительный этап испытаний определения диагностической эффективности ИФА для ранней диагностики фасциолеза провели на МТФ «Соломоречье» СПК «Вишневка 2010» Минского района. При обследовании 40 голов крупного рогатого скота (методом последовательных промываний) был выявлен фасциолез с ЭИ 37,5%. У инвазированных фасциолами коров (15 голов) провели отбор проб крови, проверили на наличие антител с помощью «Набора для раннего выявления антител к антигенам фасциол (*Fasciola hepatica*) у крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа «ИФА-фасциола». В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки крови отобранные от 12 не инвазированных фасциолами голов крупного рогатого скота МТФ «Дуличи» КСУП «ППЗ «Белорусский» отделение Чачково» Минского района.

Установлено, что из 27 проб сывороток крови, исследованных в ИФА, было выявлено 15 проб с превышением оптической плотности в $2,49 \pm 0,12$ раза по сравнению с нормальной сывороткой (больные животные). В 11 пробах от животных, не инвазированных фасциолами, превышение оптической плотности по сравнению с нормальной сывороткой составило в $1,28 \pm 0,04$ раза (здоровые животные), тогда как у одного животного превышение оптической составило 1,6 раза по сравнению с нормальной сывороткой.

Таким образом, специфичность сконструированного «Набора для раннего выявления антител к антигенам фасциол (*Fasciola hepatica*) у крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа «ИФА-фасциола» в данном опыте составила 91,66%, чувствительность 100%.

Обобщение данных постановки ИФА с помощью разработанного набора показало перспективность использования набора нового поколения для ранней иммунодиагностики фасциолеза крупного рогатого скота. При постановке ИФА нами были получены параметры, применение которых позволило продемонстрировать высокие уровни специфичности 91,66-100% ($97,22 \pm 2,78\%$) и чувствительности 100% разработанной тест-системы.

На основании полученных результатов исследования подготовлены и зарегистрированы ТНПА (ТУ ВУ 600049853.222-2013) на «Набор для раннего выявления антител к антигенам фасциол (*Fasciola hepatica*) у крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа «ИФА-фасциола», включающие технические требования, требования безопасности, правила приемки, методы контроля, требования к транспортировке и хранению, указания по применению, гарантии изготовителя, инструкция по его применению.

Получен патент № 13934 «Способ получения антигена для диагностики фасциолеза и способ диагностики фасциолеза крупного рогатого скота».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сконструирован «Набор для раннего выявления антител к антигенам фасциол (*Fasciola hepatica*) у крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа «ИФА- фасциола».

Специфичность сконструированного «Набора для раннего выявления антител к антигенам фасциол (*Fasciola hepatica*) у крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа «ИФА-фасциола» составляет 91,66–100% ($97,22 \pm 2,78\%$), чувствительность 100%.

ЛИТЕРАТУРА

1 Бабянскас, М.А. Иммунологическая диагностика фасциоза и разработка методов оздоровления сельскохозяйственных животных от этой инвазии в условиях Литовской ССР: дис. док. вет. наук. / М.А. Бабянскас. – Кайшядорис, 1965. – 619 с.

2 Бекиш, О.-Я.Л. Основы медицинской паразитологии/ О. -Я.Л. Бекиш, В.Я. Бекиш. – Минск.: Университетское, 2001. – 224 с.

3 Бережко, В.К. Иммунологические методы диагностики гельминтозов животных (краткий обзор) / В.К. Бережко // Труды Всесоюзного института гельминтологии им. академика К.И. Скрябина. – М., 2000. – Том 36. – С. 10–26.

4 Ветеринарно-санитарные правила по выполнению паразитологических методов лабораторной диагностики гельминтозов, протозоозов и арахноэнтомозов: утв. ГУВ МСХиП РБ 21.07.2007 г. / И.Н. Дубина [и др.]. – Витебск: УО ВГАВМ, 2007. – 52 с.

5 Демидов, Н.В. Иммунобиологическая диагностика фасциоза (общие замечания) / Н.В. Демидов // Труды Всесоюзного института гельминтологии им. академика К.И. Скрябина. – М., 1968. – Том 13. – С. 278–294.

6 Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля, пер. с нем. А.П. Тарасова. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.

7 Клименко, В.В. Иммунохимический анализ антигенов гельминтов, способы их получения и перспективы практического использования / В.В. Клименко // Труды Всесоюзного института гельминтологии им. академика К.И. Скрябина. – М., 2002. – Том 38. – С. 78–130.

8 Онуфриенко, М.Э. Фасциоз крупного рогатого скота в северо-западном регионе России: дис. ... док. вет. наук: 03.00.19, 16.00.04 / М.Э. Онуфриенко. – СПб, 2004. – 339 с.

9 Трус, И.А. Иммунологическая диагностика фасциоз крупного рогатого скота (разработка иммунореагентов, иммунологических тестов, сравнительная эффективность и показания к применению): дис. ... канд. вет. наук: 03.00.19 / И.А. Трус. – Минск, 2008. – 131 с.

10 Якубовский, М.В. Диагностика, терапия и профилактика паразитарных болезней животных / М.В. Якубовский, Н.Ф. Карасев. – Минск: Хата, 2001. – 384 с.

11 Fascioliasis / J. Richter [et al.] // Current Treatment Options in Inf. Dis. – 2002. – Vol. 4. – P.313–317.

12 Fasciolosis / ed. J. P. Dalton– Wallingford: CABI Publishing. – 1999. – 544 p.

13 Muller, R. Worms and human disease / R. Muller, D. Wakelin. – 2 ed. – CABI Publishing, 2002. – 300 p.

14 Noemi, S. Antibody profiles of EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica* / S. Noemi, G.V. Hillyer // J. Parasitol. – 1988. – Vol. 74, № 5. – P. 810–818.

15 Tiggele, L. J. van. Serological diagnosis of fascioliasis / L. J. van Tiggele, H. J. Over // J. Vet. Parasitol. – 1976. – Vol. 3, № 1. – P. 239–248.

Якубовский М.В., доктор ветеринарных наук, профессор
Щемелева Н.Ю., кандидат ветеринарных наук
Кузьминский И.И., кандидат ветеринарных наук
Пепеляева О.П., аспирантка

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

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОСТИМУЛЯТОРА «ЯНСЕВИТ» ПРИ ПАЗАРИТАРНЫХ БОЛЕЗНЯХ

ВВЕДЕНИЕ

Изучение эпизоотической ситуации по паразитозам крупного рогатого скота в последние годы показало, что наблюдается значительное инвазирование животных нематодами желудочно-кишечного тракта, фасциолами, телязиями, эймериями, криптоспоридиями, чаще стал регистрироваться диктиокаулез, балантидиоз, протостронгилидозы и другие паразитозы. В отдельных хозяйствах инвазированность желудочно-кишечными стронгилиями крупного рогатого скота, по данным наших исследований за 2011–2012 гг достигает 72,2–90,0%, что приводит к значительным потерям продуктивности, ухудшению качества животноводческой продукции. Зараженность телят стронгилиями желудочно-кишечного тракта составляет 25,13%, в результате чего молодняк отстаёт в росте и развитии, чаще регистрируются расстройства со стороны работы желудочно-кишечного тракта, такие животные более восприимчивы к бактериальным и вирусным инфекциям. У молодняка крупного рогатого скота регистрируются стронгилоиды в 46,72% случаев, трихоцефалы – в 22,27%, эймерии – в 46,72% и криптоспоридии – в 9,57%.

За миллионы лет эволюции гельминты хорошо адаптировались к своим хозяевам, при этом паразиты различными путями избегают воздействия иммунной системы хозяина и для своего развития в большинстве случаев, противодействуют ей. Для всех паразитарных инвазий характерна иммуносупрессия, и она касается как гуморального, так и клеточного ответа. Некоторые паразиты непосредственно вызывают разрушение лимфоидных клеток, однако в большинстве случаев подавление иммунного ответа происходит путем инактивации макрофагов и Т-клеток [1, 2, 3, 5].

Тип защитной реакции организма-хозяина в свою очередь зависит от локализации гельминтов. Экспериментально установлено, что при паразитировании гельминтов в кишечнике слизистые покровы последнего формируют особый тип иммунного ответа, который обеспечивается секреторным IgA, сенсibilизированными лимфоцитами (Т₂-клетки), секретирующие комплекс цитокинов. Механизм изгнания гельминтов также включает де-

грануляцию тучных клеток слизистой кишечника, вызванную продуктами активированных T_2 -клеток. Изменяя проницаемость слизистой оболочки, медиаторы тучных клеток обеспечивают проникновение эозинофилов и сывороточных антител в просвет кишечника, тем самым ускоряя изгнание гельминтов.

Механизм действия гуморальной защиты – специфических антител при гельминтозах определяется видом инвазии и представлен реакцией антителозависимой клеточной цитотоксичности. Цитотоксические клетки, такие как макрофаги, нейтрофилы и эозинофилы, прикрепляются к покрытым антителами гельминтам посредством Fc - и C_3 -рецепторов и осуществляют экзоцитоз паразитов. Таким образом, важно определить, как изменяются иммунные реакции при внедрении паразитов, непосредственно приводящие к их выживанию в организме хозяина. Изучение иммунитета при паразитарных болезнях имеет практическое значение для научно-обоснованного подхода к устранению патологических изменений в организме больного животного при помощи иммунокорректоров.

Химиопрофилактика данных паразитозов на фоне снижения иммунной защиты не является достаточно эффективной. Требуется коррекция состояния иммунного статуса животного.

Особенностью иммуностимулирующих препаратов является их высокая биологическая активность, направленная на повышение иммунитета и обменных процессов у животных, в результате чего организм животного самостоятельно избавляется от паразитов и инфекционных агентов. Кроме этого иммуностимуляторы не оказывают побочного действия, не накапливаются в органах и тканях животного, не вызывают привыкания со стороны паразитов и не загрязняют окружающую среду. Применять иммуностимуляторы можно как монопрепараты, так и в комплексе с биопрепаратами (вакцинами) и химиотерапевтическими средствами, тем самым повышая их терапевтическую эффективность. Нередко при этом дозировка самого лекарственного препарата снижается, что способствует экономии значительных денежных средств [4,8].

Для профилактики паразитарных болезней применяют такие иммуностимулирующие препараты, как иммунопаразитан, левамизол, ронколейкин, тималин и многие другие. Не влияя непосредственно на гельминтов, эти препараты стимулируют в организме животных различные звенья иммунитета, что позволяет бороться с паразитами за счет собственных сил организма и длительно поддерживать невосприимчивость к инвазионным заболеваниям. Для иммуностимуляторов характерна избирательность их влияния на различные субпопуляции T - и B -клеток и макрофаги, поэтому вполне обосновано изучение дифференцированного применения их в терапии и профилактике гельминтозов.

Таким образом, **целью нашей работы** явилось исследование изменений иммунобиохимических показателей, характеризующих

состояние иммунной системы телят при инвазировании желудочно-кишечными гельминтами и криптоспоридиями, и по результатам данных исследований предложить схему применения иммуностимулятора «Янсеvit».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в отделе паразитологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и животноводческих хозяйствах Республики Беларусь.

Для оценки иммунологического статуса были подобраны телята в возрасте 1,5-3 месяцев, спонтанно инвазированные ассоциативными кишечными гельминтами (стронгилятами, стронгилоидами, трихоцефалами) и криптоспоридиями в крови которых определяли количество лейкоцитов по общепринятой в гематологии методике, количество розеткообразующих Т- и В-лимфоцитов по методике Д.К. Новикова, В.И. Новиковой (1996), количество циркулирующих иммунных комплексов – по методу Ю.А. Гриневич и И.И. Алферова (1981), общий белок и белковые фракции – с помощью электрофоретической системы SEBIA. Лейкоцитарную формулу выводили на основании подсчета 200 клеток в мазках, окрашенных по Романовскому-Гимза согласно рекомендациям А.А. Кудрявцева, Л.А. Кудрявцевой (1974). Исследовали активность аспартаминотрансферазы (АсАт), аланинаминотрансферазы (АлАт), щелочной фосфатазы (ЩФ) и уровень макроэлементов (Са, Р) на биохимическом анализаторе «CORMAY LUMEN».

В качестве иммунокоректора телятам применяли новый комплексный препарат «Янсеvit», обладающий иммуностимулирующими, пребиотическими, антиоксидантными и противопаразитарными свойствами, оказывающий стимулирующее влияние даже в малых дозах, имеющий длительное физиологическое последствие, безвредный при превышении дозировки в 10 и более раз.

После обследования телят на наличие ассоциаций нематод желудочно-кишечного тракта – методом Г.А. Котельникова – В.М. Хренова (1974 г.) и на криптоспоридиоз методом нативного мазка фекалий с окраской по Циль-Нильсену с последующей микроскопией формировали опытные и контрольные группы.

Опытной группе телят, которые были спонтанно инвазированы ассоциативными нематодозами желудочно-кишечного тракта и криптоспоридиями, применили янсеvit в дозе 0,1 г/кг живой массы один раз в сутки пять дней подряд. Контрольной группе телят, спонтанно инвазированным данными паразитами препарат не применяли, также была сформирована контрольная группа интактных телят.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При ассоциативных паразитозах телят установлены изменения во

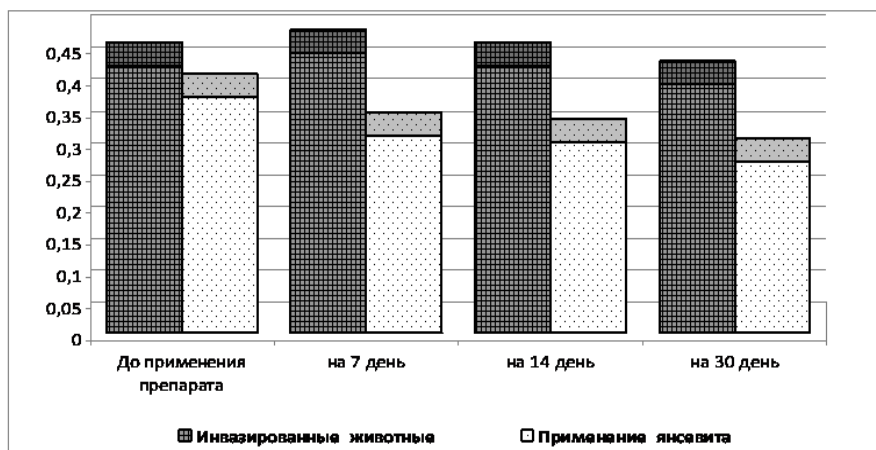
всех звеньях клеточного и гуморального иммунитета: снижение уровня розеткообразующих Т- и В- лимфоцитов, лейкоцитоз с увеличением количества эозинофилов на 31,50% ($P<0,001$) и нейтрофилия за счет увеличения палочкоядерных нейтрофилов на 84,4 % ($P<0,01$). В течение всего периода наблюдений у таких телят количество розеткообразующих Т-лимфоцитов находилось на достоверно более низком уровне чем у интактных животных. В начале опыта эти показатели составляли $30,2 \pm 2,03$ % и $41,6 \pm 3,83$ ($P<0,05$) соответственно, а к концу опыта уровень Т-лимфоцитов у инвазированных животных составил $21,4 \pm 2,89$ %, что было в 1,85 раза ниже, чем в крови интактных телят ($P<0,001$). Уровень В-(ЭМ)-лимфоцитов в крови инвазированных телят на протяжении всего периода наблюдений был ниже контроля в 1,64–1,84 раза ($P<0,01$). Также было отмечено значительное снижение уровня альбуминов и белков системы комплимента, макроэлементов.

В наших экспериментах по применению иммуностимулятора “Янсевита”, проведенных на телятах в возрасте 1,5-3 месяца, спонтанно инвазированных ассоциативными паразитами (стронгилятами, стронгилоидами, трихоцефалами, криптоспоридиями), выявлены существенные положительные сдвиги в Т- и В-системах иммунитета, иммунных комплексах, белковых фракциях обусловленные действием янсевита. Установлено иммуногенное действие янсевита на гуморальное и клеточное звено иммунитета, которое сопровождается повышением количества розеткообразующих Т-лимфоцитов на 18,73% ($P<0,05$) и В-лимфоцитов – на 44,71% ($P<0,001$), снижением аллергизации организма животного – уменьшение количества эозинофилов в 3,31 раза ($P<0,001$) и иммунных комплексов в 1,4 раза ($P<0,01$) по сравнению с инвазированными животными контрольной группы (таблица 1, рисунок 1).

Таблица 1 – Динамика розеткообразующих Т- и В-лимфоцитов при ассоциативных паразитах крупного рогатого скота (телят) после применения янсевита, %

Дни исследования	Инвазированные ассоциативными паразитами животные	Применение янсевита инвазированным ассоциативными паразитами животным
Розеткообразующие Т-лимфоциты		
до применения препарата	$36,0 \pm 3,53$	$41,6 \pm 2,80$
на 7-й день	$38,75 \pm 2,56$	$50,0 \pm 1,82^{**}$
на 14-й день	$38,89 \pm 1,44$	$47,20 \pm 3,12^{*}$
на 30-й день	$37,65 \pm 3,12$	$46,33 \pm 2,81^{*}$
Розеткообразующие В-лимфоциты		
до применения препарата	$24,0 \pm 1,05$	$20,0 \pm 0,71$
на 7-й день	$22,0 \pm 1,22$	$32,25 \pm 0,85^{***}$
на 14-й день	$18,45 \pm 1,35$	$33,02 \pm 1,17^{***}$
на 30-й день	$20,15 \pm 2,07$	$36,45 \pm 2,55^{***}$

Примечание – * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$



При изучении динамики белка и белковых фракций на фоне применения данного препарата было выявлено достоверное, по сравнению с инвазированным контролем, увеличение уровня общего белка в течение 14 дней после применения янсевета на 20,87% ($P<0,01$), повышение содержания β -глобулинов (комплемент C_3) на 43,11% ($P<0,001$) и g -глобулинов (иммуноглобулины) на 27,86% ($P<0,01$), что является важным показателем стимулирования гуморального звена иммунитета, так как продукция антител обеспечивается кооперативным взаимодействием В-лимфоцитов при непосредственном участии C_3 комплемента (рисунки 2, 3).

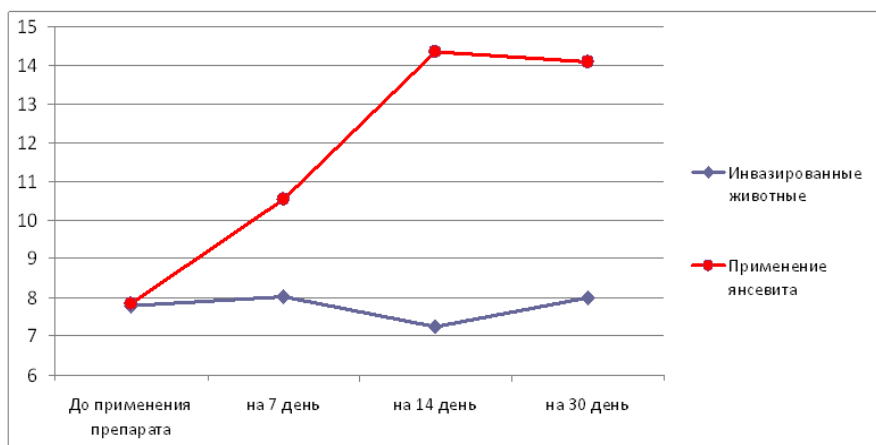


Рисунок 2 – Динамика β -глобулинов (комплемент C_3) при ассоциативных паразитозах крупного рогатого скота после применения янсевета, %

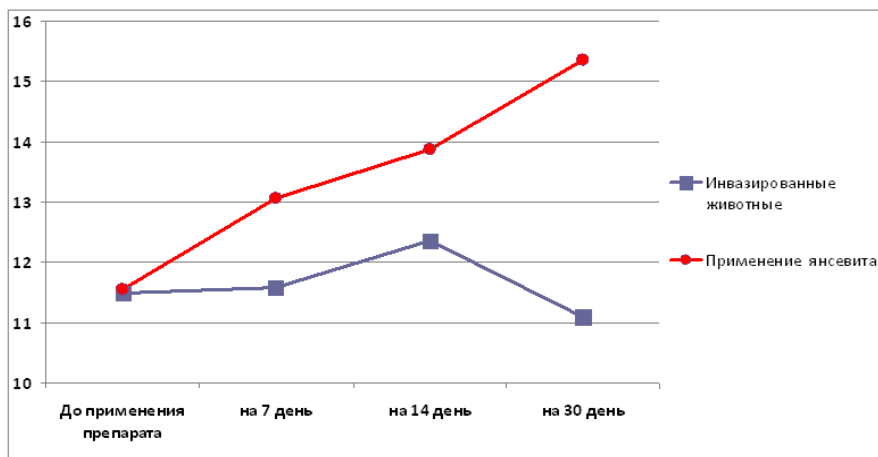


Рисунок 3 – Динамика g - глобулинов (иммуноглобулины) при ассоциативных паразитозах крупного рогатого скота после применения янсевета, %

Применение янсевета способствовало снижению количества α_2 -глобулинов (церулоплазмин) на 37,66% ($P < 0,01$) по сравнению с контролем. Церулоплазмин называют «реактантом острой фазы». Содержание его в крови повышается при заболеваниях, протекающих с повреждением тканей. Снижение его уровня после применения янсевета указывает на восстановительные процессы и улучшение состояния животных.

Янсевит, содержащий в своем составе фумаровую кислоту и витамин Е в комплексе действует как пребиотик и гепатопротектор, нормализуя работу желудочно-кишечного тракта после воздействия на него паразитов, при этом активность АсАт, АлАт, ЩФ в опытной группе снижалась до физиологических показателей.

Установлено, что применение янсевета способствовало более быстрой нормализации содержания основных макроэлементов в сыворотке крови телят. Так, на 14-й день исследования соотношение кальций/фосфор в контрольной группе животных составляло 1,31, что свидетельствует о нарушении минерального обмена, а в опытной данный показатель составил 1,58. Содержание кальция и фосфора на 30-й день исследования в опытной группе находилось в пределах физиологической нормы, что оказывает положительное влияние на иммуногенез и на защитные силы организма, так как обладая большой биологической активностью, кальций и фосфор играют роль в процессах биосинтеза, роста и развития организма животного.

При исследовании влияния янсевета на уровень инвазированности телят кишечными гельминтами (стронгилятами, стронгилоидами, трихоце-

фалами) и криптоспоридиями, установлено, что через 7 дней после применения препарата эффективность при стронгилятозах желудочно-кишечного тракта (гемонхи и кооперии) составила – 81,48%, при стронгилоидозе – 75,98 %, при трихоцефалезе – 67,42%, при криптоспориidioзе – 66,70%.

В контрольной группе уровень заражения данными паразитами составлял: стронгилятами (гемонхи и кооперии) – 90,0%, стронгилоидами – 50,0%, трихоцефалами – 65,0% и криптоспоридиями – 35,0%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, применение янсевида крупному рогатому скоту в дозе 0,1г/кг живой массы с кормом один раз в сутки в течение пяти дней подряд способствует повышению количественных и функциональных показателей иммунитета, в особенности его гуморального звена, нормализует функцию желудочно-кишечного тракта, при этом его эффективность составляет при стронгилятозах (гемонхи и кооперии) – 81,48%, при стронгилоидозе – 75,98 %, при трихоцефалезе – 67,42% и при криптоспориidioзе – 66,70%, что дает основание рекомендовать его для широкого применения в хозяйствах республики при паразитарных болезнях молодняка на фоне снижения 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 Якубовский, М.В. Современные проблемы иммунологии гельминтов / М.В. Якубовский, Г.Н. Чистенко, В.Н. Горталев и др. // Мед. обзор. – 1991. – С.121–127.
- 3 Озерецковская, Н.Н. Современные проблемы терапии гельминтозов / Н.Н. Озерецковская // Мед. паразит. и паразитар. болезни. – 1975. – №. 3. – С. 271–276.
- 4 Оробец, В.А. Отрицательные последствия дегельминтизации сельскохозяйственных животных / В.А. Оробец // Вести ветеринарии. – 2000. – № 15. – С. 88 – 90.
- 5 Современные лекарственные средства фармакокоррекции и химиопрофилактики животных. Научно-практическое издание научно-производственной фирмы “Бровафарма”. – Киев, 2007. – С. 113-121.
- 6 Якубовский, М.В. Диагностика, терапия и профилактика паразитарных болезней животных / М.В. Якубовский, Н.Ф. Карасев. – Минск: БИТ «Хата», 2001. – 384 с.
- 7 Якубовский, М.В. Стронгилятозы желудочно-кишечного тракта домашних жвачных животных в Беларуси / М.В. Якубовский, Т.Я. Мяцова, Е.А. Кирпанева // Ветеринарная наука – производству: науч. тр. / Белорусский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского. – Минск, 2005. – Вып. 37. – С. 196 – 203.
- 8 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. – С. 172 – 175.

Степанова Н.А., младший научный сотрудник

Одесская опытная станция Национального научного центра «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины, г. Одесса

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОБИОТИКА «МУЛЬТИБАКТЕРИН ВЕТЕРИНАРНЫЙ *Bs+La*» ПРИ ДЕГЕЛЬМИНТИЗАЦИИ ЦЫПЛЯТ

ВВЕДЕНИЕ

Райетиноз – наиболее распространенный «южный» ленточный гельминтоз птиц в странах с теплым и тропическим климатом. Цестоды паразитируют в тонком отделе кишечника птицы отряда куриные [5, 2, 4, 3]. Райетины, внедряясь в слизистую оболочку стенки кишечника, преимущественно в двенадцатиперстной кишке, своими мощными крючками вызывают механические повреждения, которые являются воротами инфекций, при этом значительно снижаются защитные функции индигенной микрофлоры: лактобацилл, бифидобактерий, бактероидов, непатогенных кишечных палочек и кокковых форм. Это приводит к развитию дисбактериоза и снижению общего иммунитета [13, 15, 6, 7, 11]. Токсины, выделяемые райетиниями, вызывают аллергические изменения и интоксикацию организма птицы с появлением вторичных полигиповитаминозов. Все это приводит к нервным явлениям, истощению и гибели птицы [5, 8, 10, 9].

Столь значительные нарушения жизнедеятельности организма птицы и экономические потери обуславливают необходимость разработки адекватных мер профилактики и борьбы с райетинозами кур [5].

Сегодня важным аспектом в применении средств лечения и профилактики гельминтозов является комбинированное сочетание препаратов, действие которых направлено на снижение отрицательного влияния гельминтов и антгельминтиков на гомеостаз организма животных и птиц, а также профилактику иммунодефицитного состояния [12, 14, 18, 1, 16, 17].

Цель нашей работы заключалась в изучении действия пробиотического препарата «Мультибактерин ветеринарный *Bs+La*» на организм цыплят при проведении и после дегельминтизации альбендазолом 10 % при райетинозой инвазии.

Об эффективности действия пробиотического препарата «Мультибактерин ветеринарный *Bs+La*» судили по сохранности птицы, физиологическому состоянию и привесам в разных группах, по изменению биохимических показателей крови цыплят.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу выполняли на базе вивария Одесской опытной станции ННЦ «ИЭКВМ». Исследования проводили на цыплятах, поступавших в

лабораторию из различных фермерских и индивидуальных птицевладельцев из Тарутинского, Татарбунарского, Саратовского, Арцизского, Килийского, Реннийского районов Одесской области.

Для выявления яиц возбудителя райетиноза использовали копроскопический метод исследования помета птицы путем последовательных промываний и метод флотации. Для сбора цестод проводили неполное гельминтологическое вскрытие павшей и вынужденно убитой птицы. Видовую принадлежность цестод определяли по общепринятым методикам.

Для опыта отобрали спонтанно зараженных райетинозом цыплят по принципу аналогов: с одинаковой живой массой, в возрасте 4 месяцев по 5 особей в группе. Сформировали три группы птиц: две опытных и одну контрольную. У цыплят всех групп отбирали пробы крови до обработки препаратами. Препараты задавали опытным группам индивидуально с помощью шприца в 0,5 %-ной водной суспензии крахмала *per os*, контрольная группа получала только крахмальный раствор. После введения препаратов индивидуально исследовали помет от птиц через 24, 48 и 72 часа на наличие изгнанных цестод.

Отбор проб крови у цыплят контрольной и опытных групп проводили до обработки, на 5 и 21 сутки после дегельминтизации. Определяли биохимические показатели сыворотки крови цыплят: общий белок, альбумины, глобулины, циркулирующие иммунные комплексы, серомукоиды по общепринятым методикам. Эвтаназию птицы проводили в конце эксперимента на 30 сутки согласно правилам биоэтики.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С лечебной целью первой опытной группе задавали антгельминтик (альбендазол 10 % в дозе 10 мг/кг по ДВ, двукратно, два дня подряд). У цыплят второй опытной группы использовали альбендазол 10 % в сочетании с пробиотиком «Мультибактерин ветеринарный *Bs+La*» два дня подряд и далее на протяжении 10 суток.

Яйца возбудителя райетиноза в контрольной группе выявляли на протяжении всего опыта. У двух павших цыплят при неполном гельминтологическом вскрытии были выявлены половозрелые цестоды. Остальные цыплята были угнетены и плохо набирали живую массу. Обобщенные результаты исследований приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Интенсивность роста цыплят после дегельминтизации при райетинозной инвазии ($M \pm m$, $n=5$, в среднем за 30 дней)

Группы птиц	Среднесуточный прирост, кг	Сохранность, %	Дополнительный прирост, кг
1-опытная альбендазол	0,100	80	2,80
2-опытная альбенд.+проб.	0,120	100	3,60
контрольная	0, 055	60	1,43

Установлено, что сохранность цыплят в группе, где дополнительно применяли пробиотик, составила 100%. Среднесуточный прирост составил 25 г, что на 14 г выше, чем в контрольной группе. Сохранность цыплят в первой опытной группе составила 80%, прирост на 9 г меньше чем во второй группе.

Мы считаем, что на фоне развивающейся инвазии метаболизм антгельминтика создает дополнительную нагрузку на другие органы и системы. Сочетанное влияние токсинов райетиний и активных метаболитов антгельминтика ведёт снижению среднесуточных приростов в группе, где использовали альбендазол 10 % в дозе 10 мг/кг по ДВ, двукратно, два дня подряд без применения пробиотика.

Была изучена динамика содержания общего белка и его фракций в сыворотке крови цыплят контрольной и опытных групп до обработки, а также на 5 и 21 сутки после нее. Результаты биохимических исследований сыворотки крови представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Показатели неспецифической резистентности цыплят ($M \pm m$; $n = 5$) при лечении райетинозной инвазии

Группа	Сут-ки	Общий белок, г/л	Альбумины, г/л	Глобулины, г/л	ЦИК, мг/мл	Серомукоиды, мг/мл
1 – опытная альбендазол 10%	до обработки	40,1 $\pm$ 0,5	15,71 $\pm$ 0,1	32,9 $\pm$ 0,5	0,12 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01
	5	45,0 $\pm$ 0,5	17,4 $\pm$ 0,1	32,0 $\pm$ 0,5	0,08 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01
	21	47,5 $\pm$ 0,5	15,1 $\pm$ 0,1	32,5 $\pm$ 0,5	0,09 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01
2 – опытная альбендазол 10% + пробиотик	до обработки	42,0 $\pm$ 0,5	16,0 $\pm$ 0,1	30,3 $\pm$ 0,5	0,09 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01
	5	47,6 $\pm$ 0,5	16,6 $\pm$ 0,1	31,1 $\pm$ 0,5	0,09 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01
	21	51,7 $\pm$ 0,5	17,0 $\pm$ 0,1	34,7 $\pm$ 0,5	0,09 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01
Контрольная цыплята, инвазированные райетиниями	до обработки	40,0 $\pm$ 0,5	16,5 $\pm$ 0,1	30,6 $\pm$ 0,5	0,12 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01
	5	40,0 $\pm$ 0,5	16,8 $\pm$ 0,1	30,9 $\pm$ 0,5	0,11 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01
	21	37,9 $\pm$ 0,5	14,8 $\pm$ 0,1	29,2 $\pm$ 0,5	0,09 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01
Норма		43,0-60,0	13,0-21,0	24,9-40,8		

Наиболее остро реагировали на присутствие гельминтов цыплята контрольной группы, которым выпаивали крахмальную суспензию без каких-либо препаратов. Содержание общего белка, альбуминов и глобулинов заметно снижались от $40,0 \pm 0,5$ до $37,9 \pm 0,5$ г/л, (при норме 43,0-60,0 г/л); $16,5 \pm 0,1$ – $14,8 \pm 0,1$ г/л (в пределах нижней границы нормы 13,0-21,0 г/л) и $30,6 \pm 0,5$ – $29,2 \pm 0,5$ г/л (в пределах нижней границы нормы 24,9-40,8 г/л) соответственно. Такие отклонения от нормы, очевидно, указывали на воспалительные процессы в стенке кишечника, угнетение функции печени, а также острую аллергическую реакцию, что связано с высокой степенью интенсивности инвазии (ИИ) цыплят райетинами к концу опыта на 21 сутки.

У цыплят опытных групп, которым задавали антгельминтик и пробиотик, биохимические показатели сыворотки крови нормализовались быстрее. Содержание общего белка повысилось с $42,0 \pm 0,5$ г/л до обработки до $51,7 \pm 0,5$ г/л на 21 сутки, что приближалось к показателям физиологической нормы. Отмечалась тенденция к нормализации содержания альбуминов и глобулинов их показатели до обработки от $16,0 \pm 0,1$ до $17,0 \pm 0,1$ г/л повысились к 21 дню в 1,8–2 раза (от $30,3 \pm 0,5$ до $34,7 \pm 0,5$ г/л соответственно).

ВЫВОДЫ

1 Использование пробиотика «Мультибактерин ветеринарный *Bs+La*» совместно с альбендазолом во время дегельминтизации и после нее в течение 10 дней позволяет увеличить сохранность цыплят до 100%.

2 При использовании пробиотика в период и после дегельминтизации цыплята интенсивнее набирают живую массу, их среднесуточный прирост составляет 25 г, что на 14 г выше, чем в контрольной группе, и на 5г в группе, где пробиотик не задавали.

3 Биохимические показатели сыворотки крови быстрее нормализуются. Содержание общего белка увеличивается с $42,0 \pm 0,5$ г/л до проведения дегельминтизации до $51,7 \pm 0,5$ г/л к концу опыта, что соответствует физиологической норме.

ЛИТЕРАТУРА

1 Алексеев, И.А. Рост, развитие, сохранность и продуктивность молодняка свиней при применении пробиотической кормовой добавки «Пролам» [Текст] / И.А.Алексеев, Д.Г.Венгренюк // Вет. врач. – 2013 – №2. – С.27–29.

2 Антипин, Д.Н. Паразитология и инвазионные болезни сельскохозяйственных животных [Текст] / Д.Н. Антипин. – М. : Колос, 1964. – С. 94–98.

3 Артеменко, Юрій Гельмінтози. Підступний ворог [Текст] / Юрій Артеменко // Вет. медицина України. – 1996. – №2. – С. 26–27.

4 Демидов Н.В., Потемкина В.А. Справочник по терапии и профилактике гельминтозов животных.- М.: Колос, 1980.–240 с.

5 Кльосов, М.Д. / Інвазійні хвороби сільськогосподарських тварин [Текст] –/ М.Д Кльосов, А.Й. Мермінський, В.С. Шеховцов. – К: Урожай, 1980. – 256 с.

6 Куклина, М.М., Куклин, В.В., Ежов, А.В. Влияние гельминтной инвазии на

пищеварительную активность маевек (*Rissa tridactyla*) из разных возрастных групп [Текст] / М.М. Кукина, В.В. Кукин, А.В. Ежов // ДАН. – 2009. – Т.425. – №3. – С.422-425.

7 Косяев, Н.И. Стронгилятозы желудочно-кишечного тракта жвачных в Чувашской Республике (гельминтофауна, эпизоотология, формирование паразитоценозов, лечение и профилактика) [Текст]: автореф. дисс.... докт. – Иваново, 2004. – 40 с.

8 Курочкина, К. Г. Иммуносупрессия при паразитах птиц [Текст] / К. Г. Курочкина, М. К. Кожиков, Р. Х. Тутуков // Матер. Всерос. науч.-практ. конф. «Проблемы и перспективные направления прикладной биологической науки в начале XXI века». — М. ; Нальчик : Кабард.-Балк. гос. с.-х. акад., 2003. — Ч. 1. — С. 46–52.

9 Лясота, В.П. Корекція мікрофлори шлунково-кишкового тракту при застоюванні пребіотика «Біо-актив» та гістологічні показники структури окремих органів травлення кролів [Текст] / В.П. Лясота, М.В. Утеченко, В.В. Лобко // Вет. медицина України. – 2012. – №9. – С.30–32.

10 Павлова, М.В. Кормовые добавки Бацелл, Ларикарвит и их влияние на белковый обмен и продуктивность ягнят [Текст] / М.В.Павлова, И.А. Алексеев // Вет. врач. – 2013. – №2. – С.34–35.

11 Петров, Ю.Ф. Микрофлора кишечника у кур в норме и при гельминтозах [Текст] / Ю.Ф. Петров, А.П. Вяткин, М.А. Вяткин, О.В. Кузьмичева, М.П. Фисенко // Вет. врач. – 2008. – №3. – С. 38–40.

12 Сафиуллин, Р.Т. Экономический ущерб от нематодозов свиней [Текст] Р.Т. Сафиуллин // Ветеринария. – 1990. – №2. – С. 46–48.

13. Степанов, А.В. Гельминтозы сельскохозяйственных животных в тропических странах. Цестодозы [Текст] : учеб. пособие / А.В. Степанов. – М., 1980. – Ч. 2. – 95 с.

14 Baeder, C., Bahr, H., Christ, O., Duwel, D., Kellner, H.-M., Kirsch, R., Loewe, H., Schutz E., Iesten, H. Fenbendazole: A New highly effective anthelmintic [Text] / C. Baeder [et al.] // Experimentia – 1974. – № 7. – P. 753-754.

15 Contribution to the biology of the fowl cestode *Raillietina echinobothrida* with a note on its pathogenicity [Text] / A. M. Nadakai [et al.] // Trans. Amer. Micros. Soc. — 1973. — Vol. 92, № 2. — P. 273–276.

16 Dose-titration to confirm the level of fenbendazole for control of *Raillietina cesticillus* in broiler chickens [Text] / L. M. Pote [et al.] // Avian Dis. — 1992. — Vol. 36, № 3. — P. 722–724.

17 Feng, J.J., Guo, H.F., Yao, M.Y. Effects of mebendazole, albendazole, and praziquantel on glutathione S-transferase and superoxide dismutase of *Echinococcus granulosus* cyst wall harbored in mice [Text] / J.J. Feng [et al.] // Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao. – 1995. – № 16 (4). – P. 297–300.

18 Willesen, J.L. Kristensen, A.T., Jensen, A.L., Heine, J. & Koch, J. Efficacy and safety of imidacloprid/moxidectin spot on solution and fenbendazole in the treatment of dogs naturally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) [Text] / J.L. Willesen, A.T. Kristensen, A.L. Jensen, J. Heine, J. Koch // Vet. Parasitology. – 2007. – № 147. – P. 258–264.

Кикоть А.В., аспирант

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

ВСПЫШКА ФУРУНКУЛЕЗА РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ НА УКРАИНЕ

ВВЕДЕНИЕ

Аквакультура является одной из самых быстрорастущих, рентабельных и перспективных отраслей сельского хозяйства. Причинами стремительного развития рыбоводства в различных странах мира являются: получение максимума продукции высокого качества с единицы водной площади, обеспечение занятости населения, освоение внутренних водных ресурсов, ограничение океанического и морского рыбоводства, восполнение естественных запасов гидробионтов [1,2].

Важным объектом товарного рыбоводства в Западном регионе Украины и АР Крым является форель. Из-за недостатка качественного рыбопосадочного материала рыбоводческие предприятия вынуждены закупать оплодотворенную икру и молодь за рубежом, в регионах, где регулярно регистрируются вспышки фурункулеза. Например, для таких европейских стран, как Испания, Шотландия, Норвегия, Финляндия, Франция проблема фурункулеза лососевых стоит очень остро [6, 9, 10,11, 13]. Так же это заболевание наносит большой ущерб в странах других континентов, например, в США и Австралии [8, 12].

Одним из основных поставщиков форели в разные страны мира является Италия, где в процессе проведения мониторинга в 2002 году из проб прибрежных вод Сардинии и при отборе клинического материала в форелеводческих хозяйствах было выделено 46 изолятов *Aeromonas spp.*, семь из которых было идентифицировано как *Aeromonas salmonicida* [7]. Во многих других странах, в том числе и граничащих с Украиной, также зарегистрировано наличие возбудителей опасных бактериальных заболеваний лососевых рыб, что представляет угрозу постоянного заноса инфекций на территорию Украины [5]. Наиболее опасным и экономически значимым бактериальным заболеванием лососевых является фурункулез, вызываемый бактериями *Aeromonas salmonicida* [4].

Цель исследования – определить причину заболеваемости и гибели радужной форели.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На лабораторное исследование с целью установления причины массовой гибели рыбы из частного рыбоводческого хозяйства поступила форель радужная в количестве 10 особей, масса 1 особи составляла 300–350 г. Исследования проводились согласно методическим рекомендациям «Лабораторная диагностика заболеваний рыб, вызванных аэромонадами».

Перед началом проведения патологоанатомического и бактериологического анализа проводили внешний осмотр живой рыбы, в ходе которого отмечали геморрагии в виде пурпур на коже в области спинных и хвостовых плавников, абсцессов, ерошения чешуи, некроза кожных покровов. Также учитывали состояние жабер, плавников, глаз, наличие выделений из ануса. После осмотра рыбу подвергали эвтаназии, придерживаясь биоэтических норм. После этого провели вскрытие и описание патологоанатомических изменений внутренних органов рыб.

При бактериологическом исследовании проведен посев из внутренних органов (почки, печень, селезенка) на питательные среды (МПА, МПБ). С целью дифференцирования посевы инкубировали при температуре $24,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, так как максимальная температура роста *Aeromonas salmonicida* $34,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. После получения первичного роста бактерий, был проведен пересев по Голду на МПА (с целью получения отдельных колоний), а также были проведены биохимические тесты, окрашивание мазков по Граму и постановка биологической пробы.

Биохимические свойства выделенных культур определяли по следующим показателям: выделение индола, выделение сероводорода, реакция Фогес-Проскауера, наличие фенилаланиндезаминазы, лизиндекарбоксилазы, аргининдигидролазы, орнитиндекарбоксилазы, тест на подвижность, на ферментацию арабинозы, ферментацию глюкозы, ферментацию лактозы, ферментацию манозы, ферментацию сахарозы, ферментацию манита, ферментацию салицина, гидролиз мочевины, гидролиз желатины и др. [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При внешнем осмотре рыбы отмечали наличие следующих патологических изменений: разлитые геморрагии ярко-красного цвета на коже около спинных плавников размером 1–3 см у 2 особей, единичные язвы диаметром 0,5–1 см у основания хвостовых плавников у 2 особей, потемнение кожи в области брюшных и спинных плавников у 4 особей. Также отмечали бледность и мраморное окрашивание жаберных лепестков у 6 особей. При патологоанатомическом исследовании у 5 рыб наблюдали петехиальные кровоизлияния на брюшной стенке размером 2–3 мм увеличение селезенки, печень глинистого оттенка. Также обнаружены некротические участки размером 5–8 мм в почках. У остальных 5 рыб явных патологических изменений во внутренних органах не зарегистрировано. Были сделаны посевы из селезенки, почек и печени рыб на питательные среды МПА и МПБ. Через

48 часов инкубирования было зафиксировано наличие роста при температуре $24,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. На МПА наблюдали образование круглых, гладких, блестящих колоний светло-коричневого цвета диаметром 1-2 мм. На МПБ наблюдали крошащуюся пленку светло-коричневого цвета на поверхности, осадок, муаровые волны. В посевах, которые инкубировались при температуре $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, рост не наблюдался. Через 96 часов культивирования наблюдали окрашивание питательных сред в коричневый цвет. При микроскопии мазков были обнаружены грамнегативные одиночно и попарно размещенные короткие палочки с закругленными концами. Исходя из результатов, полученных при изучении культуральных и морфологических свойств, данный изолят был идентифицирован как *Aeromonas spp.* В дальнейшем с целью определения видовой принадлежности выделенного изолята были проведены биохимические исследования. Результаты биохимического исследования изложены в таблице 1.

Таблица 1– Основные биохимические свойства изолята *Aeromonas spp.*, выделенного от форели

Биохимические показатели	Учет реакции	Биохимические показатели	Учет реакции
Окрашивание по Граму	–	Лизиндекарбоксилаза	–
Подвижность	–	Орнитинде карбоксилаза	–
Оксидаза	+	О/Ф тест	+/+
«Росение» на агаре	–	Ферментация арабинозы	+
Индол	–	Ферментация глюкозы	+
Сероводород	–	Ферментация лактозы	–
Реакция Фогес-Проскауэра	+	Ферментация манозы	+
Нитратредуктаза	+	Ферментация сахарозы	+
Бетагалактозидаза	+	Ферментация манита	+
Аргининдигидролаза	+	Ферментация салицина	+
Гидролиз мочевины	–	Гидролиз желатины	+

Примечание– «+» - положительный результат, «–»-отрицательный результат

Биологическую пробу проводили на карпах чешуйчатых. Для этого были сформированы опытная и контрольная группы рыб по 10 карпов в каждой. Для проведения биопробы использовали 48-суточную культуру выделенного изолята. Опытной группе бактериальную взвесь вводили внутривентрально в дозе 0,1 см³ (1x10⁸ микр. кл.). Контрольной группе вводили стерильный физиологический раствор в дозе 0,1 см³. Наблюдение за рыбой вели в течение 7 суток.

При проведении биологической пробы были получены следующие результаты. Регистрировали угнетенное состояние 4 рыб опытной группы на вторые сутки после заражения. К концу срока наблюдения рыбу эвтаназировали и подвергали патологоанатомическому и бактериологическому исследованию. Были сделаны посевы на МПА из селезенки, печени и почек опытной рыбы. Через 48 часов инкубирования при температуре 24,0±0,5°C был зафиксирован рост гладких блестящих плоских колоний размером 1–2 мм светло-коричневого цвета. Также отмечали окрашивание среды МПА в коричневый цвет спустя 96 часов. Рост колоний наблюдали в посевах из почек 4 карпов. В посевах из внутренних органов рыб контрольной группы рост микроорганизмов не наблюдался.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных лабораторных исследований установлено, что одним из этиологических факторов массовой гибели рыбы в частном форелеводческом хозяйстве являлся возбудитель фурункулеза лососевых *Aeromonas salmonicida*. Выделенному изоляту был присвоен номер Ф11–11.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Бактерия вида *Aeromonas salmonicida* / Н. Г. Горшкова, Т. И. Канаева // Актуальные вопросы микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и биотехнологии – 2010. – Том 3. – С. 16–18.
- 2 Влияние вирусных инфекций на развитие аквакультуры России / Пичугина Т. Д., Завьялова Е. А. // Ветеринарная медицина. – 2005. – №85. – Том II – С. 906.
- 3 Определитель бактерий Берджи. Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига. Девятое издание. Том №1. – Москва «Мир». – 1997. – С. 426.
- 4 A.J. Martínez-Murcia, L. Soler. Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum*. Molecular Diagnostics Center Aptdo. 169. 03300 Orihuela, Alicante, Spain. – 2005. – P. 2.
- 5 Bacterial diseases in polish freshwater farms and the methods of their diagnostic / Pekala A., Kozinska A. // Ветеринарная Медицина. – 2008. – № 90. – PP. 18–23.
- 6 Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain / D. Minana-Galbis,

M. Farfa'n, J.G. Lore'n and M.C. Fuste // Journal of Applied Microbiology – 2002. – № 93. – PP. 420–430.

7 Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhea / L.A. Sechi, A. Deriu, M.P. Falchi, G. Fadda, S. Zanetti // Journal of Applied Microbiology – 2002. – № 92. – PP. 221–227.

8 Evaluating virulence of waterborne and clinical *Aeromonas* isolates using gene expression and mortality in neonatal mice followed by assessing cell culture's ability to predict virulence based on transcriptional response / S.L. Hayes, M.R. Rodgers, D.J. Lye, G.N. Stelma, C.A. McKinstry, J.M. Malard, S.J. Vesper // Journal of Applied Microbiology – 2007. – № 103. – PP. 811–820.

9 Identification of atypical *Aeromonas salmonicida*: inter-laboratory evaluation and harmonization of methods / I. Dalsgaard, B.K. Gudmundsdottir, S. Helgason, S. Hoie, O.F. Thoresen, U.-P. Wichardt, T. Wiklund // Journal of Applied Microbiology – 1998. – № 84. – PP. 999–1006.

10 Isolation of *Aeromonas salmonicida* in association with purple-pigmented bacteria in sediment from a Scottish loch / D.A. Austin, P.A.W. Robertson, D.K. Wallace, H. Daskalov and B. Austin // Journal of Applied Microbiology – 1998. – № 27. – PP. 349–351.

11 Reappraisal of the effect of temperature on the growth kinetics of *Aeromonas salmonicida* / V. Gue'rin-Fauble'e, S. Charles, M. Chomarat, J.-P. Flandrois // Journal of Applied Microbiology – 1997. – № 25. – PP. 363–366.

12 The development of random DNA probes specific for *Aeromonas salmonicida* / H.J. Oakey, J.T. Ellis, L.F. Gibson // Journal of Applied Microbiology – 1998. – № 84. – PP. 37–46.

13 The occurrence of aerolysin-positive *Aeromonas* spp. and their cytotoxicity in Norwegian water sources / O. Ormen, O. Ostensvik // Journal of Applied Microbiology – 2001. – № 90. – PP. 797–802.

Галушка С. А., младший научный сотрудник

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г.Харьков

ПАЗИТОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ КРУСТАЦЕОЗОВ РЫБ НА УКРАИНЕ

ВВЕДЕНИЕ

Эпизоотическая ситуация по паразитарным заболеваниям рыб на территории Украины изучена слабо. Паразитологические исследования по определению степени поражения рыб возбудителями крустацеозов за последние десятилетия практически не проводились. Возрастает потребность в получении ветеринарной информации по данным заболеваниям для контроля динамики эпизоотий крустацеозных заболеваний, определения очагов неблагополучия, учета наносимого ущерба, определения степени риска и прогнозирования ситуации [1,2,3].

Цель исследования – изучить современную эпизоотологическую ситуацию водных объектов Украины по крустацеозным заболеваниям рыб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на территории Харьковской, Сумской, Полтавской, Николаевской, Одесской, Житомирской областей в разные сезоны года.

Отбор ихтиологического материала проводили на реках Северский Донец (Уди, Мжа, Айдар, Деркул), Ворскла (Мерла), Сула, Псол, Южный Буг, Ингул, Дунай, озере Ялпуг, Орельском, Берекском, Краснопавловском и Рогозянском водосховищах, речках Колбана, Дидок, Сурмачка – суббасейна Сули; речке Дубовец – суббасейна Тетерова.

Для исследования отбирали рыб разного вида и возрастных групп. Проводили неполный биологический анализ (определяли массу, линейный размер, возраст). Исследованию подвергали карпа, белого амура, леща, плотву, красноперку, окуня, щуку, сома европейского и др.

Паразитологический анализ рыб проводили методом полного или неполного паразитологического вскрытия (К.И. Скрябин, 1928). Видовую принадлежность выявленных паразитов определяли по О. Н. Бауеру (1987) [5]. При этом, определяли показатели экстенсивности (ЭИ) и интенсивности инвазии (ИИ) [4] .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

С целью изучения распространения возбудителей крауцеозов проводили паразитологические исследования материала, который отбирали на реках, водохранилищах, озерах. Исследования проводили на территории Харьковской, Сумской, Полтавской, Николаевской, Одесской, Житомирской областей в разные сезоны года.

В результате проведенных исследований установлено, что в условиях природных водоемов, а именно, в речных водных системах у рыб чаще регистрируются возбудители эргазилеза *Ergasilus sieboldi*, *E. briani*, а на озерах, прудах и водохранилищах – лерниоза (*Lernaea cyprinacae*), аргулеза (*Argulus foliaceus*), калигоза (*Caligus lacustris*) и синэргазилеза (*Sinergasilus lienii*). Уровень инвазирования рыб зависел от сезона года.

Результаты паразитологических исследований рыб на наличие возбудителей крауцеозов представлены на рисунке 1.

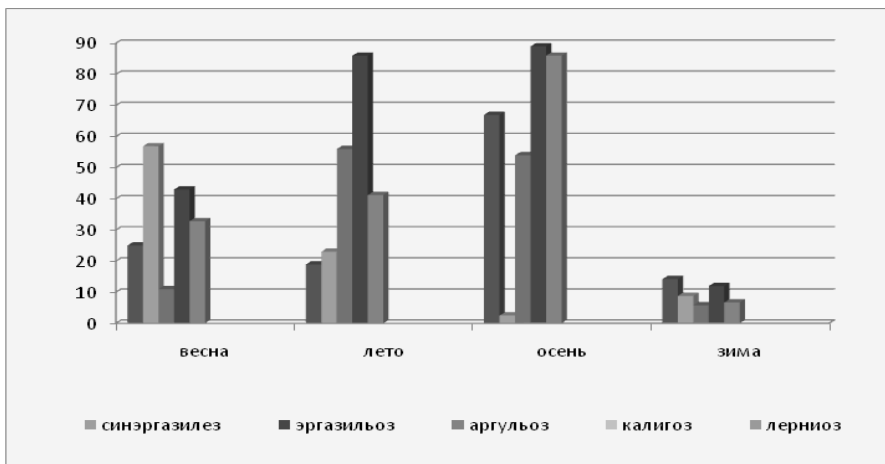


Рисунок 1 – Средний уровень экстенсивности инвазирования рыб возбудителями крауцеозов на водных объектах Украины в разные сезоны года

Следует отметить, что в обследованных водоемах Украины уровень инвазирования рыб возбудителями крауцеозов имел выраженную сезонность. Так, сезонная динамика регистрировалась при паразитировании лерний: весной ЭИ составляла 77,2 %, на протяжении лета она уменьшалась до 8,9 %.

Вспышки синэргазилеза у белого амура отмечали в сентябре (ЭИ – 76,9%), весной и летом зараженность составляла 12,3–23,4 %.

Свои особенности имела динамика заражения рыб аргулюсами: весной ЭИ составляла 12,4 %, а в течение летнего периода отмечали вспышки

заболевания (ЭИ 56,7 %) у карпа, леща и судака.

Что касается инвазирования рыб возбудителем калигоза, то уровень зараженности был высоким в сентябре месяце, и составлял у карася се ребристого 65,2 %, у леща – 38,9 % (пруды лиманного типа возле р. Дунай).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного эпизоотологического мониторинга получены новые данные о распространении возбудителей crustaceозов на территории Украины. Выявлено 6 видов паразитов, которые относятся к классу Crustacea (ракоподобные). Для большинства заболеваний характерна сезонная динамика, которая зависит от видовой принадлежности возбудителя.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Ауденская, А.М. Паразиты рыб Ростовской области //Материалы докл. науч. конфер. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями».— Вып. 6.— Москва.—2005. — С. 187–188.
- 2 Грищенко, Л.И. Болезни рыб и основы рыбоводства [Текст] / Л.И. Грищенко, М.Ш. Акбаев, Г.В. Васильков. — М.: Колос, 1999. — 456 с.
- 3 Давыдов, О.Н. Болезни пресноводных рыб [Текст] / О.Н. Давыдов, Ю.А. Темниханов. — К.: Ветинформ, 2004. — 544 с.
- 4 Маркевич, А.П. Паразитофауна пресноводных рыб УССР [Текст] / А.П. Маркевич. — К.: ИАНУ ССР, 1951. — 376 с.
- 5 Определитель паразитов пресноводных рыб [Текст] Т. 1, ч. 2. Паразитические многоклеточные / В.В. Авдеев [и др.]; под ред. О.Н. Бауера. — Л.: Наука, 1987. — 583 с.

Евтушенко И.Д., кандидат ветеринарных наук

Евтушенко А.В., кандидат ветеринарных наук

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

СОВРЕМЕННОЕ ЭПИЗООТИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ПО ПАРАЗИТАРНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ РЫБ В УСЛОВИЯХ СЕВЕРО-ВОСТОЧНОГО РЕГИОНА УКРАИНЫ

ВВЕДЕНИЕ

Паразитарные заболевания рыб регистрируются на водных объектах Украины, России, и во многих странах Европы, вызывая при этом задержку скорости роста, санитарную выбраковку и гибель инвазированной рыбы [1,2,3,4,5,6,9,12].

Нарушения экологического равновесия в условиях зарегулирования рек и образования водохранилищ приводит к резкому увеличению заболеваемости рыб и, как следствие, к постепенному уменьшению ее численности. В условиях водоемов с низким уровнем проточности складываются благоприятные условия для циркуляции большинства видов возбудителей паразитарных заболеваний – лигулеза, диграммоза, диплостомоза, постодиплостомоза, гиродактилеза, лерниоза, дактилогироза, лерниоза, аргулеза и т.д. Более чувствительным к возбудителям является малек рыб, особенно сеголетки. Если в условиях производства проводится постоянный контроль за состоянием здоровья рыб и при необходимости проводятся лечебно-профилактические мероприятия, то в естественных условиях массовая гибель рыб остается незамеченной, и при вышеперечисленных заболеваниях уровень летальности может достигать до 50 – 90 %. Назвать такую ситуацию саморегулированием численности популяций рыб невозможно, в естественных условиях существования рек такая ситуация исключается [8,13].

Эпизоотическая ситуация по паразитозам рыб, которая сложилась на естественных водных системах Украины требует детальных научных исследований, которые в последние десятилетия не проводились.

Целью исследований было изучение современной эпизоотической ситуации по паразитарным заболеваниям рыб на естественных водоемах Северо-Восточного региона Украины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего было исследовано 307 особей рыб разных возрастных групп (от однолеток до трехлеток), которые относились к 17 видам – плотва, линь, судак, карась, красноперка, щука, лещ, окунь, линь, сом европейский, ук-

лейка, пескарь, овсянка, белый амур, амурский чебачок, белоглазка, густера.

Отбор гидробионтов проводили во время контрольных отловов в естественных водоемах Северо-Восточного региона, таких как, р. Харьков (притоки р. Уды, район Гидропарка, г. Харьков), р. Сыроватка (притоки р. Псьол, с. Краснополье Сумская обл.), р. Мерла (притоки р. Ворскла, с. Заброды, Харьковская обл.), р. Ржавчик (притоки р. Мерефа (р. Мжа), с. Мерефа, Харьковская обл.), р. Мокрый Мерчик (притоки р. Уды, с. Доброполье, Харьковская обл.), р. Кадница (притоки р. Рогозянка (р. Уды), с. Сквородиновка, Харьковская обл.), р. Ворсклица (притоки р. Ворскла, с. Пожня, Сумская обл.), р. Ворскла (с. Ямное, Сумская обл.), р. Дубовец (притоки р. Тетеров, с. Царицовка, Житомирская обл.), р. Ворскла (г. Полтава), р. Уды (с. Водяное), водоем-охладитель Змиевской ТЭС (Харьковская обл.), р. Дунай (Одесская обл.) в разные сезоны года. При этом, проводился неполный биологический анализ рыбы (определяли массу, линейный размер, возраст). Для исследования отбирали до 15 экземпляров рыб разного вида каждой возрастной группы. Ихтиопатологические исследования проводили по общепринятым методам полного и неполного паразитологического вскрытия [1]. Видовую принадлежность выявленных паразитов устанавливали по О. Н. Бауеру (1987 г.), при этом определяли показатели экстенсивности и интенсивности инвазии [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Установлено, что в условиях естественных водоемов, особенно в речных водных системах, у рыб регистрируются возбудители с прямым циклом развития: цестодозы (кавии, ботриоцефалы, лигулы), трематодозы (диплостомы, тетракотилюсы, постодиплостомы, голостефены), крустацеозы (лернии, аргулюсы, ергазилюсы, синергазилюсы), возбудители протозоозов (триходины та ихтиофтириусы), возбудители моногеноидозов – дактилогирусы. Степень инвазирования рыб зависела от вида и возраста рыб, а также сезона года. Следует отметить, что видовой состав паразитов у рыб естественных водоемов был разнообразным. Результаты паразитологических исследований рыб, выловленных с естественных водоемов, представлены в таблице 1.

Анализируя данные, представленные в таблице, видно, что в обследованных естественных водоемах Северо-Восточного региона основными видами возбудителей, которых выявляли у рыб, были диплостомы, постодиплостомы, кавии, кариофилы, лигулы, аргулюсы, тетракотилюсы, дактилогирусы. Учитывая ранее полученные результаты исследований, показатели инвазированности естественных водоемов по видовому составу превышают показатели искусственных водоемов.

Таблица 1– Экстенсивность и интенсивность инвазирования рыб возбудителями паразитарных заболеваний в естественных водоемах Северо-Восточного региона Украины

Пункты отбора	Сезон года	Вид рыбы	Возраст рыбы	Вид гельминта	ЭИ, %	ИИ, экз
1	2	3	4	5	6	7
р. Северский Донец р. Харьков р. Мокрый Мерчик р. Сыроватка р. Мерла р. Ржавчик р. Кадница р. Ворсклица р. Ворскла р. Дубовец р. Уды р. Большая Готва р. Дунай	зима	плотва	двухлет-ка	<i>Diplostomum spataceum</i>	12,0	5–8
		уклейка	трехлетка	–	–	–
		щука	двухлет-ка	–	–	–
		судак	двухлет-ка	<i>Diplostomum spataceum</i>	5,9	4–8
		лещ	двухлет-ка	<i>Diplostomum spataceum</i>	16,9	5–12
				<i>Asymfilodora sp.</i>	28,0	2
		окунь	однолетка	<i>Tetracotyle sp.</i>	28,9	12–17
				<i>Acanthocephalus lucii</i>	27,0	7
		красно-перка	двухлет-ка	–	–	–
		карась	трехлетка	<i>Argulus foliaceus</i>	60,0	5–6
		линь	двухлет-ка	–	–	–
	весна	густера	двухлет-ка	<i>Diplostomum spataceum</i>	100	8–12
		линь	трехлетка	<i>Asymfilodora sp.</i>	12,9	2–4
		лещ	трехлетка	<i>Diplostomum spataceum</i>	100	16–28
				<i>Posthodiplostomum cuticola</i> <i>Caryophyllaeus laticeps</i>	34,0 65,9	23–29 2–5

Продолжение таблицы 1

Пункты отбора	Сезон года	Вид рыбы	Возраст рыбы	Вид гельминта	ЭИ, %	ИИ, экз
1	2	3	4	5	6	7
р. Северский Донец р. Харьков р. Мокрый Мерчик р. Сыроватка р. Мерла р. Ржавчик р. Кадница р. Ворсклица р. Ворскла р. Дубовец р. Уды р. Большая Готва р. Дунай		плотва	однолетка	-	-	-
		судак	трехлетка	<i>Argulus foliaceus</i>	15,89	5–11
		сом европейский	двухлетка	<i>Sinergasilus lienii</i> <i>Proteocephalus dubius</i>	35,7 45,9	12–23 3–5
		уклейка	однолетка	<i>Ligula intestinalis</i>	17,9	1–2
		пескарь	двухлетка	<i>Posthodiplostomum cuticola</i>	12,0	4–6
		овсянка	сеголетка	<i>Diplostomum spataceum</i>	24,0	4–11
	лето	густера	однолетка	<i>Dactylogyrus. anchoratus</i>	28,0	8–10
				<i>Ichthyocotylurus platicephalus</i> <i>P. cuticola</i>	79,0 45,0	9–17 7–17
				<i>Dactylogyrus. anchoratus</i>	24,0	8–11
		белый амур	двухлетка			
		судак	двухлетка	–	–	–
		карась серебрястый	двухлетка	<i>Khawia sinensis</i>	28,0	1–2
		окунь	трехлетка	<i>Tetracotyle sp</i>	45,78	12–19
		красноперка	однолетка	<i>Diplostomum spataceum</i>	27,0	3–9
				<i>P. cuticola</i>	34,89	4–17
		плотва	двухлетка	<i>Diplostomum spataceum</i>	23,9	4–12
		линь	двухлетка	<i>Ergasilus sieboldi</i>	32,0	5–14
				<i>Capillaria brevispinela</i>	35,0	2
		пескарь	двухлетка	<i>Posthodiplostomum cuticola</i>	12,0	4–7
		овсянка	однолетка	<i>Diplostomum spataceum</i>	7,6	3–10
		амурский чебачок	однолетка	–	–	–
		горчак	двухлетка	<i>Ligula intestinalis</i>	24,0	1

Продолжение таблицы 1

Пункты отбора	Сезон года	Вид рыбы	Возраст рыбы	Вид гельминта	ЭИ, %	ИИ, экз
1	2	3	4	5	6	7
р. Северский Донец р. Харьков р. Мокрый Мерчик р. Сыроватка р. Мерла р. Ржавчик р. Кадница р. Ворсклица р. Ворскла р. Дубовец р. Уды р. Большая Готва р. Дунай	лето	лещ	двухлетка	<i>Diplostomum spataceum</i>	86,9	17–23
				<i>Tetracotyle sp</i>	87,93	12–146
			двухлетка	<i>Dactilogirus anchoratus</i>	19,0	4–7
		щука	двухлетка	<i>Trienophorus crassus</i>	18,0	3–5
	осень	лещ	двухлетка	<i>Diplostomum spataceum</i>	55,0	12–23
				<i>P. cuticola</i>	45,0	6–15
		горчак	двухлетка	<i>Ligula intestinalis</i>	5,0	1
		карась серебристый	двухлетка	<i>Diplostomum spataceum</i>	12,0	12– 19
		красноперка	трехлетка	<i>Diplostomum spataceum</i>	34,12	9– 14
		плотва	двухлетка	<i>Diplostomum spataceum</i>	9,45	4– 11
				<i>Tetracotyle sp</i>	45,0	17– 85
		линь	двухлетка	<i>Holostephenus dufinini</i>	30,0	3– 5
				<i>Diplostomum spataceum</i>	6,78	5– 11
		пескарь	двухлетка	–	–	–
		овсянка	однолетка	<i>Diplostomum spataceum</i>	9,3	4– 7
				<i>P. cuticola</i>	23,0	12– 15
		амурс-кий чебачок	однолетка	–	–	–
		окунь	трехлетка	<i>T.percaefluviat ilus</i>	12,0	2– 4
				<i>Tetracotyle sp</i>	56,0	12– 30
		щука	двухлетка	<i>Trienophorus crassus</i>	27,0	2– 4
		щиповка	однолетка	–	–	–
		уклейка	–	<i>Ligula intestinalis</i>	5,0	1
		белоглаз-ка	сеголетка	<i>Ligula intestinalis</i>	2,3	1– 2
				<i>Ergasilus sieboldi</i>	23,9	2– 5
			двухлетка	<i>Diplostomum spataceum</i>	14,0	4– 10

При обследовании промысловых видов рыб (белый амур, карась, линь, лещ) было выявлено 6 видов возбудителей инвазионных заболеваний рыб. Чаще всего регистрировали такие инвазионные заболевания как кавиоз – у 28,0 %, ИИ – 1-2 экз., диплостомоз – от 14,0 до 100 %, ИИ – 14-28 экз., кавиоз – у 28 %, ИИ – 1-2 экз., дактилогироз – у 28 %, ИИ – 8-10 экз., аргулез – 60 %, ИИ – 5-6 экз., карифилез – 65,9 %, ИИ – 2-5 экз.

При обследовании сорных видов рыб (густера, плотва, красноперка, уклейка, окунь) выявляли около 10 видов возбудителей паразитозов рыб. Наиболее часто у выловленной рыбы регистрировали – диплостомоз – 100 %, ИИ – от 8 до 12 экз., постодиплостомоз – у 45,0 %, ИИ – 4-29 экз., карифилез – у 65,9 %, ИИ – 3-5 экз., акантоцефалез – у 27,0 %, ИИ – 7 экз., ИИ – 5-11 экз., лигулез – у 24 %, ИИ – 1-2 экз., тетракотилез – у 45,78 %, ИИ – 6-25 экз., аргулез – от 15,89 до 60 %, ИИ – 6-11 экз.

Следует отметить, что в естественных водоемах степень заражения карповых рыб лигулами была невысокой и составляла зимой у горчака 24,0 %, весной – у уклейки 17,9 %, летом у горчака 24,0 %, а осенью – 5 % у уклейки. Во всех случаях интенсивность инвазии была в пределах 1-3 экземпляра на особь, что связано с биологической особенностью лигул. Диплостомом выявляли у всех видов обследованных рыб семейства карповых. Экстенсивность инвазии была высокой у рыб старших возрастных групп (двухлетки и трехлетки) и вида (лещ, плоскирка), она составляла от 86,9 до 100 %.

Степень инвазирования сома европейского синергазиллюсами составляла (ЭИ – 35,7 %, ИИ – 12-23 экз.), протеоцефалюсами (ЭИ 45,90 % ИИ 3 – 5 экз.).

Высокий уровень инвазирования метацеркариями *Tetracotyle sp* был зарегистрирован у леща, плотвы и окуня. У леща наиболее интенсивно были поражены плавники, количество метацеркарий достигало 146 экз. У плотвы больше была инвазирована скелетная мускулатура (ИИ – 17-85 экз.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате паразитологического мониторинга установлено значительное распространение возбудителей паразитарных заболеваний рыб естественных водоемов Северо-Восточного региона Украины. При этом выявлено 16 видов паразитов, которые относятся к 4 классам: Trematoidea, Cestoidea, Nematoda, Crustacea. Установлено, что наиболее распространенными являются кишечные цестодозы и трематодозы.

ЛІТЕРАТУРА

- 1 Быков, В.П. Гельминтозоонозный мониторинг водоемов/ В.П.Быков, Р.Г. Митинская, И.Е. Зюзин [и др.]/Ветеринария. –2001.–№3.– С.13–15.
- 2 Вовк, Н.И., Бучацкий, Л.И., Пирус, Р.И. Ихтиопатологический мониторинг внутренних водоемов Украины //Пробл. іхтіопатології. Матеріали Першої Всеукр. конф. – Київ, 2001.– С. 31– 36.
- 3 Герасимчик, В.А., Волков, В.П. Наиболее распространенные паразитозы рыб в естественных водоемах Витебской области //Ветеринарная наука производства: научные труды–Минск, 2005–Вып. 38.–С.158– 159.
- 4 Давыдов, О.Н., Темниханов, Ю.Д., Базеев, Р.Е. Паразиты и болезни пресноводных рыб Украины //Сб. науч. тр. /Всерос. науч. - исслед. ин-т преснов. рыб. хоз-ва.–Москва. – 2004.–Вып. 79.– С.73– 78.
- 5 Зон, Г.А., Ивановська, Л.Б., Андрійшина, В.М. Результати моніторингу паразитарних хвороб риb з водоймищ Сумської області //Збір. наук. праць /Проблеми зооінженерії та ветеринар. мед. , – Харків, – 2006– Вип. 13 (38). – Ч. 3.– С. 342– 394.
- 6 Куценко, В.Г. Етіологічна структура заразних хвороб риb в Харківській області за період 2006–2008 р. //Збір. наук. праць /Ветеринарна медицина /Укр. акад. аграр. наук.–Харків, – 2009.–Вип. 92.–С.260–262.
- 7 Маркевич, А.П. Паразитофауна пресноводных рыб УССР.–Киев: АН УССР.–1951.–376 с.
- 8 Новак, А.И., Новак, М.Д., Феоктистов, С.К. Паразитарные болезни рыб в водоемах Костромской области: эпизоотология, патогенное значение, профилактика //Тр. Костром. гос. с - х. акад.. – Кострома. – 2004 –Вып. 62. – С. 72– 77.
- 9 Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР / Под ред. О. Н. Бауера : в 3-х тт.– Л., 1987. – Т. 3: Паразитические многоклеточные, Ч. 2. – 584 с.
- 10 Паразитарные болезни рыб и санитарная оценка рыбной продукции / Под ред. Г.В. Василькова – М., 1999.–191 с.
- 11 Розум, Э.Ю., Оніщенко, О.В. Поширення постодиплостомозу серед риb у водоймищах Північно-Західного Причорномор'я //Матер. наук.-практич. конферен. «Актуальні проблеми охорони здоров'я риb та інших гідробіонтів»(м. Феодосія, 26-29 травня 2008 р.).–Харків.– 2008.–С. 352– 356.
- 12 Ракаускас, В. Мониторинг инвазионных болезней промысловых рыб во внутренних водоемах Литвы //Вопросы рыб. хоз-ва Беларуси /Ин-т рыб. хоз-ва Нац. Акад.. наук Беларуси. – Минск.–2008.–Вып. 79.– С.73– 78.
- 13 Пушкар, О.М. Розповсюдження хвороб риb у прісноводних водоймищах півдня України //Аграрний вісник Причорномор'я./Збірник наукових праць. – Одеса, 2000.–Вип. №4 (9).– С. 186 – 190.

Якубовский М.В., доктор ветеринарных наук, профессор
Мясцова Т.Я., кандидат ветеринарных наук, доцент
Оленич В.П., младший научный сотрудник

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

ВЛИЯНИЕ ДЕГЕЛЬМИНТИЗАЦИИ НА ОБМЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ У ТЕЛЯТ ПРИ СПОНТАННЫХ ЖЕЛУДОЧНО- КИШЕЧНЫХ ПАЗАРИТОЗАХ

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для лечения паразитарных заболеваний сельскохозяйственных и домашних животных применяются монокомпонентные антгельминтики (фенбендазол, албендазол, ивермектин и др.). При применении их наблюдается отрицательное влияние на иммунобиологические показатели организма животных, выражающееся в угнетении иммунной системы – клеточного и гуморального иммунитета [1].

При применении антгельминтиков, содержащих одну активную субстанцию, наблюдается сравнительно длительное восстановление иммунно-биологической резистентности организма до физиологических значений [2, 3, 4].

При длительном применении животным монокомпонентных антгельминтиков, например, панакура, тимбендазола и др., у гельминтов развивается устойчивость, так как повышается активность белков и наблюдаются мутации в белках, отвечающих за функционирование ферментов детоксикации – монооксигеназ, эстераз, галактионтрансфераз у гельминтов [5].

Доказано, что при паразитарных болезнях значительно снижается уровень иммунитета, в т. ч. и поствакцинального, поэтому для выработки напряженного иммунитета при вакцинации животных необходимо их за две недели освобождать от паразитов (М.В.Якубовский и соавт., 1982; Э.Х.Даугалиева, 1983 и др.).

Применение комплексных препаратов позволит предупредить развитие у паразитов резистентности к ним. Компоненты комплексного препарата (антгельминтики в сочетании с иммуномодуляторами) усиливают действие друг друга, т.е. проявляют синергический эффект. При таком активном одновременном воздействии препарата на различные звенья обменных процессов у паразитов нарушаются структурные и функциональные элементы их жизнедеятельности, что приводит к дестабилизации обмена веществ, прекращению питания, гибели паразитов и элиминации их из организма. Все это позволяет предупредить развитие толерантности у парази-

тов к препарату.

Иммуномодуляторы, входящие в состав комплексного препарата «Полипарацид», позволяют уменьшить неблагоприятное воздействие противопаразитарных субстанций и токсических веществ, образующихся после гибели паразитов, на организм животного и повысить иммунобиологическую резистентность животных.

Цель исследований – изучить влияние комплексного противопаразитарного препарата широкого спектра действия с иммуномодулирующими свойствами на иммунобиологические показатели крови телят при спонтанных желудочно-кишечных паразитозах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение влияния комплексного препарата «Полипарацид» на иммунобиологические показатели крови телят при спонтанных желудочно-кишечных паразитозах проводили в хозяйстве Логойского района. Было сформировано 4 группы телят в возрасте 3-3,5 мес. по 7 голов в каждой (2 опытные и 2 контрольные). Телята трех групп были инвазированы стронгилоидами, стронгилятами желудочно-кишечного тракта, эймериями и балантидиями, животные 4 группы были свободны от желудочно-кишечных паразитов. Животным 1-ой опытной группы применили полипарацид в дозе 75 мг/кг живой массы, телятам 2-ой группы - в дозе 50 мг/кг живой массы. Животным 3 и 4 группы препарат не применяли, они служили контролем.

Полипарацид применяли *per os* двукратно с интервалом 24 часа. Взятие крови проводили до дачи полипарацита и через 7 дней, 14, 28 и 62 дня после применения препарата для определения содержания в сыворотке крови белковых фракций методом электрофореза с использованием наборов, биохимических показателей (содержание общего белка, активность ферментов – АСТ, АЛТ, ЛДГ и ЩФ) – на биохимическом анализаторе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для оценки уровня иммунобиологической резистентности организма животного наиболее информативными являются количественные и качественные изменения белкового состава сыворотки крови.

Установлено, что количество общего белка в сыворотке крови увеличилось на 23,41% ($P < 0,01$) у телят, получавших полипарацид в дозе 75 мг/кг, и на 20,14% ($P < 0,05$) - в дозе 50 мг/кг к 14 дню наблюдений, и сохранялось на достоверно более высоком уровне на 28 день исследований по отношению к инвазированным животным (рисунок 1).

Качественное и количественное изменение состава белковых фракций сыворотки крови отражено в таблице 1.

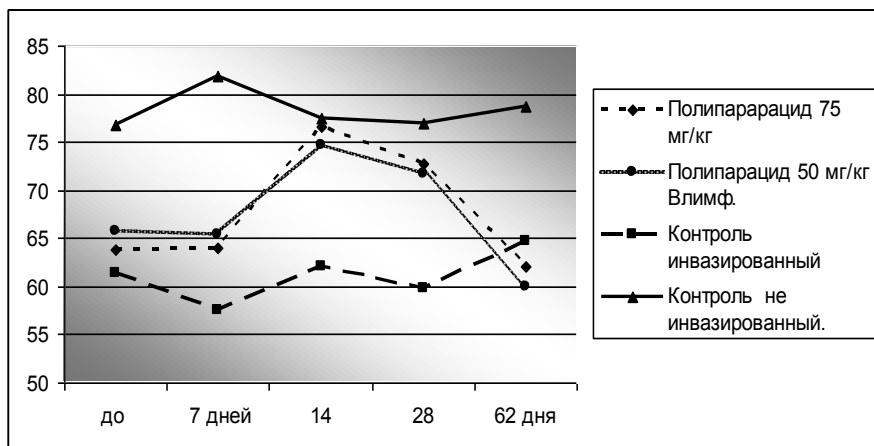


Рисунок 1 – Влияние полипарацита на динамику общего белка при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта телят, г/л

Установлено, что на 7-14 дней после применения полипарацита в дозах 75 и 50 мг/кг живой массы количество альбуминов увеличилось на 15,43% и 15,67% ($P<0,01$) соответственно по сравнению с зараженными телятами. Однако их количество было значительно ниже, чем у здоровых животных.

Содержание α_1 -глобулинов в сыворотке крови на 7 и 14 день после применения полипарацита в дозе 75 мг/кг живой массы уменьшилось на 29,91% ($P<0,001$) и - 17,56% ($P<0,05$) соответственно.

Содержание α_2 -глобулинов на 7 и 14 дни после применения полипарацита уменьшилось на 22,19% ($P<0,001$) у телят, получавших полипарацид в дозе 75 мг/кг, и на 19,58% ($P<0,001$) – в дозе 50 мг/кг по отношению к инвазированным животным. К 28-му дню количество α_2 -глобулинов было ниже, чем у зараженных телят.

Содержание β -глобулинов в сыворотке крови обеих опытных групп имело достоверно более высокие значения с 7-го по 62-ой день исследования по отношению к таковому показателю у инвазированных животных.

Уровень γ -глобулинов у телят обеих опытных групп на 7 – 14 дни после дегельминтизации увеличился у телят обеих опытных групп на 26,73% и 24,34% ($P<0,001$) по сравнению с инвазированными телятами.

Полученные данные по белковому обмену у телят инвазированных кишечными паразитами, после применения полипарацита в терапевтических дозах свидетельствуют о восстановительных процессах в организме телят.

Таблица 1 – Динамика фракций белка при применении полипарацид при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта телят, %

Дни исследования	Полипарацид в дозе, мг/кг живой массы		Контроль зараженный	Контроль не зараженный
	75	50		
Альбумины				
до дачи препарата	39,76±2,0	42,56±1,10	42,39±1,42	50,34±0,77
через 7 дней	48,09±0,8**	45,35±1,21	42,48±1,26	47,12±1,24
14	46,75±1,20**	46,85±0,97**	40,50±1,41	51,46±1,05
28	42,20±1,41	42,71±0,84	42,86±0,65	50,20±0,65
62 дня	41,36±0,76	42,21±1,68	41,54±1,08	50,21±0,74
а ₁ -глобулины (а ₁ -антитрипсин)				
до дачи препарата	8,38±0,25	8,30±0,30	7,99±0,13	6,51±0,26
через 7 дней	5,88±0,25 ***	7,52±0,39	8,39±0,25	7,0±0,29
14	6,24±0,28*	6,89±0,19	7,57±0,49	6,82±0,23
28	7,30±0,33	7,70±0,39	8,052±1,05	6,60±0,26
62 дня	7,66±0,33	7,51±0,31	8,65±0,21	6,61±0,19
а ₂ – глобулины (церулоплазмин и гаптоглобин)				
до дачи препарата	10,44±0,51	10,85±0,21	10,78±0,50	8,79±0,25
через 7 дней	8,66±0,11***	8,95±0,24***	11,13±0,19	9,22±0,23
14	9,08±0,28***	9,86±0,15***	11,26±0,21	8,8±0,24
28	10,27±0,21	10,28±0,18	10,90±0,32	9,58±0,41
62 дня	10,11±0,33*	10,37±0,17*	10,89±0,15	8,67±0,14
b– глобулины (комплемент C ₃ и трансферрин)				
до дачи препарата	12,18±0,51	13,11±0,53	12,18±0,32	17,30±0,42
через 7 дней	16,55±0,40***	15,82±0,35***	12,38±0,69	17,55±0,55
14 дней	18,78±0,37***	17,63±0,39***	12,62±0,91	17,41±0,50
28 дней	16,42±0,40***	14,50±0,64	12,78±0,60	18,57±0,40
62 дня	14,18±0,39***	13,40±0,30***	11,25±0,40	18,30±0,54
g – глобулины (иммуноглобулины)				
до дачи препарата	18,73±0,62	19,77±0,18	19,27±0,47	23,75±0,64
через 7 дней	25,98±0,56***	25,49±0,77***	20,50±0,52	25,80±0,71
14	23,42±0,75*	23,20±1,13	20,91±0,81	25,15±0,63
28	21,46±0,56	21,65±0,92	22,61±0,58	25,10±0,79
62 дня	20,36±0,49	21,58±1,33	20,05±1,68	25,33±0,61

Примечание – * P <0,05; ** P <0,01; *** P<0,001

При многих заболеваниях образование иммунных комплексов представляет собой естественную часть иммунного ответа. С их помощью происходит освобождение организма от возбудителя, цельного или разрушенного (клиренс). Результаты изучения динамики уровня циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови телят, инвазированных ассоциациями паразитов, после применения полипарацита представлены на рисунке 2.

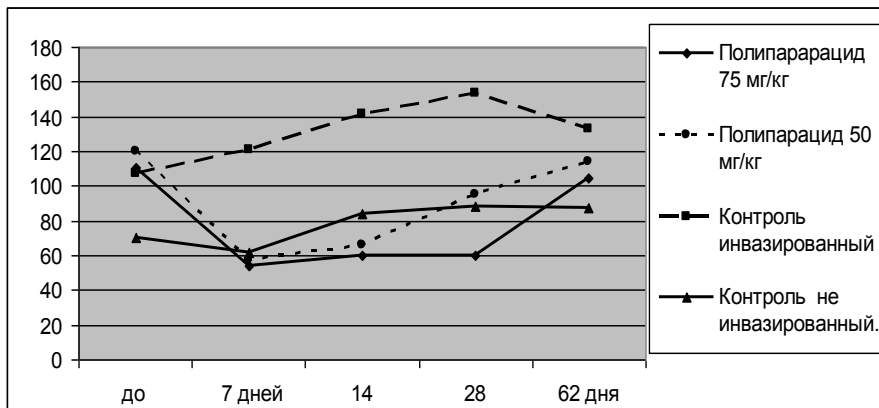


Рисунок 2 – Динамика циркулирующих иммунных комплексов сыворотки крови при применении полипарацита при паразитозах желудочно-кишечного тракта телят, %

Динамика циркулирующих иммунных комплексов характеризуется их снижением на 7 день после применения полипарацита в дозах 75 и 50 мг/кг живой массы – 2,25 и 2,10 раза ($P<0,001$) соответственно.

Результаты биохимического исследования сыворотки крови у телят инвазированных кишечными паразитами после дачи им полипарацита в терапевтических дозах представлены в таблице 2.

Полученные результаты исследований свидетельствует, что активность ферментов через 14 дней после применение полипарацита в дозе 75 мг/кг и 50 мг/кг живой массы изменяется. Так, уровень аспартатамино-трансферазы в сыворотке крови телят уменьшился на 38,05% и 29,82% ($P<0,01$), аланинаминотрансферазы – на 27,95 % ($P<0,01$) и 23,01 % ($P<0,01$) соответственно. Соотношение АсАТ/АлАТ через 28 дней после применения полипарацита достигло уровня здоровых животных – 1,39 – 1,59.

Таблица 2 – Динамика активности ферментов сыворотки крови после применения полипарацита при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта телят

Дни исследо- ваний	Полипарацид в дозе, мг/кг жи- вой массы		Контроль зараженный	Контроль не зараженный
	75	50		
Аспаратаминотрансфераза, ммоль/(ч-л)				
до дачи препарата	61,23±6,23	69,02±4,12	65,12±4,57	30,07±3,36
через 7 дней	51,36±4,12	51,33±3,06	64,09±7,12	30,12±5,21
14	44,12±4,26**	49,99±2,39**	71,23±6,19	33,19±2,16
28	41,92±7,39	44,51±5,06	63,12±7,24	36,01±4,33
62 дня	39,91±3,39	40,23±4,96	53,67±6,22	31,97±2,22
Аланинаминотрансфераза, ммоль/(ч-л)				
до дачи препарата	28,52±2,18	29,71±2,04	26,37±2,83	21,66±2,20
через 7 дней	23,84±2,27	24,95±1,37	29,95±2,27	22,19±2,99
14	24,95±1,96**	26,66±1,45**	34,63±1,57	21,88±0,65
28	27,20±0,76	28,53±1,31	30,24±1,69	22,51±1,12
62 дня	28,57±2,32	30,20±1,66	31,97±1,13	22,89±2,07
Щелочная фосфатаза, ммоль/(ч-л)				
до дачи препарата	177,71±14,54	168,74±14,07	205±22,21	147,62±11,85
через 7 дней	186,61±4,41**	176,71±22,33*	235,7±15,55	134,44±19,38
14	188,02±7,62**	192,19±10,18*	258,86±22,59	153,91±12,36
28	215,35±15,29	210,06±6,32	221,42±14,59	164,49±10,59
62 дня	198,0±16,48	198,87±7,57	220,56±18,25	147,91±14,84

Примечание –*P<0,05; ** P<0,01

В динамике сывороточной щелочной фосфатазы после применения полипарацита прослеживалось незначительное повышение ее концентрации на 28-й день наблюдений по отношению к фоновым значениям. Однако если сравнивать уровень щелочной фосфатазы с данными у инвазированных животных, то у телят обеих опытных групп оно было достоверно ниже на 27,36% и 25,75% ($P<0,05$) на 7-14 день и достоверно выше чем у здоровых телят на 22,16-38,8% ($P<0,05-0,01$).

Результаты исследований минерального обмена у инвазированных телят после применения полипарацита представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Динамика содержания микро- и макроэлементов в сыворотке крови телят при применении полипарацита при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта

Дни исследований	Полипарацид в дозе, мг/кг живой массы		Контроль зараженный	Контроль не зараженный
	75	50		
Железо, мкмоль/л				
до дачи препарата	10,96±1,20	12,61±1,05	10,19±0,83	24,99±0,87
через 7 дней	20,93±1,99** *	20,81±1,52***	10,15±1,24	23,96±1,67
14	24,18±1,30** *	18,91±1,19***	10,23±0,99	25,79±0,84
28	17,23±2,62*	15,57±1,53**	9,53±0,97	26,62±1,37
62 дня	15,71±0,86*	13,68±1,92	11,16±1,29	23,59±0,86
Кальций, ммоль/л				
до дачи препарата	1,91±0,11	1,92±0,14	1,62±0,39	2,81±0,25
через 7 дней	2,14±0,07	2,05±0,19	1,87±0,44	2,86±0,17
14	2,68±0,13***	2,50±0,12**	1,92±0,12	2,71±0,18
28	2,54±0,06*	2,35±0,09	2,08±0,3	2,91±0,26
62 дня	2,42±0,10***	2,41±0,07***	1,89±0,3	2,83±0,14
Фосфор, ммоль/л				
до дачи препарата	1,85±0,17	1,83±0,13	1,69±0,22	2,19±0,13
через 7 дней	2,16±0,09	2,18±0,09	1,90±0,18	2,24±0,10
14	2,40±0,16	2,05±0,22	1,93±0,15	2,04±0,16
28	2,19±0,12	2,28±0,14	1,77±0,13	2,33±0,14
62 дня	2,06±0,11	2,00±0,16	1,93±0,29	2,26±0,10
Магний, ммоль/л				
до дачи препарата	0,55±0,15	0,76±0,11	0,68±0,16	1,38±0,11
через 7 дней	0,67±0,06	0,86±0,15	0,7±0,15	1,45±0,38
14	0,83±0,19	0,69±0,09	0,6±0,23	1,31±0,17
28	1,06±0,15**	0,81±0,13*	0,46±0,05	1,45±0,11
62 дня	0,73±0,12	1,03±0,22	0,95±0,13	1,47±0,12

Примечание – * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

Из таблицы 3 видно, что уровень железа в сыворотке крови телят опытных групп с 7 по 28 день исследований статистически достоверно возрос. Максимальное количество его отмечалось на 14 день после применения полипарацита в дозе 75 мг/кг живой массы, что в 2,36 раза ($P<0,001$) выше уровня у инвазированных телят.

Содержание кальция в крови телят увеличилось в 1,39 и в 1,27 раз ($P<0,001$) на 14 и 62 день после применения полипарацита в дозах 75 и 50 мг/кг живой массы, соответственно.

Повышения содержания фосфора в сыворотке крови телят обеих опытных групп после применения полипарацита в терапевтических дозах было не достоверным.

Через 62 дня после применения полипарацита в дозе 50 мг/кг живой массы соотношение кальция к фосфору приблизилось к показателям интактных животных – $1,25\pm 0,10:1$.

Содержание магния в сыворотке крови телят увеличилось на 28 день после применения полипарацита в дозах 75 и 50 мг/кг живой массы в 2,3 раза ($P<0,01$) и 1,76 раза ($P<0,05$) соответственно, по отношению к инвазированным животным.

Контрольное гельминтологическое исследование показало, что телята полностью освободились от желудочно-кишечных паразитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При спонтанных паразитозах телят – гельминтозах желудочно-кишечного тракта в сочетании с балантидиями, эймериями и криптоспоридиями - в организме животных наблюдаются значительные изменения обменных процессов: снижение уровня общего белка, лейкоцитов, эозинофилия, изменение содержания количества Т- и В-лимфоцитов, иммуноглобулинов, активности ферментов и минеральных веществ.

После применения полипарацита основные изменения в гомеостазе организма инвазированных телят происходили на 7-14-28 день наблюдений.

Содержание общего белка в сыворотке крови телят достоверно восстановилось до уровня интактных животных на 14-28-й день, альбуминов, альфа- и гамма-глобулинов, активность аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы и щелочной фосфатазы - на 7-14 день.

Содержание железа и кальция после применения полипарацита инвазированным телятам в течение всего периода наблюдений было на достоверно более высоком уровне с 7-го дня исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1 Даугалиева, Э.Х. Иммунный статус и пути его коррекции при гельминтозах сельскохозяйственных животных/ Э.Х. Даугалиева, В.В. Филиппов. – Москва: ВО «Агропромиздат», 1991. – С. 120 – 127.

2 Березовський, А.В. «Лікарські препарати нового покоління для ветеринарної медицини/ А.В.Березовський. – Київ: Ветінформ, 2000. – С. 28 – 29.

3 Даугалиева, Э.Х. Иммунобиологическая реактивность сельскохозяйственных животных при гельминтозах/ Э.Х.Даугалиева, В.И. Колесников, С.В. Новицкий// Ставрополь, 1997. – С. 92– 95.

4 Красочко, П.А. Болезни сельскохозяйственных животных / П.А. Красочко, М.В.Якубовский, А.И. Ятусевич [и др.]// под ред. П.А. Красочко. – Минск: Бизнесофсет, 2005.– С. 293 – 311.

5 Якубовский, М.В. Резистентность паразитических организмов к лекарственным препаратам и пути ее профилактики/ М.В.Якубовский // «в» Ж. эпизоотол., иммунобиол., фармакология и санитария. – 2004. – № 1. – С. 37 – 39.

Степанова Е.А., кандидат ветеринарных наук
Якубовский М.В., доктор ветеринарных наук, профессор
Мясцова Т.Я., кандидат ветеринарных наук, доцент

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

КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГИПОДЕРМАТОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Изучение вопросов по иммунитету при паразитарных заболеваниях животных давно привлекает внимание ученых, так как знание механизма иммунологической перестройки, происходящей в организме хозяина, - необходимое условие для разработки противопаразитарных вакцин. Исследования, проведенные в последние 30 лет, показали, что антигены, полученные от паразитов на разных стадиях их развития, вызывают в организме животных ту или иную степень защиты (Richard M. 1977, 1982, 1986; Косминков Н.Е., 1986, 1991; Гламаздин И.Г., 1990; В.К. Бережко, 1994; Э.Х. Даугалиева, К.Г. Курочкина, 1996; Е. Кленова, 1999 и др.). Полученные данные способствовали разработке методов и средств для специфической иммунопрофилактики паразитозов животных, основанных на использовании различных антигенных компонентов.

Имеющиеся сообщения об успешном применении биопрепаратов против цистицеркозов животных, стронгилоидоза, диктиокаулеза телят, ценуроза (Leid R.W., Williams I.F., 1975; Richard M.D., 1972-1982; Osborn P.J., Heath D.D., Roberts M.G., 1982; Harris A., Heath D.D. et al., 1987; Э.Х. Даугалиева, 1991; Ю.А. Ватников, 1993; Якубовский М.В. с соавт., 1994, В.К. Бережко, 1994; Н.С. Шумова, 1995; Н.Е. Косминков, 1986-1998; К.Г. Курочкина, 1999 и др.) показывают перспективность данного направления борьбы и профилактики паразитозов животных.

Велись работы по созданию вакцин против нематодозов сельскохозяйственных животных. Например, изучалась возможность создания вакцины для профилактики аскаридоза свиней. Так Galloway Reginald B. и Shumard Raymond F. в 1970 г. запатентовали способ приготовления вакцины из культивируемых личинок *Ascaris suum*.

Также проводились работы по созданию вакцин против других нематод. D. Malthus (1979) сконструировал и испытал вакцину, которая показала высокую профилактическую эффективность против нематодозов овец. W.D. Smith с соавт. (1982), Soekardji L. с соавт. (1983) и V. K. Srivastava с соавт. (1987) применяли для иммунизации овец вакцины из облученных личинок остертагий, гемонхов и буностом.

Сотрудниками РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им.

С. Н. Вышелесского» Национальной академии наук Беларуси (М.В. Якубовский с соавт., 1994) создана вакцина против стронгилоидоза крупного рогатого скота. В лабораторных и производственных условиях установлено, что протективная эффективность вакцины на основе неполного адьюванта Фрейнда составила 79,13%, а на основе гидроокиси алюминия— 75,66%. При определении наличия антител у вакцинированных животных в ИФА регистрировалось превышение оптической плотности у иммунизированных животных в 1,8-2,2 раза по сравнению с неиммунизированными животными.

Активные работы велись и по разработке вакцины против диктиокаулеза. George Urquhart с соавт (1960), M.G. Taylor (1981) сообщают о высокой эффективности вакцины «Dictol» (в качестве антигена использованы ослабленные облучением личинки стадии *Dictyocaulus viviparus*). В настоящее время данная вакцина известна под названием Bovilis® Huskvac.

В связи с острой необходимостью в промышленном птицеводстве вакцины против эймериоза, начиная с 80-х годов прошлого века постоянно велись работы в этом направлении. Вакцина «Иммукокс®» появилась на рынке в 1985 году. В настоящий период вакцина «Иммукокс®» применяется более чем в 40 странах, включая США. «Иммукокс®» живая вакцина, изготовленная из аттенуированных штаммов эймерий, предназначенная для вакцинации индеек и способствующая установлению иммунитета против эймерий. «Паракокс» (Parasox) живая вакцина против эймериоза цыплят. Вакцина выработана из аттенуированных спорулированных эймерий птиц. В некоторых странах удельный вес вакцинации птицы против эймериоза достигает 90%. В состав таких вакцин, как «Кокцивак», «Культура кокцидий ВНИВИП», «Иммукокс», входят возбудители эймериоза с естественной вирулентностью.

Frank Katzer с соавт. (2011г.) сообщает о высокой эффективности вакцины против токсоплазмоза овец «Toxovax» (MSD Animal Health), содержащей в своем составе в качестве антигена ослабленные *Toxoplasma gondii*.

Для вакцинопрофилактики пироплазмоза фирма «Merial» выпустила вакцину «Пиродог» (Pirodog), которая изготовлена из антигена к *Babesia canis*. Вакцина «Пиродог» вызывает выработку иммунитета против пироплазмоза собак. Полноценный иммунитет сохраняется в течение 6 месяцев.

«Nobivac Piro» (Нобивак Пиро) - инактивированная вакцина против бабезиоза собак, вакцина индуцирует формирование иммунного ответа через 3 недели после двухкратной инъекции.

Описаны также примеры создания вакцин против цестодозов. Есть сведения о применении для вакцинации против эхинококкоза и цистицеркоза животных секретов и экскретов этих гельминтов (А.С.Бессонов, В.Б.Ястреб, 1987; Д.Kumar et al., 1987). R.P. Herd с соавт. (1975) сообщает о сокращении числа гельминтов, об уменьшении выделения яиц во внешнюю

среду, а также о сокращении числа члеников при применении вакцины против эхинококкоза у собак на 21 день после вакцинации. Р. J. Osborn с соавт. (1982) указывал на эффективность вакцины против эхинококкоза ягнят при использовании в качестве антигенов инкубированных *in vitro* онкосфер эхинококков.

Велись работы по созданию вакцин против шистосомоза, фасциолеза и анкилостомоза с использованием личинок этих паразитов (E. James et al., 1985; S. Jouniz, 1986).

В настоящее время отмечается большой интерес к результатам вакцинации против различных паразитозов сельскохозяйственных животных.

Гиподерматоз крупного рогатого скота остается актуальной проблемой для сельского хозяйства Беларуси. Согласно нашим исследованиям в 2003-2013 гг. средняя инвазированность животных личинками *H. bovis* составила $1,63 \pm 0,24\%$, в том числе в 2013 г. - $1,31\%$ (с максимальным уровнем заражения коров в июне-июле $2,61-3,63\%$).

Ежегодно профилактическими обработками против личинок подкожного овода охватывается более 1,2–1,5 млн. голов крупного рогатого скота, расходуя на эти цели значительные денежные средства, что отрицательно сказывается на себестоимости животноводческой продукции, снижается иммунный статус организма животных, так как практически все противопаразитарные препараты являются иммунодепрессантами.

Целью нашей работы являлась разработка вакцины для профилактики гиподерматоза крупного рогатого скота.

На первом этапе нами был проведен подбор компонентов и приготовлен цельный антиген из личинок подкожного овода для конструирования вакцины, изучена его активность.

Исходный материал (личинки *Hypoderma bovis* II и III стадий в количестве 200 г) отобрали при убое больных гиподерматозом животных на мясокомбинатах республики.

С целью изучения специфической активности полученного антигена в различных разведениях применили метод иммунодиффузии с сыворотками крови здоровых и инвазированных личинками подкожного овода животных. РИД ставили на стекле 9x12 см в 1% агаре Difco в лунках диаметром 5 мм. После 96 часов инкубации пластинку отмывали 6% раствором хлористого натрия, высушивали и окрашивали 0,5% раствором амидочерного 10В.

Установлено, что полученный антиген обладает высокой активностью в РИД (1:8).

При подборе адьюванта учитывалось, что он должен обеспечить эффективность (сильный иммунный ответ, кратковременный и/или продолжительный, гуморальный и/или клеточный).

Подбор наиболее эффективного адьюванта при конструировании вакцины провели на белых мышах. Для чего сформировали 3 группы белых

мышей по 5 голов в каждой. Испытали следующие адъюванты: эмульсиген (50:50%) и Montanide ISA 70 (30:70%).

Образцы компонентов вакцины с различными адъювантами вводили мышам подкожно в дозе 0,2 мл дважды с интервалом 14 дней.

Через 21 день после второго введения компонентов животных тотально обескровили, получили сыворотку и определили уровень антител в РИД (таблица 1).

Таблица 1–Титр антител при подборе адъювантов при конструировании вакцины против гиподерматоза

Группы животных	Адъювант	Количество мышей в группе, голов	Титр антител, ($\log_2$)
Опытная группа № 1	Montanide ISA70	5	3,0
Опытная группа № 2	Эмульсиген	5	0
Контрольная группа	—	5	0

В результате всестороннего изучения различных адъювантов, исходя из соображений их стоимости, безвредности, реактогенности, технологичности использования, для изготовления вакцины против гиподерматоза крупного рогатого скота были подобраны адъюванты типа «вода в масле» компании Seppic (Франция) Montanide ISA 70.

Отработку оптимальной иммунизирующей дозы вакцины и кратности ее применения проводили в 2 этапа.

На первом этапе были сформированы 7 групп белых мышей по 5 голов в каждой. Мышам была введена вакцина подкожно двукратно в различных дозах и с различным интервалом между введениями.

Через 21 день после второго введения вакцины животных тотально обескровили, получили сыворотку и определили уровень антител в РИД. Установлено, что оптимальной дозой вакцины для мышей является 0,2 мл при двукратном введении с интервалом в 21 день. При этом титр антител составляет 6,0 $\log_2$.

Далее для отработки оптимальной иммунизирующей дозы и кратности применения приготовленной вакцины сформировали 9 групп кроликов. Кроликам введена вакцина подкожно двукратно в различных дозах и с различным интервалом между введениями.

Через 21 день после второго введения вакцины животных тотально обескровили, получили сыворотку и определили уровень антител в РИД.

Установлено, что наиболее экономически обоснованной и оптимальной дозой вакцины для кроликов можно считать дозу в 2,0 мл/гол.

при двукратном введении с интервалом в 21 день. При этом титр антител составляет $6,0 \log_2$.

Стерильность вакцины установили путем посева на МПБ, МПА, среде Сабуро и Китта-Тарощи в соответствии с ГОСТ 28085-89 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности». Рост микроорганизмов и грибов в течение 10 суток не наблюдался. Таким образом, установлено, что образец вакцины является стерильным.

Безвредность и реактогенность полученного образца вакцины из личинок подкожного овода для профилактики гиподерматоза крупного рогатого скота определили путем введения вакцины 10-ти белым мышам массой 18-20 г в дозе 0,8 мл. Животным контрольной группы (10 голов) ввели 0,8 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Наблюдение за животными вели в течение 10 дней после введения препарата.

В результате исследований установлено, что полученная вакцина безвредна для лабораторных животных, внешних признаков угнетения и гиперемии на месте введения вакцины не наблюдалось. За период наблюдения не было отмечено повышения температуры тела и уплотнений на месте введения вакцины. После проведения убоя при патологоанатомическом исследовании изменений в месте введения препарата, а также видимых патологических изменений со стороны внутренних органов и полостных систем у опытных и контрольной групп выявлено не было.

На основании проведенных исследований была разработана и утверждена программа испытаний эффективности вакцины для профилактики гиподерматоза крупного рогатого скота с временной инструкцией по применению вакцины.

На следующем этапе провели лабораторные испытания вакцины для профилактики гиподерматоза крупного рогатого скота.

Для определения безвредности и реактогенности вакцины для крупного рогатого скота и изучения его влияния на клиническое состояние коров на МТФ «Дуличи» КСУП «ППЗ Белорусский» Минского района сформировали 2 группы коров по 5 голов в каждой. Коровам опытной группы ввели экспериментальный образец вакцины внутримышечно в область крупа в дозе 5,0 мл на голову двукратно с интервалом 14 день. Коровам контрольной группы ввели по 5,0 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида.

Клиническое наблюдение за животными проводили в течение 30 дней. При этом исследовались общие клинические показатели, термометрия и реакция на месте введения вакцины, состояние поедаемости кормов, продуктивность.

Установлено, что у всех животных опытной группы температура тела на месте введения вакцины соответствовала показателям физиологической нормы для крупного рогатого скота, поедаемость кормов была хорошая, на месте введения вакцины у 3 животных была незначительная припухлость в

виде горошины, которая исчезла через 4-5 суток.

Исследования по отработке оптимальных доз вакцины для профилактики гиподерматоза крупного рогатого скота провели на коровах в хозяйствах Минского района. Для чего сформировали 9 групп животных (живой массой более 150 кг) по 5 голов в каждой. Коровам 1-й опытной группы ввели вакцину внутримышечно в области крупа в дозе 1,0 мл на голову двукратно с интервалом 14 дней. Коровам 2-й группы ввели вакцину внутримышечно в области крупа в дозе 2,0 мл на голову двукратно с интервалом 14 дней, 3-й группы - в дозе 3,0 мл на голову двукратно с интервалом 14 дней, 4-й группы - в дозе 5,0 мл на голову двукратно с интервалом 14 дней. Коровам 5-й группы ввели вакцину внутримышечно в области крупа в дозе 1,0 мл на голову двукратно с интервалом 21 день, 6-й группы - в дозе 2,0 мл на голову двукратно с интервалом 21 день, 7-й группы - в дозе 3,0 мл на голову двукратно с интервалом 21 день, 8-й группы - в дозе 5,0 мл на голову двукратно с интервалом 21 день. Животным контрольной группы ввели по 5,0 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Через 21 день после второго введения вакцины у животных была взята кровь для определения уровня антител в РИД.

Установлено, что оптимальной дозой вакцины для крупного рогатого скота является 3 мл на животное при двукратном введении с интервалом в 21 день. При этом титр антител составил $2,80 \pm 0,37 \log_2$. При увеличении объема до 5,0 мл отмечается припухлость на месте введения вакцины, проходящая на 4-5 день.

В 2012-2013 гг. определение эффективности вакцины для профилактики гиподерматоза крупного рогатого скота провели на МТФ «Дуличи» КСУП «ППЗ Белорусский отделение Чачково» Минского района. Установлено, что применение вакцины против гиподерматоза крупного рогатого скота при двукратной иммунизации в дозе 3 мл вызывает выработку специфических антител в сыворотке крови у 76,7% животных. Получен патент № 16754 на «Вакцину для профилактики гиподерматоза крупного рогатого скота, способ ее получения и способ применения».

ВЫВОДЫ

1 Сконструирована вакцина для профилактики гиподерматоза крупного рогатого скота.

2 Полученный биологический препарат стерилен, иммуногенен и безвреден для животных (у животных может наблюдаться местная реакция на введение вакцины, в виде образования незначительной припухлости, которая исчезает через 4-5 суток).

3 Установлено, что применение вакцины вызывает выработку специфических антител в сыворотке крови у 76,7% животных.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Грунин, К.Я. Подкожный овод (Hypodermatidae)/ К.Я. Грунин // Фауна СССР.– М., 1962.– 237 с.
- 2 Cox, F.E. Designer vaccines for parasitic diseases/ Cox F.E. // Int J Parasitol.– 1997.– Vol. 27.– P. 1147–1157.
- 3 Knox D.P. Parasite vaccines - recent progress and problems associated with their development/ Knox D.P., Redmond D.L.// Parasitology.–2006; Vol. 133.–P.1–8.
- 4 Lightowers, M.W. Cestode vaccines. origins, current status and future prospects/ Lightowers M.W. // Parasitology.–2006.–Vol. 133.– P. 27–42.
- 5 Loukas, A. Vaccination with recombinant aspartic hemoglobinase reduces parasite load and blood loss after hookworm infection in dogs/ Loukas A, 6 Bethony JM, Mendez S, et al.// PLoS Med.– 2005.–Vol. 2.– 295 p.
- 6 McManus, D.P. Current status of vaccines for schistosomiasis/ McManus D.P., Loukas A.// Clin Microbiol Rev.–2008.– Vol. 21.– P.225–242.
- 7 Murray, L. Expression and purification of an active cysteine protease of *Haemonchus contortus* using *Caenorhabditis elegans*/ Murray L., Geldhof P., Clark D., Knox D.P., Britton C.// Int J Parasitol.– 2007.– Vol. 37.– P.1117–1125.
- 8 Newton, S.E., The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*/ Newton S.E., Munn E.A. // Parasitol Today.– 1999.– Vol. 15.– P.116–122.
- 9 Rick L Tarleton. New approaches in vaccine development for parasitic infections/ Rick L Tarleton // Cellular Microbiology.–2005.–Vol. 7 (10).– P. 1379–1386.
- 10 Willadsen P. Vaccination against ectoparasites/ Willadsen P.// Parasitology.–2006.– Vol. 133.–P. 9–25.
- 11 Willadsen, P. Anti-tick vaccines / Willadsen P. // Parasitology.–2004.– Vol.129.–P.367–387.

Темный Н.В., кандидат ветеринарных наук

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

ОТРИЦАТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ ПРИ ПОГОЛОВНОЙ ДЕГЕЛЬМИНТИЗАЦИИ ДОЙНЫХ КОРОВ И ПУТИ ЕГО ПРЕОДОЛЕНИЯ

ВВЕДЕНИЕ

В лесостепной зоне Украины молочное скотоводство, в значительной мере, представлено крестьянско-фермерскими хозяйствами с поголовьем от 100 до 300 и личными подсобными хозяйствами граждан от 1 до 5 дойных коров с пастбищно-стойловым их содержанием. Интенсивное использование природных пастбищ способствует инвазированию скота различными видами эндопаразитов системы пищеварения и дыхания [8]. Убытки отрасли скотоводства, преимущественно от смешанных гельминтозов, приводят к весомым потерям мясной и молочной продуктивности, снижению репродуктивной функции у животных [1].

Основным направлением в борьбе с гельминтозами КРС остается применение антгельминтных препаратов широкого спектра действия группы- бензимидазолов, макроциклических лактонов, имидазотиазола и препаратов, у которых активно действующим веществом является клозантел [7]. Недостатками отдельных из указанных препаратов является их свойство угнетать функции иммунной системы и органов пищеварения, нарушать обмен веществ в организме, а также продолжительно, от 7 до 20 суток, выделяться с молоком в форме активных метаболитов, что создает пищевую опасность [2, 3, 6, 10].

Многие исследователи, а также данные наших многолетних наблюдений свидетельствуют о том, что ветеринарные специалисты в условиях производства часто проводят как вынужденные, так и профилактические дегельминтизации дойного поголовья КРС без анализа эпизоотологического мониторинга по наличию эндопаразитов, физиологического состояния животного, учета свойств препаратов относительно продолжительности выделения метаболитов с молоком после обработки. Всё это требует усовершенствования системы интегрированного контроля за гельминтозами, суть которой заключается в применении комплекса различных мер борьбы (химических, биологических, зоотехнических и т.п.) с минимальным использованием противогельминтных препаратов [5, 9].

Цель нашей работы – поиск новых подходов в борьбе с гельминтозами с возможно меньшим использованием антгельминтных препаратов для ко-

ров дойной группы. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- определить степень результативности выявления в стаде инвазированных животных традиционными копроскопическими методами;
- изучить влияние дегельминтизации на уровень удоев.

МАТЕРИАЛЫ МЕТОДЫ

Исследования проводили на четырех молочных фермах где ветеринарные врачи, согласно плану противоэпизоотических мероприятий, выполняли дегельминтизацию коров дойного стада имеющимися в хозяйстве препаратами. Материалом для исследований служили пробы фекалий от коров, а также данные первичного хозяйственного учета надоя молока за 4, 5, 6, 7, 8 дней до и после дачи препаратов.

Эффективность выявления количества инвазированных коров осуществляли путем сравнительного анализа копроскопических исследований проб фекалий от 10 % наличного поголовья в опытной группе согласно общепринятым требованиям и результатам индивидуального обследования животных данной группы.

В каждом из четырех хозяйств с поголовьем не менее 200 дойных коров, где регистрировали смешанную инвазию стронгилятами пищеварительного канала и дикроцелиями или моноинвазию, по принципу аналогов сформировали две группы животных по 50 голов в каждой.

От коров этих групп (от 10 % животных) в начале выборочно отбирали пробы фекалий для исследования с использованием метода Котельникова-Хренова (1984) и последовательных промываний [4]. Затем от каждой коровы второй группы индивидуально отбирали пробы фекалий и повторно исследовали вышеуказанными методами. Всем коровам первой группы и только инвазированным гельминтами животным второй группы, в рекомендованной производителем дозе применяли препараты, традиционно используемые в конкретно взятом хозяйстве: в хозяйство № 1 применили Комбитрем, действующее вещество (д/в) альбендазол + триклабендазол (Украина); № 2 – Альбендазол 10% (Украина); № 3 – Роленол, д/в клосантел (Испания); № 4 – Бронтел, д/в клосантел (Украина). Экономическую эффективность определяли по общепринятым методам.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты выборочного копроскопического исследования проб фекалий от 10% коров и результаты индивидуального обследования всех животных опытных групп приведены в таблице 1. Полученные нами результаты свидетельствуют о более высокой результативности индивидуального копроскопического обследования животных, при котором выявлено от 6 до 33 положительных проб, больше по сравнению с показателями в группе при исследовании проб выборочно отобранных от 10% животных. Показатели валового надоя по хозяйству до и после дачи антгельминтных препаратов представлены в таблице 2.

Таблица 1– Количество выявленных инвазированных коров (n=50)

№ хозяй- ства	1 группа			2 группа			(+) или (-) выявленных положи- тельных проб относи- тельно к первой группе
	исследо- вано выборо- чно 10%	выявлено, проб (%)		иссл. инди- -вид. 100%	выявлено, проб (%)		
		к-во проб	дикро- целии		строн- гиляты	к-во проб	
1	5	—	3(60)	50	—	36(72)	+ 33
2	5	5(100)	5(100)	50	6(12)	25(83)	+ 21
3	5	2(40)	5(100)	50	7(14)	15(30)	+ 15
4	5	—	—	50	1(2)	5(10)	+ 6

Таблица 2– Динамика валового надоя молока до и после дегельминтизации коров (n=50)

начало наблю- дений	№ хо- зяйст ва	удой (л) до дегельминтизации				
		сутки				
		4	5	6	7	8
09.10.2010	1	2853	3462	4156	4636	5149
05.11.-2012	2	2185	2735	3266	3778	4279
23.02.2013	3	4367	5431	6468	7514	8446
22.03.2013	4	2235	2805	3379	3955	4536
удой(л) после дегельминтизации (± л относительно показателя до обработки)						
18.10.2010	1	2493 (-360)	3117(-345)	3756(-400)	4425(-211)	5017(-132)
14.11.-2012	2	2121(-64)	2670(-65)	3221(-45)	3755(-23)	4289(+10)
02.03.2013)	3	4277(-90)	5338(-93)	6439(-32)	7535(+21)	8653(+207)
01.04.2013	4	2065(-170)	2576(-229)	3099(-278)	3618(-337)	4103(-433)

Установлено, что после дачи препарата в течение первых 4 суток валовой надой молока у животных во всех четырёх хозяйствах уменьшился: в хозяйстве № 1 на 13%, №2 и №3 на 3%, № 4 на 8%. На восьмые и седьмые сутки после дегельминтизации в хозяйстве №2 и №3, соответственно, показатели надоев были выше таковых показателей до дегельминтизации на 10 и 21 литр. В первом хозяйстве за восемь суток наблюдалась незначительная тенденция к восстановлению отдачи молока, тогда как в четвертом показатели имели тенденцию к дальнейшему снижению. Очевидно в этих хозяйствах имели место и другие дополнительные стресс факторы. Установлено, что хозяйство №2 за семь суток и №3 за шесть суток после дачи препарата недополучили молоко на сумму 15,52 и 21,74 гривны от одной коровы соответственно. Убытки от разницы стоимости молока низкого сорта, которое, согласно наставлению, двое суток после дачи альбендазола (хозяйство №2) и 10 дней после применения роленола (хозяйство №3) не подлежит использованию в пищу людям, составили 233 гривны и 1565 гривен соответственно в расчете на одну в корову.

Для дегельминтизации только пораженных коров второй группы использовано антигельминтных препаратов в хозяйстве № 1, 2, 3 и 4 в 1,3; 1,6; 2,27 и 8,7 раза меньше, что позволило предупредить снижение валового надоя молока на 2,25-3 %, убытки от стоимости недополученного молока в 4,1 раза, а не сортового в 6,7 раз больше от одной коровы за сутки по сравнению с применением антигельминтиков всему поголовью первой группы.

Следовательно, можно сделать вывод, что в системе мероприятий интегрированной защиты животных от возбудителей гельминтозных заболеваний ключевое значение принадлежит эпизоотологическому мониторингу, по результатам которого необходимо проводить выборочную дегельминтизацию именно пораженных животных. При этом важно учитывать интенсивность инвазии и структуру паразитоценоза, физиологическое состояние и продуктивность животного и, следовательно, целесообразность применения антигельминтного препарата той или иной групп.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты наших исследований свидетельствуют о том, что индивидуальное копроскопическое обследование коров дойного стада, является экономически обоснованным для внедрения в систему интегрированной защиты жвачных животных от возбудителей основных гельминтозов.

ЛІТЕРАТУРА

1 Березовський, А.В. Екологічні проблеми сучасної паразитології / А.В. Березовський // Науковий вісник Національного аграрного університету Вип. 98.– К., 2006.– С.19 – 26.

2 Березовський, А.В. Особливості стратегії і тактики дегельмінтизації свійської худоби / Березовський, А.В. // Ветеринарна медицина України № 5, 2007. – С. 27 – 30.

3 Веселий, В. А. Дослідження ембріотоксичних та тератогенних властивостей ресинтезованого альбендазолу /В. А. Веселий // Ветеринарна медицина : міжвід. темат. наук. зб.– Х., 2003.– Вип. 81.– С. 68 –72.

4 Котельников, Г.А. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды / Г.А. Котельников.– М.: Изд-во «Колос», 1984.– 207 с.

5 Кузьміна, Т.А. Концепція інтегрованого контролю стронгілятозів коней в Україні / Т.А.Кузьміна, К.А. Слівінська, Г.М. Двойнос // Науковий вісник Національного аграрного університету.– Київ, 2006.– Вип. 98.– С. 96–99.

6 Равилов, А.З. Экологические проблемы ветеринарной медицины / А.З. Равилов, Н.Ш. Хусаинов // Ветеринария.– 1997.– № 8, – С. 9 –12.

7 Распространение и экономический ущерб от основных гельминтозов жвачных животных/ Р.Т. Сафиуллин // Ветеринария. –1997.– № 4.– С. 28–32.

8 Темний, М.В. Результати епізоотологічного моніторингу основних гельмінтозів великої рогатої худоби і свиней / М.В. Темний, С.В. Павленко, Л.І. Луценко та інші // Вісник аграрної науки.– К., 2008. – С. 40–42.

9 Черепанов, А.А. Новое в теории противопаразитарных мероприятий / А.А. Черепанов, Л.А. Перова // Ветеринария.–1999.– № 6.– С. 31–33.

10 Щурова, Н.Ю. Особенности иммунитета и химиотерапия фасциоза крупного рогатого скота: Автореф дисс. канд. вет. наук. 03.00.19 / Н.Ю. Щурова / РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесесского»/, – Минск, 2008. – 21с.

Якубовский М.В., доктор ветеринарных наук, профессор
Кузьминский И.И., кандидат ветеринарных наук

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

ВЛИЯНИЕ СТРОНГИЛЯТ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА НА ИММУНИТЕТ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ ТИМАЛИНА И АЛЬВЕОЗАНА

В инвазионной патологии крупного рогатого скота особое значение имеют представители нематод подотряда Strongylata. При этом стронгилятозы желудочно-кишечного тракта являются наиболее распространенными гельминтозами. Стронгилятозами болеют все виды диких и домашних копытных животных.

Возбудителями стронгилятозов желудочно-кишечного тракта являются нематоды, которые относятся к родам Cooperia, Hemonhus, Trichostrongilus, Oesophagostomum, Ostertagia, Chabertia, Bunostomum, Nematodirus и др.

Как правило, эти инвазии протекают в ассоциациях, что обуславливает более тяжелое течение болезни и значительный экономический ущерб хозяйствам. Клинические признаки у молодняка при стронгилятозах чаще всего проявляются у животных в конце лета и осенью. При сильном заражении возможен летальный исход болезни. У коров стронгилятозы, как правило, протекают субклинически, нанося серьезный ущерб животноводству из-за снижения качества и количества получаемой продукции.

Распространение стронгилятозов желудочно-кишечного тракта в Республике Беларусь. В период с 2009 по 2011 год нами была изучена эпизоотическая ситуация по стронгилятозам желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота в Республике Беларусь. При этом было обследовано поголовье в 14 хозяйствах Минской, Гомельской и Могилевской областей.

Установлено, что в Минской области экстенсивность инвазии стронгилятами у крупного рогатого скота составляет 27,24 %, Гомельской области – 21,53 % и Могилевской области – 13,90 %. При этом экстенсивность коров стронгилятами желудочно-кишечного тракта в хозяйствах Минской области составила 44,77 %, Гомельской и Могилевской областей – 29,74 % и 10,94 % соответственно.

У коров были выделены кооперии – у 45,81 %, гемонхи – у 29,11 %, трихостронгилы – у 23,95 %, эзофагостомы – у 1,10 % и хабертии – у 0,03 %.

Также было установлено, что среднее их количество в 10 г фекалий составило $42,22 \pm 12,43$ экземпляров, а максимальное – 1523 экземпляра.

При этом личинок кооперий было выделено $19,29 \pm 3,68$ экземпляров, гемонхов – $12,36 \pm 2,11$, трихостронгилов – $10,10 \pm 1,27$, эзофагостом – $0,46 \pm 0,04$.

Что касается сезонной динамики зараженности коров личинками стронгилят желудочно-кишечного тракта, то весной она составила 27,36 %, а наибольшей была летом и осенью – 60,35 % и 62,16 % соответственно, к зиме начала снижаться и составила 43,26 % от обследованного поголовья.

Иммунитет при стронгилятозах желудочно-кишечного тракта.

При инвазии гельминтами в организме хозяина развиваются различные взаимосвязанные процессы. Наблюдается сочетание активизации иммунного ответа с аллергическими реакциями, которые развиваются в результате сенсибилизации организма продуктами жизнедеятельности гельминтов, а также продуктами распада поврежденных тканей хозяина. Проявлением аллергии является эозинофилия, которая при гельминтозах рассматривается как специфический показатель. Это в свою очередь отрицательно влияет на общую резистентность организма.

Нами в сравнительном аспекте изучалась динамика количества эритроцитов, лейкоцитов, эозинофилов, гемоглобина, Т- и В-лимфоцитов, у коров при ассоциативных стронгилятозах желудочно-кишечного тракта.

Для проведения опыта в ГП «Пуховичское» подбирались коровы по принципу аналогов спонтанно инвазированные стронгилятами желудочно-кишечного тракта, а также свободные от паразитов животные имели одинаковые условия кормления и содержания. В ходе опыта для определения инвазированности животных исследовались фекалии по общепринятым методикам, а также определялись гематологические показатели.

При этом средняя интенсивность заражения коров стронгилятами желудочно-кишечного тракта была $103,45 \pm 18,43$ личинки в 10 г фекалий.

При гематологическом исследовании количество эритроцитов у инвазированных и свободных от стронгилят желудочно-кишечного тракта коров находилось в пределах $4,90 \pm 0,12$ – $4,96 \pm 0,09 \cdot 10^{12}/л$ и достоверных изменений не наблюдалось. При этом уровень лейкоцитов у инвазированных животных был на 10,70 % ($P < 0,01$) выше, чем у здоровых животных и составил $7,76 \pm 0,16 \cdot 10^9/л$, что говорит о наличии воспалительных процессов в организме. Содержание гемоглобина было в пределах $90,40 \pm 3,06$ – $95,10 \pm 2,13$ г/л (таблица 1).

У инвазированных коров наблюдалось повышение уровня эозинофилов в 1,55 раза ($P < 0,001$), что свидетельствует о развитии аллергических процессов в организме. При этом уровень лимфоцитов у инвазированных животных был на 6,31 % ($P < 0,05$) ниже, чем у здоровых коров.

При контакте Т-лимфоцитов с чужеродными антигенами происходит активация Т-лимфоцитов, в результате чего они начинают продуцировать цитокины, которые активируют В-лимфоциты и макрофаги. Кроме того, Т-киллеры непосредственно при контакте с антигеном выделяют лимфокины

(интерфероны, интерлейкины, лимфотоксины), обладающие цитотоксическим действием. При изучении динамики Т-лимфоцитов установлено, что их содержание в крови инвазированных коров в 1,23 раза ($P<0,01$) ниже, чем у здоровых, и составляет $31,0\pm 1,58\%$ (таблица 2). Это свидетельствует о негативном влиянии инвазии на обеспечение клеточного иммунитета.

Таблица 1 – Гематологические показатели у коров, инвазированных и свободных от стронгилят желудочно-кишечного тракта

Показатели	Единицы измерений	Группы животных	
		инвазированные	свободные от стронгилят
эритроциты	$10^{12}/л$	$4,90\pm 0,12$	$4,96\pm 0,09$
лейкоциты	$10^9/л$	$7,76\pm 0,16^{**}$	$7,01\pm 0,14$
гемоглобин	г/л	$90,40\pm 3,06$	$95,10\pm 2,13$
эозинофилы	%	$9,60\pm 0,68^{***}$	$6,21\pm 0,37$
лимфоциты	%	$55,60\pm 0,87^*$	$59,11\pm 0,70$

Примечание—* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

Таблица 2 – Динамика клеточного иммунитета у инвазированных и здоровых коров

Показатели	Единицы измерений	Группы животных	
		инвазированные	свободные от стронгилят
Т- лимфоциты	%	$31,0\pm 1,58^{**}$	$38,21\pm 0,79$
В- лимфоциты	%	$17,40\pm 0,51^{**}$	$19,93\pm 0,71$

Примечание—** $P<0,01$

В-лимфоциты способны распознавать большинство антигенов и представлять их Т-лимфоцитам, благодаря чему они активируются. В-лимфоциты после контакта с антигеном дифференцируются в плазматические клетки, которые вырабатывают антитела. У инвазированных стронгилятами коров уровень В-лимфоцитов был в 1,15 раза ($P<0,01$) ниже, чем у свободных от стронгилят и составил $17,40\pm 0,51\%$.

В отличие от иммунитета при инфекционных заболеваниях иммунитет при гельминтозах имеет особенности, которые обуславливаются сложным строением и развитием гельминтов. Он непродолжителен и не создает полной невосприимчивости к перезаражению, а напряженность его зависит от количества повторных заражений животных, интенсивности инвазии и

др.. Поэтому профилактика инвазированности крупного рогатого скота стронгилятами желудочно-кишечного тракта является актуальной проблемой и от ее решения во многом зависит эффективное развитие животноводства.

Эффективность применения иммуностимуляторов при стронгилятозах желудочно-кишечного тракта. Антигельминтики обладают высокой токсичностью не только для паразитов, но и для животных. Большинство отрицательных явлений, возникающих после применения антигельминтиков, вызвано не только токсическим воздействием на организм самих препаратов, но также воздействием продуктов распада гельминтов. Продукты распада гельминтов оказывают токсическое воздействие на организм, угнетают иммунитет и вызывают аллергические реакции. Наиболее сильные негативные последствия наблюдаются после дегельминтизации при массовой гибели гельминтов. Применение иммуностимуляторов при гельминтозах основано на необходимости восстановления функций иммунной системы и других систем организма.

В начале опыта перед применением иммуностимуляторов интенсивность инвазии у коров составила $16,57 \pm 4,15 - 20,43 \pm 4,30$ экземпляров. При этом было выделено кооперий $7,57 \pm 1,25 - 9,0 \pm 2,70$ экземпляров, гемонхов $1,29 \pm 0,64 - 3,14 \pm 2,01$ и трихостронгилов $6,86 \pm 2,47 - 8,57 \pm 2,13$ экземпляров в пробе фекалий. После применения иммуностимуляторов тималина и альвеозана наблюдалось усиление неспецифического иммунитета.

Уровень Т-лимфоцитов у инвазированных животных находился в пределах $22,71 \pm 1,06 - 23,57 \pm 1,0\%$. В группе, где применялся тималин, по сравнению с контролем наблюдалось увеличение количества Т-лимфоцитов на 14-й день на 25,0% ($P < 0,05$), к 30-му и 60-му дню на 31,20% ($P < 0,01$) и 16,82% ($P < 0,05$) соответственно. У животных, которым применили альвеозан, уровень Т-лимфоцитов повысился на 13,68% ($P < 0,05$). Количество В-лимфоцитов после применения иммуностимуляторов также увеличилось на 30-й день в первой опытной группе (тималин) на 22,82% ($P < 0,05$), во второй (альвеозан) на 20,59% ($P < 0,05$). На фоне активизации иммунных процессов наблюдалось снижение инвазированности животных (таблица 3).

Таблица 3 – Экстенсивность эффективности иммуностимуляторов при стронгилятозах желудочно-кишечного тракта коров

Препараты	Д о з ы п р е п а р а т о в (внутримышечно трехкратно)	После применения препаратов			
		7-й день	14-й день	30-й день	60-й день
Тималин	0,16 мг/кг живой массы	28,57	57,14	71,43	57,14
Альвеозан	4 мкг/кг живой массы	16,67	33,33	33,33	16,67
Инвазированной контроль	-	-	-	-	-

При копроскопическом обследовании животных установлено, что экстенсэффективность тималина на 7 день составила 28,57 %, на 14-й 57,14 % и на 30-й день – 71,43 %. Экстенсэффективность альвеозана на 7 день составила 16,67 %, на 14-й и 30-й день после применения препарата – 33,33 %.

ВЫВОДЫ

1 На территории Республики Беларусь в желудочно-кишечном тракте коров нами выделены ассоциации кооперий, гемонхов, трихостронгил, эзофагостом и хабертий. Наиболее высокая инвазированность коров стронгиятами желудочно-кишечного тракта наблюдается в осенний период (62,16 %), а минимальная – в весенний период (27,36 %).

2 У коров, зараженных стронгиятами, желудочно-кишечного тракта, наблюдается повышение уровня лейкоцитов на 10,70 %, а эозинофилов в 1,55 раза ($P < 0,001$). Содержание Т-лимфоцитов в крови у инвазированных коров снижается в 1,23 раза, В-лимфоцитов – в 1,15 раза.

3 Экстенсэффективность иммуностимулирующих препаратов тималина и альвеозана при стронгиялтозах желудочно-кишечного тракта составила 71,43 % и 33,33 % соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1 Глазунова, Л.А. Эпизоотическая ситуация по гельминтозам крупного рогатого скота на юге Тюменской области / Л.А. Глазунова [и др.] // Тр. Всероссийского научн.-иссл. института ветеринар. энтомологии и арахнологии. – Тюмень, 2006. – № 48. – С. 39–45.

2 Жариков, И.С. Гельминтозы жвачных животных / И.С. Жариков, Ю.Г. Егоров // Минск: Ураджай, 1977. – 176 с.

3 Косяев, Н.И. Стронгиялтозы желудочно-кишечного тракта жвачных животных в Чувашской Республике (гельминтофауна, эпизоотология, формирование паразитоценозов, лечение и профилактика): автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 03.00.19, 16.00.03/ Н.И. Косяев. – Иваново, 2004. – 40 с.

4 Патогенез стронгиялтозов крупного рогатого скота / Ю.Ф. Петров [и др.] // Тр. Всерос. ин-та гельминтологии им. К.И.Скрябина. – М., 2004; Т. 40. – С. 291–298.

5 Петрухин, М.А. Испытание иммуностимуляторов для профилактики эзофагостомоза молодняка крупного рогатого скота / М.А. Петрухин, И.А. Богущ, Т.И. Трухина // Пути повышения эффективности научных исследований на Дальнем Востоке: сборник научных трудов. – Новосибирск, 2003; Т. 2 – С. 275–279.

6 Серко, С.А. Неблагоприятное воздействие антгельминтиков на организм животных и человека / С.А. Серко, Е.А. Лаковников, Е.В. Исаак // Материалы науч. конф. профессор.-преподават. состава, науч. сотрудников и аспирантов СПбГАВМ / С.-Петербург. гос. акад. вет. медицины. – СПб., 2002. – С. 90–92.

7 Свиридова, А.П. Влияние паразитов желудочно-кишечного тракта на формирование иммунитета при парагриппе-3 у молодняка крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 03.00.19, 16.00.03 / А.П. Свиридова. – Минск, 1990. – 22 с.

8 Якубовский, М.В. Иммуностимуляторы: эффективность и перспективы / М.В. Якубовский, Н.Ю. Щемелева // Наше сельское хозяйство. – 2010. – № 2. – С. 22–27.

9 Якубовский, М.В. Современные проблемы иммунологии гельминтозов / М.В. Якубовский и др. // Мед. обзор. – 1991. – № 4. – С. 11–15.

10 Якубовский, М.В. Стронгилятозы желудочно-кишечного тракта домашних жвачных животных в Беларуси / М.В. Якубовский [и др.] // Вет. наука – производству: сб. научн. трудов. – 2005. – Вып. 37. – С. 196–203.

11 Effect of parasitic nematodes *Trichostrongylus colubriformis* on haematological parameters of model host (*Oryctolagus cuniculus* f. *domestica*) / I. Jankovska[etal.] // *Scientia Agriculturae Bohemica*. – 2003. – Vol. 34, №3. – P. 94–98.

12 Intestinal Parasite Infections in Pigs and Beef Cattle in Rural Areas of Chungcheongnam-do, Korea. / H. Ismail [etal.] // *Korean J. Parasitol.* – 2010 – Vol. 48, №4. – P. 347–349.

13 Nematode parasitism in adult dairy cows in Belgium / J. Agneessens [et al.] // *Vet. Parasitol.* – 2000. – Vol. 90, № 1/2. – P. 83–92.

14 Shin, M.H. Eosinophil-Mediated Tissue Inflammatory Responses in Helminth Infection / M.H. Shin, Y.A. Lee, D.Y. Min // *Korean J. Parasitol.* – 2009. – Vol. 47, P. 125–131.

15 Sutherland, I.A. The effect of continuous drug exposure on the immune response to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep / I.A. Sutherland [et al.] // *Vet. Parasitol.* – 1999. – Vol. 80, № 3. – P. 261–271.

Полторжицкая Р.С., кандидат биологических наук

Черник М.И., кандидат ветеринарных наук

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

МИКРОБНЫЙ ПЕЙЗАЖ УЛЬЯ ПЧЕЛ В НОРМЕ И ПРИ НОЗЕМАТОЗНОЙ ИНВАЗИИ

ВВЕДЕНИЕ

Количественный и видовой состав микрофлоры гнезда пчел тесно связан со средой их обитания. В поисках медоносов и источников воды пчелы контактируют с различными микроорганизмами. Нормальная микрофлора гнезда пчел связана с микроорганизмами, занесенными в улей с нектаром, падью, водой и пылью. Эволюционно связанная с организмом хозяина, она представлена микроорганизмами преимущественно с эпифитными свойствами. Микробиоценоз оказывает существенное, а в ряде случаев и решающее влияние на все стороны жизнедеятельности пчел через модуляцию различных биохимических реакций и физиологических функций организма. Взаимоотношение организма пчелы и микрофлоры при нормальном физиологическом состоянии носит симбиотический характер, при котором микрофлора выполняет ряд положительных функций: продуцирует ферменты, участвующие в метаболизме нуклеиновых кислот, белков, углеводов, липидов; участвует в синтезе биологически активных соединений витаминов, антибиотиков, обеспечивая иммунную устойчивость организма насекомых. В то же время сдвиг микрофлоры в сторону условно-патогенных или патогенных представителей, а также транслокация их и образуемых ими токсинов через стенку кишечника сопровождаются возникновением эндогенной инфекции различной локализации [5].

Несмотря на способность некоторых патогенов проникать через кутикулу насекомых механически и энзиматически все же основным путем проникновения микробных агентов в природных условиях у медоносной пчелы является желудочно-кишечный тракт. Контаминация пчел условно-патогенной и патогенной микрофлорой оказывает повреждающее влияние на кишечный эпителий, снижая резистентность организма и вызывая повышенное поступление во внутреннюю среду – гемоцель – спор, бактерий, грибов, токсинов [4].

Основным органом пчел, который поражается возбудителем нозематоза – микроспоридией *Nosema apis* Z., является средняя кишка. С внутренней стороны средняя кишка пчел не покрыта хитином, но имеет перитрофическую мембрану (оболочку), предохраняющую клетки кишки. По сведе-

нию ряда исследователей уже после двух-трех часов после попадания спор ноземы в кишечник пчелы обнаружена адгезия и проникновение единичных спор *Nosema apis* Z. на поверхность слизистой средней кишки [6,7]. Чем плотнее оболочка, тем труднее возбудителю нозематоза проникнуть сквозь нее и добраться до клеток. Наибольшая плотность перитрофической мембраны наблюдается у молодых пчел от 4-х до 12-тидневного возраста, поэтому они более устойчивы к заболеванию. У старых, а также истощенных зимовкой насекомых защитная мембрана становится рыхлой и более подверженной проникновению сквозь нее патогена.

По данным проведенных нами исследований заражению более подвержены пчелы старше 20-дневного возраста. После проникновения патогенна в организм пчел происходит процесс поражения возбудителем эпителиальных клеток слизистой оболочки кишечника насекомых и интенсивное развитие паразита. Патологический процесс с отдельных участков постепенно распространяется на весь кишечный отдел. В качестве защитной реакции со стороны организма пчелы идет отторжение пораженных ноземой эпителиальных клеток, а процесс образования перитрофической мембраны прекращается. Заполненные спорами оболочки клеток выходят в просвет кишечника, разрываюются – происходит реинвазия здоровых участков эпителия и рассевание спор с калом во внешней среде. Защитные функции средней кишки ослабевают, что дает возможность легко заражаться другим эпителиальным клеткам. Использование российскими исследователями сканирующей электронной микроскопии при изучении нозематозного процесса в организме пчел показало, что цикл развития паразита – от начала заражения до появления молодых спор ноземы – составляет 72ч при 30⁰С [6]. Ферментативная деятельность пораженных эпителиальных клеток понижается, а перистальтика средней кишки увеличивается. Массовое развитие ноземы вызывает увеличение средней кишки, изменение цвета, потерю ею сегментации. Задняя кишка быстрее наполняется экскрементами, что вызывает опоношенность во время зимовки пчел. Единичные больные пчелы способны заразить большинство здоровых и привести к массовой гибели пчел.

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

сообщества микроорганизмов, а при инвазионном процессе формируется микропаразитоценоз, в **целью** наших исследований являлось изучение микрофлоры пчелиной семьи в норме и при нозематозной инвазии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

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

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

При идентификации паратифозных бактерий использовали агглютинирующие сыворотки.

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

Исследования проводили в соответствии со схемами идентификации, представленными в определителе бактерий Берджи, 1997.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные по микробиологическому обследованию пчелиных семей, инвазированных нозематозом, и группы здоровых семей отображены в таблице 1. Для контрольной группы пчел были характерны следующие особенности микробного пейзажа. Выделенная из здорового пчелиного гнезда микрофлора, взрослых пчел, расплода, пыльцы, перги, нектара, меда, прополиса, соскобов и смывов различных частей ульев, отнесена нами к 5 ос-

новным семействам: Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Mycobacteriaceae, Pseudomonaceae, Saccaceae. В микробиоценозе пчелиного гнезда, особенно той его части, которая представлена бактериями, преобладают неспоровые палочковидные формы. Спорообразующие формы микроорганизмов представлены, в основном, почвенными бациллами.

В пчелином гнезде встречаются грибы из рода *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pericystis*, *Triphoderma*, дрожжи из рода *Candida*, *Klokeria*, *Saccharomyces Torulopsis*, *Zygosaccharomyces*.

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

Исследования показали, что кишечник новорожденных пчел практически стерилен и только начиная с 4–5-тидневного возраста начинает заселяться облигатной микрофлорой рода *Lactobacterium*. Совершенно иную картину наблюдали у пчел, покидающих улей и начинающих летать за взятком. В 1г содержимого кишечника пчел, сборщиц нектара, пыльцы и воды, наряду с *Lactobacillus plantarum*, составлявшей 8,9% и аэробными спорообразующими микроорганизмами *Bac. subtilis*, *Bac. cereus* и *Bac. mesentericus*, составлявшими 8,7%, в значительном количестве (31,3%) присутствовали энтерококки: *Str. faecalis*, *Str. faecium*, *Str. durans* и промежуточные между *Str. faecalis* и *Str. faecium* формы. Доминирующее положение в кишечнике здоровых летных пчел занимали энтеробактерии (51,1%) . Их спектр состоял из 11 видов – представителей 8 родов семейства Enterobacteriaceae: *Ervinia herbicola*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei*. Выявленная нами картина микробного пейзажа кишечника пчел классифицирована, как случайная бактериальная флора, зависящая от контакта пчел-сборщиц с природными субстратами и, прежде всего, с медоносными растениями [5].

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

Установлено, что микроорганизмы не адаптируются в медовом зобике пчел. Микрофлора незапечатанного меда чрезвычайно бедна в количественном отношении, носит непостоянный характер. Не содержит бактерий запечатанный мед, а только дрожжевую и грибковую флору. Кислотность,

осмотическое давление, продуцирование и накопление перекиси водорода ответственны за такой эффект нектара и меда. Мед, как любая гиперосмотическая среда, обладает способностью уничтожать многие живые клетки, кроме осмофильных бактерий и грибов. Указанным свойством объясняется антимикробная активность нектара и меда – одного из важных защитных факторов гнезда пчел, который задерживает рост и развитие многих сапрофитных бактерий и грибов[4].

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

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

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

Таким образом, качественный состав микрофлоры кишечника пчел, инвазированных *Nozema apis*, существенно отличается от такового у насекомых, свободных от возбудителя нозематоза. Кроме того, увеличивается число патогенных микроорганизмов, которые здесь становятся доминирующими.

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

некоторых условно патогенных (*Bac. megathericus*) и патогенных (*Bac. alvei*) значительно возрастает вирулентность.

Таблица 1 – Особенности микрофлоры гнезда здоровых и пораженных нозематозом пчел

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Развитие нозематозного процесса, приводящее к гипотонии или полной атонии средней кишки, а также накоплению в ней продуктов распада, благоприятно влияет на увеличение количественного состава микрофлоры, где преобладающими являются патогенные *Staph. aureus*, *Staph. muscae*, *Staph. epidermidis*, *E. coli*, *Strept. Apis*.

ЛИТЕРАТУРА

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

Гнатенко А. В., младший научный сотрудник
Коваленко В. Л., доктор ветеринарных наук
Яненко У.Н., кандидат ветеринарных наук

Институт ветеринарной медицины НААН Украины, г.Киев

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЦИДНОГО ПРЕПАРАТА «АРГИЦИД» НА АЭРОБНУЮ СПОРООБРАЗУЮЩУЮ МИКРОФЛОРУ

ВВЕДЕНИЕ

Важным этапом разработки средств для дезинфекции является изучение его эффективности относительно обезвреживания возбудителей опасных зоонозных заболеваний. Особенное положение среди них отведено сибирской язве. Это заболевание является одним из наиболее опасных для животных и людей. Характерным для него является острое течение, сепсис, интоксикация организма, образование карбункулов и высокая смертность. Сибирская язва распространена на всех континентах земного шара и причиняет ощутимые убытки экономике отдельных государств [Н. Г. Ипатенко, 1982].

Продукция животного происхождения, которая контаминирована возбудителем сибирской язвы, является опасной для здоровья людей и подлежит уничтожению.

Традиционные методы, которые используются для инактивации бактерий в помещениях и контаминированной территории, являются очень агрессивными по отношению к обрабатываемой поверхности (рекомендуется 10–20 %-й раствор хлорной извести, хлорамин и т.д.).

По этим причинам изучение бактерицидной способности разрабатываемых препаратов для дезинфекции по отношению к сибирозвенному возбудителю имеет чрезвычайно важное значение для науки и практики.

Цель исследования – определить антимикробные способности бактерицидного препарата «Аргид» на спорообразующие аэробы рода *Bacillus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом эксперимента был вакцинный штамм *B. anthracis* UA –07 в споровой форме. Испытания проводились согласно требованиям имеющихся инструкций [4, 5]. Возбудитель сибирской язвы – *B. anthracis* UA –07 культивировали в МПБ (или в бульоне Хотингера) при температуре 37° С 24 – 48ч. Затем бульонную культуру высевали на МПА и оставляли на 5–7 суток при комнатной температуре (17-20° С) для образования спор. По истечении этого срока делали смыв 0,9 % NaOH колоний и методом тит-

рования определяли количество спор возбудителя сибирской язвы. Для опытных исследований брали культуру с содержанием не менее 2 млрд. живых спор в 1 см³.

Для определения бактерицидных свойств «Аргицида» на споровую форму возбудителя сибирской язвы отбирали пипеткой суспензию бацилл в количестве 0,5 см³ и вносили ее в пробирки с 5 см³ бактерицидного препарата в концентрациях от 1% до 10, с последующей экспозицией 60, 120 мин. и 24 часа. Затем высевали исследуемый образец на МПА и культивировали при температуре 37⁰С в течение 24 – 48 час. По окончании срока инкубации определяли наличие возбудителя путем визуальной оценки роста колоний на МПА, сравнивая с контролем.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенными исследованиями установлено, что при воздействии 1 %-го аргицида с экспозицией 120 мин отмечался рост одиночных колоний *Bac. anthracis*, а при 24-часовой экспозиции отсутствовал рост бацилл.

При концентрации 2 % задержка роста наблюдалась при экспозиции 60 мин, а при 120 мин рост культуры отсутствовал.

При испытании раствора аргицида в концентрации 3 – 4 % при 30-минутном контакте наблюдали задержку роста культуры. С увеличением срока экспозиции до 60 мин и выше (рисунок 1), роста культуры не наблюдали, что может указывать на бактерицидное действие препарата «Аргицид» относительно спорообразующих аэробов рода *Bacillus anthracis* UA –07. Результаты проведенного исследования представлены в таблице 1.

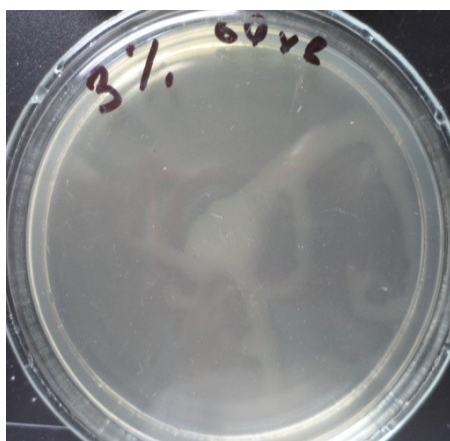


Рисунок 1 – 3 % р-р Аргицида
при 60 мин экспозиции



Рисунок 2 – Контроль

В контрольных пробах наблюдали выраженный рост референтной культуры *B. anthracis* UA –07 (рисунок 2).

Таблица 1– Эффективность раствора «Аргицид» при разных концентрациях на задержку роста споровой формы *B. anthracis* UA –07

Концентрация, %	Экспозиция			
	30 мин	60 мин	120 мин	24 часа
1,0	+	+	±	–
2,0	+	±	–	–
3,0	±	–	–	–
4,0	±	–	–	–
5,0	–	–	–	–

Примечание – “+” – наличие роста; “–” – отсутствие роста; “±” – результат непостоянный.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактерицидный препарат «Аргицид» при экспозиции 60 минут в концентрации 3 %, при норме затрат раствора 250 мл/м³ обладает стойким бактерицидным воздействием на *B. anthracis*.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Афиногенов, Г. У. Оценка методов изучения эффективности дезинфектантов и антисептиков / Г. У. Афиногенов, А. А. Домород, М.В. Краснова // Актуальные проблемы дезинфектологии в профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний. – М.: 2002.– с. – 104–105.
- 2 Дудницкий, И. А. Оценка дезинфицирующих средств/ И. А. Дудницкий, О. Н. Шувалова // Сельское хозяйство за рубежом. 1977.– № 12. – с. 40–45.
- 3 Соколова, Н.Ф. Методические основы определения устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам //Мат.8 съезда Российского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. М.,– 2002.– с.55–56.
- 4 Інструкція ”Ветеринарна дезінфекція, дезодорація, дезінсекція, дератизація”, схвалена та затверджена науково-методичною радою Державного департаменту вет. мед Мінагрополітики України, протокол №3.– 23.12.2005р від 11.01.2006р.
- 5 Рекомендації щодо санітарно-мікробіологічного дослідження змивів з поверхонь тест-об’єктів та об’єктів ветеринарного нагляду і контролю. Розглянуті і затверджені науково-методичною радою Державного департаменту ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України 23 грудня 2004 р. (протокол №4). – Видавничий центр НАУ. –2005.– 18с.

Коваленко В.Л., доктор ветеринарных наук
Гнатенко А.В., младший научный сотрудник
Ничик С.А., доктор ветеринарных наук

Институт ветеринарной медицины НААН Украины, г. Киев

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ БАКТЕРИЦИДНОГО ПРЕПАРАТА «АРГИЦИД» В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

ВВЕДЕНИЕ

Задача ветеринарной науки – помочь предприятиям отрасли животноводства в решении проблем, связанных с обеспечением санитарно-эпизоотического благополучия, среди которых главное место занимают вопросы эпизоотической безопасности, в частности аспекты, связанные с дезинфекцией.

Целью нашей работы было изучение эффективности применения бактерицидного препарата «Аргицид» для дезинфекции животноводческих помещений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования аргицида были проведены на базе Института ветеринарной медицины НААН Украины и в помещениях групп дорашивания свиней в хозяйствах Киевской области.

Препарат изготовлен на основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида и коллоидных нанорастворов аргентума и купрума.

Обработку препаратом проводили в помещении для дорашивания свиней как в присутствии животных, так и без них. Аэрозольную обработку помещений препаратом «Аргицид» проводили в присутствии животных в дозе 0,07 л на 1 м³ помещения. Были сформированы контрольная и опытная группы. В опытной группе препарат применяли дважды с интервалом 30 дней. Перед началом эксперимента и после его окончания (на следующие сутки, через 5, 10, 15 суток) проводили клиническое обследование поголовья и отбор проб крови для морфологических исследований. За животными наблюдали в течение 15 суток после обработки. Перед обработкой помещения герметизировали. Необходимую рабочую концентрацию действующего вещества рассчитывали исходя из объема помещения и норм расходования препарата. Время обработки бактерицидным препаратом составляло 15 – 30 мин, экспозиция 1 час.

Дезинфекцию помещений проводили методом орошения пола и стен в разных концентрациях: 0,1 %, 0,5 %, 1,0 % по 0,2 л на 1 м² площади и аэрозольной обработки 0,07 л на 1 м³ площади.

До начала дезинфекции и после её окончания проводили смывы с пола и стен помещений с помощью стерильных тампонов. Тампоны опускали в пробирки со стерильной водой и 0,1% раствором тиосульфата натрия. В лаборатории проводили посевы на мясо-пептонном агаре (МПА) и мясо-пептонном бульоне (МБП) из каждой пробирки.

Эффективность дезинфекции определяли по наличию или отсутствию роста бактерий группы кишечной палочки (БГКП) и стафилококков на питательных средах после инкубации посевов в термостате при температуре 37 °С. Через 24–48 часов и через 7 суток наблюдали за наличием или отсутствием роста на питательных средах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Установлено, что аэрозольная обработка бактерицидным препаратом помещений в присутствии животных не вызывает у свиней изменений в поведении и хорошо переносится. После экспозиции препарата в течении 60 мин и последующего проветривания помещения физиологическое состояние животных было в пределах нормы.

За 1 час до опыта и через 1 час, 1, 5, 10, 15 суток после опыта гематологические и биохимические показатели крови свиней были в пределах нормы и не отличались от показателей животных контрольной группы.

После проведения дезинфекции помещений методом орошения 0,1%, 0,5 %, 1,0 % растворами аргцида рост бактерий группы кишечной палочки и стафилококков на питательных средах МПА и МПБ во всех случаях отсутствовали (таблица 1). Одновременно мы наблюдаем и уменьшение общего микробного загрязнения в 7–33 раза, что подтверждает результативность обработки помещения в присутствии животных.

Таблица 1 – Контроль качества дезинфекции помещения для содержания свиней группы дорастивания с использованием препарата «Аргцид», ($M \pm m$, %, $n=5$)

Концентрация аргцида, %	Экспозиция, мин	Микробное загрязнение тыс. микроб. клеток/м ³			Эффективность обеззараживания, %
		до дезинфекции	после дезинфекции	норма	
0,1	30	481,5 ± 19,2	65,5 ± 0,15	50–80	86,4
0,5	30	387,6 ± 29,5	48,0 ± 10,8	50–80	87,6
1,0	30	501,1 ± 17,3	5,0 ± 2,5	50–80	99,0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные опытов подтвердили эффективность бактерицидного препарата «Аргицид» при дезинфекции в производственных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1 Ветеринарна дезінфекція (інструкція та методичні рекомендації) / за ред. О. М. Якубчак. – К.: «Компанія Біопром», 2010. – 152 с.

2 Кирпиченок, В. А. Справочник по ветеринарной дезинфекции / Кирпиченок В. А., Ятусевич А. И., Горидовец В. У. – Минск: Урожай. 1991. – 151 с.

3 Дезінфекція. В 3-х частинах. Ч 1. Дезінфікуючі засоби та їх застосування / А.М. Зарицкий Житомир: ПП «Рута», 2001. – 384 с.

4 Інструкція ”Ветеринарна дезінфекція, дезодорація, дезінсекція, дезінвазія, дератизація”, сминалена та затверджена науково-методичною радою Державного департаменту ветеринарної медицини Мінагрополітики України; протокол № 3, від 11.01.2006 р. К.: 2012. – 245 с.

5 Коваленко, В.Л. Визначення бактерицидності комплексного дезінфікуючого препарату на основі полігексаметиленгуанідин гідрохлориду / В.Л. Коваленко., А.І. Чехун., Я.М. Ярошно, та ін. // Ветеринарна біотехнологія. – Київ, 2011. – № 18. – С. 65–70.

Маслак В.Ю., аспирант

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

ЕСТЕСТВЕННАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И ПРОДУКТИВНОСТЬ ТЕЛЯТ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВКУСОАРОМАТИЧЕСКОЙ ДОБАВКИ «АЦЕВАНДОЛ»

ВВЕДЕНИЕ

Государственной программой социально-экономического развития Республики Беларусь на 2011–2015 годы, утвержденной Указом Президента Республики Беларусь от 11 апреля 2011 года № 136, предусматривается дальнейшее увеличение производства продукции сельского хозяйства на 39–45 % и доведение её экспорта до уровня 7,2 млрд. долларов США. Большая роль при этом отводится ветеринарной службе, целью работы которой, в соответствии с Законом Республики Беларусь «О ветеринарной деятельности», является сохранение ветеринарного благополучия – состояния здоровья животных, при котором обеспечиваются технологическая продуктивность животных, получение продуктов животного происхождения, соответствующих ветеринарно-санитарному качеству и предотвращается распространение болезней. Поэтому ветеринарные мероприятия должны быть направлены, прежде всего, на профилактику болезней путём повышения естественной резистентности и иммунной реактивности животных с использованием всевозможных способов, обеспечивающих производство безопасной продукции [1].

Формирование естественных защитных сил организма телят при соблюдении гигиенических требований происходит постепенно, без резких колебаний до полной стабилизации в зрелом возрасте. Замедление роста обычно выражено в первую неделю жизни, при переводе на общее молоко и на безмолочный тип кормления. Может оно наблюдаться и при последующих воздействиях окружающей среды. Эти опасные периоды жизни часто сопровождаются иммунодефицитами. Динамика естественной резистентности телят в значительной степени зависит от условий содержания и кормления. Если животным созданы надлежащие условия содержания, то развитие организма протекает без резких колебаний иммунного статуса. В противном случае наблюдается резкий спад уровня гуморальных и клеточных факторов естественных защитных сил организма, что предрасполагает к возникновению различных болезней и ведет к снижению энергии роста. Такие иммунодефицитные периоды, осложнённые нарушением зоогигиенических требований, классифицируются как критические перио-

ды выращивания и требуют корректировки [2].

Современные технологии выращивания и откорма молодняка крупного рогатого скота, как правило, характеризуются высокой концентрацией поголовья на ограниченных площадях и однообразным кормлением. В таких условиях организм животных испытывает значительные физиологические перегрузки и особенно требователен к кормам и условиям содержания. Неполноценность рационов, резкие их изменения при введении новых ингредиентов, использование кормов низкого качества, в том числе и по вкусовым показателям нередко приводит к уменьшению их потребления, ухудшению усвояемости, и как следствие, к снижению резистентности организма, а иногда и к стрессовой ситуации, приводящей к возникновению болезней. Особенно в таких ситуациях страдает молодняк начальных периодов выращивания. Нередко непроизводительное выбытие молодняка крупного рогатого скота, связанное с болезнями телят, достигает 7–10 %. Многочисленными исследованиями отечественных и зарубежных учёных доказано, что неполноценное кормление и погрешности в содержании телят неблагоприятно сказывается на уровне неспецифического иммунитета животных, их дальнейшем росте и развитии. Только оптимальные условия содержания и полноценное кормление могут обеспечить получение высокорезистентного молодняка с высокой жизнеспособностью и продуктивностью [3].

Одной из основных причин относительной нестабильности получаемых результатов при выращивании телят являются отклонения в обмене веществ, связанные с нарушениями гигиены кормления. Несмотря на повсеместное использование комбикормов в рационах крупного рогатого скота, нередко отмечается недостаток минеральных элементов. Отчасти – это следствие пониженного содержания их в почвах республики. Регистрируются случаи дефицита в кормах витаминов, аминокислот и ряда других жизненно необходимых биологических активных веществ. Решаются указанные проблемы путём введения в рационы недостающих биологических активных веществ в виде кормовых добавок. К таким добавкам относятся соли макро- и микроэлементов, различные транквилизаторы, препараты витаминов, ферментов, аминокислот, пробиотиков, пребиотиков и др. Однако большинство высокоэффективных кормовых добавок и их ингредиентов завозится из-за рубежа и, как следствие, имеют высокую стоимость, что негативно сказывается на рентабельности мясного скотоводства. В то же время ряд исследователей указывает на возможность использования с этой целью недорогого местного, в том числе и природного сырья: сапропеля, древесного угля, торфа, глины, трепела и др. Как один из резервных способов повышения уровня естественных защитных сил телят можно рассматривать применение вкусовых ароматических добавок, которые в настоящее время широко используются в рационах сельскохозяйственной птицы и всё шире внедряются в свиноводство, однако сведения об их применении в скотоводстве

единичны. Особый интерес представляют добавки, содержащие в своём составе органические кислоты, которые, активно участвуя в метаболических процессах, стимулируют обмен веществ, а также улучшают вкусовые качества, являются экологически безопасными консервантами кормов и повышают их биоконверсию [4,5,6].

Учитывая вышеизложенные аспекты, всестороннее изучение динамики естественной резистентности молодняка крупного рогатого скота в зависимости от условий содержания и кормления, а также разработку и внедрение в производство новых эффективных экологически безопасных средств коррекции, профилактики иммунодефицитов и болезней телят весьма актуальны.

Витебским заводом ветеринарных препаратов производится добавка кормовая вкусоароматическая «Ацевандол». Она содержит сбалансированный комплекс минеральных веществ, яблочной кислоты и ароматизатора «Ваниль». Представляет собой мелкий порошок серого цвета кислого вкуса с запахом ванилина. Совместима со всеми компонентами кормов. Растворяется в воде с остатком. Фармакологическое действие кормовой вкусоароматической добавки «Ацевандол» основано на раздражении вкусовых и обонятельных рецепторов, благотворном воздействии на организм яблочной кислоты и соединений, образующихся при её взаимодействии с доломитом, L- малата – непосредственно, как части цикла трикарбоновых кислот, макро- и микроэлементов, входящих в состав доломита «нижнего уступа» – как стимуляторов обменных процессов. Благодаря сорбционным свойствам доломит выполняет транспортную функцию, доставляя биологически активные вещества в желудочно-кишечный тракт. В результате этого повышается уровень естественных защитных сил организма животных и биоконверсии кормов. Вкусоароматическая добавка «Ацевандол» выпускается в расфасовке по 1, 2,5 и 5 кг. Срок годности – 2 года.

Целью научно-исследовательской работы являлось изучение возможности повышения уровня естественной резистентности организма и продуктивности телят путём применения вкусовой ароматической добавки «Ацевандол».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в условиях ЗАО «Липовцы» Витебского района Витебской области. Для проведения научно-хозяйственного опыта на участке первого периода (дорастивания) промышленного комплекса по откорму молодняка крупного рогатого скота по принципу условных аналогов были подобраны четыре группы телят 2х-месячного возраста по 18 голов в каждой. Животные первой группы служили контролем и вкусоароматическую добавку «Ацевандол» не получали. В рацион телят второй, третьей и четвёртой опытных групп в смеси с комбикормом вводили изучаемую добавку в расчёте 0,3; 0,5 и 1% к доле комбикорма соответственно.

Пробы крови у телят брали в начале опыта (в двухмесячном возрасте), а затем ежемесячно до окончания исследований (в шестимесячном возрасте). Определяли иммунологические показатели: бактерицидную (БАСК) и лизоцимную (ЛАСК) активность сыворотки крови, фагоцитарную активность нейтрофилов, содержание общего белка и его фракций; морфологические и биохимические: количество лейкоцитов, эритроцитов, содержание гемоглобина, активность ферментов аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы. Контрольные взвешивания проводили в начале и в конце опыта. Регистровали заболеваемость и сохранность телят, а также параметры микроклимата животноводческого помещения, в котором они содержались. Рассчитывали экономическую эффективность применения различных доз вкусоароматической добавки «Ацевандол».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате определения параметров микроклимата было установлено, что температура воздуха телятника при проведении опыта была близка к оптимальному значению, колеблясь в пределах 11 – 17 °С. Не превышали нормативных величин в период исследований скорость движения воздуха (0,14 – 0,41 м/с) и содержание аммиака (10 – 13 мг/м³). Относительная влажность воздуха в среднем составляла 79,1 %. Общая микробная загрязнённость в воздухе обследуемого животноводческого помещения составила 122,1 тыс. м.т./м³. Таким образом, параметры микроклимата телятника, в котором содержались подопытные животные, за исключением общей микробной загрязнённости воздуха, превышавшей требования РНТП–1–2004 на 52,1 тыс. м.т./м³, были близким к зоогигиеническим нормативам.

У телят на участке дорастивания промышленного комплекса по выращиванию и откорму молодняка крупного рогатого скота ЗАО «Липовцы» показатели гуморальной защиты контрольной и опытных групп при постановке в начале опыта достоверно не различались. Бактерицидная активность сыворотки крови регистрировались в пределах 44,9±2,38 – 48,6±1,74 %, лизоцимная активность сыворотки крови – 2,1±0,19 – 3,2±0,7 %. Не отмечалось статистически значимых различий между группами и по показателю клеточной защиты организма–фагоцитарной активности нейтрофилов, которая у 2-месячных подопытных телят составляла 61,3±3,30 – 64,8±2,14 %.

С увеличением возраста у подопытных животных отмечается устойчивое постепенное повышение всех изучаемых показателей естественной резистентности. Однако в 4–5-месячном возрасте у телят наблюдался спад роста гуморальных факторов защиты. Данный иммунодефицитный период мы связываем с изменением рациона кормления. При уменьшении содержания в рационе ССК-2 на 44 % БАСК контрольных животных снизилась до 42,8±1,24 %, т.е этот показатель стал на 2,5 % ниже, чем в начале опыта у 2-хмесячных телят (45,3±1,77). В 5-месячном возрасте, при полном выведении из рациона ССК-2 БАСК в контроле также была ниже уровня начала

исследований и составляла $44,3 \pm 1,85$ %. Аналогичная тенденция у контрольных животных наблюдалась и по динамике ЛАСК. В то же время у телят 3 и 4 опытных групп в рацион которых вводили вкусоароматическую добавку «Ацевандол», подобного снижения показателей гуморальной защиты в 4-месячном возрасте не наблюдалось, их значения оставались на уровне предыдущих измерений, а в 5-месячном возрасте БАСК телят этих групп была выше чем у контрольных животных, соответственно на 7,2 и 9,5 % ($51,5 \pm 1,55$ и $53,8 \pm 2,35$ %).

В конце опыта БАСК телят 3 опытной группы, в рацион которых вводился «Ацевандол» в дозе 0,5 % к комбикорму, была $54,5 \pm 1,97$ %, достоверно превышая показатели контроля на 3,9 % ($P < 0,05$), а телята 4 опытной группы, в рацион которых вводился «Ацевандол» в дозе 1 % к комбикорму – $57,0 \pm 1,91$ %, достоверно превышая контроль на 6,4 % ($P < 0,05$).

Максимальный уровень ЛАСК животных подопытных групп зарегистрирован в 5-месячном возрасте. В конце опыта отмечалась тенденция к снижению этого показателя, однако у 6-месячных телят 3 группы, получавших изучаемую добавку в дозе 0,5 % к комбикорму, ЛАСК составляла $3,8 \pm 0,39$ %, достоверно превышая контроль на 1,2 % ($P < 0,05$).

Использование добавки «Ацевандол» в конце опыта положительно сказалось и на уровне факторов клеточной защиты организма телят. При изучении показателей клеточных факторов неспецифической защиты организма подопытных телят установлена динамика роста уровня фагоцитарной активности нейтрофилов. В то же время в конце опыта у телят 2,3 и 4 опытных групп ФАН составила $69,3 \pm 1,49$, $70,3 \pm 1,60$ и $72,8 \pm 1,32$, превышая данный показатель в контроле ($66,1 \pm 1,52$ %) соответственно на 3,2, 4,2 и 6,3 %. Однако достоверных различий по ФАН между опытными и контрольными группами не установлено.

Следовательно, введение в рацион телят Ацевандола в дозах 0,5 и 1,0 % к комбикорму способствует повышению БАСК на 3,9 % ($P < 0,05$) – 6,4 % ($P < 0,05$), что позволяет профилактировать иммунодефициты в период выращивания. При применении вкусоароматической добавки «Ацевандол» в дозе 0,3 % к комбикорму не отмечено достоверного иммуностимулирующего эффекта.

Содержание общего белка в сыворотке крови подопытных животных при постановке на опыт находилось в пределах $63,3 \pm 2,21$ – $66,64 \pm 2,34$ г/л, альбуминов – $31,94 \pm 1,84$ – $34,84 \pm 2,36$ г/л, α -глобулинов – $10,29 \pm 0,77$ – $12,76 \pm 1,02$ г/л, β -глобулинов – $8,39 \pm 0,74$ – $9,71 \pm 0,41$ г/л, γ -глобулинов – $10,95 \pm 0,81$ – $12,65 \pm 0,69$ г/л.

Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) в начале опыта у телят контрольной и опытных групп составляла $0,36 \pm 0,02$ – $0,38 \pm 0,05$, а активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ) колебалась в пределах $0,28 \pm 0,05$ – $0,32 \pm 0,06$ мккатал/л.

В конце опыта содержание общего белка увеличилось как в сыворотке крови телят контрольной группы, так и в сыворотке крови телят опытных групп. По видимому, это связано с концентратным типом кормления, о чём также свидетельствует и высокий уровень содержания альбуминов ($33,29 \pm 1,15$ – $34,62 \pm 1,81$). В то же время содержание общего белка в сыворотке крови шестимесячных телят 2, 3 и 4 опытных групп, получавших изучаемый вкусоароматизатор в дозах 0,3, 0,5 и 1,0 % к комбикорму, превышал контроль соответственно на 2,5; 4,7 и 6,7 % ($P < 0,05$).

В сыворотке крови телят третьей и четвёртой групп по отношению к контрольным животным в конце опыта зарегистрировано достоверное увеличение содержания γ -глобулинов соответственно на 9,5 и 12,4 % ($P < 0,05$), что указывает на их более высокий иммунный статус.

В конце опыта не отмечалось достоверных различий у животных контрольной и опытных групп и по активности изучаемых ферментов (АсАт и АлАт), т.е. добавка не оказывала вредного влияния на организм и, в частности, печень животных, что косвенно свидетельствует о нетоксичности изучаемого вкусоароматизатора.

Следовательно, введение в рацион телят на дорастивании вкусоароматической добавки «Ацевандол» в расчёте 0,5 и 1,0 % к комбикорму, не оказывая токсического действия, способствует повышению в сыворотке крови уровня общего белка на 4,7 и 6,7 % ($P < 0,05$) и увеличению содержания γ -глобулинов соответственно на 9,5 и 12,4 % ($P < 0,05$).

Анализ морфологических показателей крови подопытных животных свидетельствует о том, что перед началом опыта в крови телят опытных групп содержание лейкоцитов было в пределах физиологических колебаний, на уровне $7,09 \pm 0,316$ – $7,20 \pm 0,524 \times 10^9/\text{л}$. С увеличением возраста животных величина изучаемого показателя изменялась, однако за границы допустимых физиологических колебаний на протяжении всего периода исследований не выходила. В конце опыта содержание лейкоцитов в крови подопытных телят снизилось до уровня $6,11 \pm 0,242$ – $6,14 \pm 0,356 \times 10^9/\text{л}$ без достоверных различий между группами.

Содержание эритроцитов в крови животных контрольной и опытных групп в начале исследований было на низком уровне и колебалось в пределах $5,29 \pm 0,182$ – $5,41 \pm 0,208 \times 10^{12}/\text{л}$. Мы это связываем с зоотехническими погрешностями и условиями промышленной технологии выращивания телят. Однако уже к 4х-месячному возрасту у опытных телят отмечалась нормализация данного показателя: $6,17 \pm 0,279$ – $6,29 \pm 0,446$. У животных контрольной группы он составлял в среднем $6,01 \pm 0,322 \times 10^{12}/\text{л}$. В конце опыта содержание эритроцитов в крови телят 2, 3 и 4 опытных групп, в рацион которых вводилась изучаемая добавка, было выше, чем у контрольных животных, соответственно на 5,2, 3,6 и 6,8 % ($P < 0,05$).

Аналогичная тенденция прослеживалась и по содержанию гемоглобина в крови подопытных телят. Так, если в начале исследований у

подопытных животных данный показатель был примерно одинаков без достоверных различий между группами, то уже через 60 дней использования ацевандола в крови телят опытных групп содержание гемоглобина увеличилось по сравнению с контролем в среднем на 8,4 %. В дальнейшем также наблюдали рост содержания гемоглобина. В целом показатели гемоглобина в крови телят 2, 3 и 4 опытных групп в течение опыта превосходили динамику данного показателя в контроле соответственно на 16,7, 23,4 и 26,5 %, что свидетельствует о стимулирующих свойствах изучаемой добавки. В конце периода исследований содержание гемоглобина в крови животных 2, 3 и 4 опытных групп, в рацион которых вводилась изучаемая добавка, составляло соответственно $96,4 \pm 3,86$, $95,2 \pm 3,00$ и $100,1 \pm 5,72$ г/л, достоверно превышая данный показатель в контроле ($87,2 \pm 3,143$ г/л) соответственно на 10,5, 9,2 и 14,7 % ($P < 0,05$).

Стимуляция естественных защитных сил организма телят путём введения в рацион вкусоароматической добавки «Ацевандол» способствовала снижению уровня заболеваемости животных. Во время проведения исследований в первой группе (контроль) заболело 3 теленка. Первый в возрасте 2,3 месяца – болел острым катаральным абомазоэнтеритом; два телёнка (2,5 и 3 месяца – с острой катаральной бронхопневмонией. При проведении патологоанатомического вскрытия прижизненный диагноз подтвердился. При исследовании патматериала от павшего бычка в диагностическом отделе ГЛПУ «Витебская районная ветеринарная станция» возбудителей инфекционных болезней не выявлено. Во второй опытной группе также зарегистрировано 3 случая заболевания животных в возрасте 3,5–4 месяцев с диагнозом острая катаральная бронхопневмония. В третьей опытной группе заболело 2 телят: в возрасте 2,3 месяцев с диагнозом острый катаральный абомазоэнтерит и в возрасте 3 месяцев с диагнозом острая катаральная бронхопневмония. В четвёртой опытной группе у бычка в возрасте 5,7 месяцев диагностировался разрыв сухожилий глубокого пальцевого сгибателя. Животное было экстренно убито, мясо реализовано в столовой предприятия по закупочной стоимости. Падежа телят за период исследований в 2, 3 и 4 опытных группах зарегистрировано не было. Заболеваемость телят за период опыта в расчёте на 18 голов (количество животных в подопытных группах) составила: в контрольной группе – 16,6 %, во второй опытной группе – 16,6 %, в третьей опытной группе – 11,1 %, в четвёртой опытной группе – 5,6 %; сохранность соответственно 94,4; 100,0; 100,0 и 94,4 %.

При определении продуктивности подопытных животных установлено, что в начале опыта двухмесячные телята имели живую массу в среднем 64,0 кг. К концу опыта исследования животные опытных групп, получавших изучаемую добавку, превосходили по живой массе контрольных сверстников. Введение в рацион вкусоароматической добавки «Ацевандол» способствовало увеличению абсолютного прироста живой массы животных за период исследований в третьей опытной группе – на 7,2 и четвёртой –

на 7,6 кг.

Введение добавки в дозе 0,3 % к комбикорму оказало менее выраженный эффект. Прирост живой массы телят второй группы был выше контроля только на 1,6 %. Наиболее высокие показатели среднесуточного прироста живой массы телят по сравнению с контролем (на 9,1 % ($P<0,05$)) отмечали у телят четвертой опытной группы, в рацион которых вводили «Ацевандол» в расчёте 1,0 % к комбикорму. В третьей опытной группе, с дозировкой добавки 0,5 % к комбикорму, данный показатель был несколько ниже и составлял 8,5 % ($P<0,05$).

Проведенные исследования подтвердили целесообразность использования вкусоароматической добавки «Ацевандол» в дозе 0,5 % к комбикорму при выращивании телят, так как экономический эффект от введения её в рацион телят в расчете на один рубль затрат составил 3,58 рублей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для повышения уровня естественной резистентности организма и продуктивности телят на дорастивании рекомендуем применять вкусоароматическую добавку «Ацевандол» в расчете 0,5 % добавки к массе комбикорма. При использовании кормов с низкими вкусовыми качествами рекомендуемую дозу добавки допускается увеличивать до 1,0 % к массе комбикорма.

ЛИТЕРАТУРА

1 Министерство сельского хозяйства и продовольствия РБ // "Pravo" - подборка из законодательных актов Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа: pravo.levonevsky.org/text726.htm. – Дата доступа: 30.02.2012.

2 Карпуть, И. М. Возрастные и приобретенные иммунные дефициты / И. М. Карпуть // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2001. – №2. – С. 28 – 31.

3 Соколов, Г. А. Ветеринарная гигиена / Г. А. Соколов. – Минск: Дизайн ПРО, 1998. – 160 с.

4 Медведский, В. А. Повышение резистентности сельскохозяйственных животных биологически активными веществами: монография / В. А. Медведский, А. Ф. Железко, И. В. Щebetок. – Бейрут, 2003. – 53 с.

5 Портная, Т.В. Эффективность использования ароматических добавок в рационах бычков на откорме / Агроэкономика. 2001. – № 9. –С. 13–14.

6 Портной, А.И. Состав и технологические свойства молока высокопродуктивных коров при скармлировании ароматической добавки / Известия Академии аграрных наук Республики Беларусь. – 1996.– № 1.– С. 64–66.

ДИСФУНКЦИЯ БЛУЖДАЮЩЕГО НЕРВА В ПАТОЛОГИИ ПРЕДЖЕЛУДКОВ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

В связи с интенсификацией молочного скотоводства особую актуальность приобретают исследования, посвященные проблемам дисфункций пищеварительного аппарата крупного рогатого скота незаразной этиологии. Одной из важных и малоизученных в странах СНГ остается проблема дисфункции блуждающего нерва у крупного рогатого скота и связанные с ней вопросы ветеринарного обеспечения молочного скотоводства. В работе представлен анализ результатов исследований, связанных с поражением блуждающего нерва и дисфункций органов пищеварения крупного рогатого скота.

1 Преобладание холинергической иннервации сычуга коров. Деятельность полых органов желудочно-кишечного тракта и желёз внутренней секреции, а так же кровеносных и лимфатических сосудов регулирует так называемая *энтеральная нервная система* – отдел вегетативной и периферической нервной системы, главной частью которого являются сети (сплетения) нервных узлов, регулирующих сократительную функцию гладкой мускулатуры внутренних органов брюшной полости и секреции. Так, нейроны ауэрбахова сплетения иннервируют продольный и циркулярный слои мышечных стенок полых органов пищеварения, обеспечивают регуляцию ритмичности процессов перистальтики и антиперистальтики. При исследовании мотонейронов ауэрбахова сплетения у крупного рогатого скота Н. Pfannkuche, D.Reiche, S.Hoppe et al. (2002) пришли к выводу о преобладании холинергического типа иннервации обоих мышечных слоев стенки сычуга [5]. Результаты немецких исследователей полностью согласуются с данными, полученными в области нейрофизиологии человека: в эфферентном пути парасимпатической нервной системы человека пре- и постганглионарные нейроны являются преимущественно холинергическими. Таким образом, ведущая роль в передаче возбуждения клеткам сычуга принадлежит ацетилхолину, при этом известно, что холинорецепторы разной локализации обладают неодинаковой чувствительностью к фармакологическим средствам, которые могут оказывать на них как стимулирующее (М-холиномиметики), так и угнетающее (М-холиноблокаторы) воздействие.

2 Блуждающий нерв (nervus vagus) и его роль в регуляции пищеварения у позвоночных животных. Представляя собой 10-ю пару черепных нервов, блуждающий нерв классифицируют как смешанный – в своём составе он содержит как двигательные, так и чувствительные и парасимпатические нервные волокна, посредством которых обеспечивается двигательная иннервация мышц органов пищеварения, происходит воздействие на

секрецию желез пищеварительного аппарата. Проходя вдоль обеих сторон пищевода, блуждающий нерв поступает в брюшную полость, где его ветви иннервируют поверхность сычуга и другие полые органы, и от целостности нервных волокон зависят важнейшие функции пищеварения.

2.1 Признаки поражения блуждающего нерва и их описание в исследованиях. Выделяют *внутричерепные* и *периферические поражения* блуждающего нерва. В первом случае в качестве факторов этиологии к поражениям нерва относят сдавливание опухолью, тромбоз сосудов, гематому, инфекционные заболевания, менингит; во втором случае – воздействие сильнодействующих токсикантов, опухоли, механические травмы в области позвоночника и брюшной полости, поражения аорты при неправильном проведении инъекций в области яремной вены у коров.

Рассмотрим общие отличительные признаки поражения блуждающего нерва (ПБН). При одностороннем поражении может наблюдаться свисание мягкого нёба на стороне поражения, хрипы, нарушение глотательного рефлекса, временные дисфагия (расстройство глотания с откашливанием принятого глотка жидкости, обильным скоплением в полости рта слюны, иногда корма), тахикардия, брадикардия, аритмия, спазм бронхов, нарушение перистальтики кишечника. Двусторонний его паралич быстро приводит к летальному исходу. Так, Гофман (1941) описал случай ПБН у коровы, сопровождаемый в течение 3-х недель кашлем, икотой и рвотой, что привело к летальному исходу. Причиной поражения являлась гипертрофия лимфатического узла при туберкулезе [16].

Parkinson et al. (2010) характеризует ПБН как дисфункцию преджелудков коров, сопровождаемую хроническим вздутием брюшной полости, нарушением пассажа кормовых масс и аппетита, потерей живой массы [6].

Вопреки утверждению Parkinson et al. (2010), B.Watt (2012) описал 4 случая возникновения ПБН при пастбищном содержании 350 голов мясного скота абердин-ангусской породы в Австралии, при развитии заболевания у которых ухудшения аппетита и потери живого веса не наблюдалось, однако было отмечено вздутие живота, своим внешним контуром напоминающее «груша+яблоко» (рисунок 1) и брадикардия (56 уд./мин) [13]. (Для сравнения: характерный «L»-образный изгиб внешнего контура вздутия брюшной полости при ПБН проиллюстрировал в своем кратком обзоре проф. Ahmed A. Amer [17], (рисунок 2).

Parkinson et al. (2010) характеризует ПБН как дисфункцию преджелудков коров, сопровождаемую хроническим вздутием брюшной полости, нарушением пассажа кормовых масс и аппетита, потерей живой массы [6].

Возникновение ПБН у коров ранее считали следствием осложнения, вызванным с протекающим травматическим ретикулоперитонитом, однако позже выяснили, что основной причиной нарушения моторики сетки и пассажа кормовых масс в рубец является все же обширная адгезия сетки к при-

легающим тканям брюшной полости на участке ее травматического поражения, а не блуждающий нерв [7,8]. Имеющиеся данные о клиническом проявлении ПБН у коров были существенно дополнены U.Braun, S.Rauch, M. Hässig (2009) сонографическими исследованиями сократительной способности сетки у 144 голов крупного рогатого скота с ПБН. Данные исследования показали, что у 97 голов наряду с ПБН отмечался ретикуло-омазальный стеноз, а у 47 голов – пилорический стеноз. У 9 голов было отмечено 2, у 17 голов – 3, у 59 голов – 4-5, у 37 голов – более 5 сокр. сетки/мин, у 12 голов – была отмечена ретикулярная атония. У коров с ретикуло-омазальным стенозом частота сокращений сетки была достоверно выше ($P < 0,05$), чем у животных с пилорическим стенозом. Дислокация, амплитуда и скорость сокращений сетки достоверно не отличались у животных с двумя различными типами стенозов [9]. Другие исследования еще больше связывают ретикулоперитонит с возникновением ПБН. Так, по статистическим данным U. Braun, K. Hausammann, C. Oertle (1990) в пятилетний срок из 1785 обследованных коров, было выявлено всего 20 голов с характерным при ПБН вздутием брюшной полости, снижением аппетита и дефекации, у 9 гол наблюдалась брадикардия. Уровень общего белка крови и фибриногена были повышены. У 12 коров в ходе операции был обнаружен травматический ретикулоперитонит [10]. Сходные данные были получены в исследованиях N.Sattler et al. (2000) у коров после хирургического лечения правостороннего завала сычуга и язвенной болезни. Так, из 420 обследованных коров только у 61 животного обнаружили признаки ПБН, причем, характерное вздутие брюшной стенки обнаружили только у 22 гол, которых по остальным показателям отнесли к 3-му и 4-му типу ПБН. Перитонит выявили у 18 коров. Повреждения самого блуждающего нерва путем гистологических исследований обнаружили только у 5 животных [11].

Таким образом, непосредственное повреждение блуждающего нерва обнаруживается у коров достаточно редко, речь идет скорее о *синдроме ПБН*, связанного так же с другими дисфункциями систем органов.

2.2 Зарубежная классификация дисфункций блуждающего нерва, связанных с патологией органов пищеварения у крупного рогатого скота представляет определенный интерес в свете расширения процессов мировой научно-производственной интеграции последних десятилетий. Помимо общих отличительных признаков, описанных выше, зарубежная ветеринарная терапия и пропедевтика предлагает классификацию ПБН у коров, включающую в себя *4 типа*: **1)** нарушение глоточного рефлекса и вздутие брюшной полости с возможным протеканием хронической пневмонии, перитонита, язвенной болезни сычуга, нарушений черепных нервов, травмы глотки. Не исключается наличие механических факторов повреждения нерва, в результате которых нарушается деятельность пищевода; **2)** нарушение пассажа кормовых масс в преджелудках, что приводит к вздутию брюшной полости. Нарушения пассажа кормовых масс через книжку,



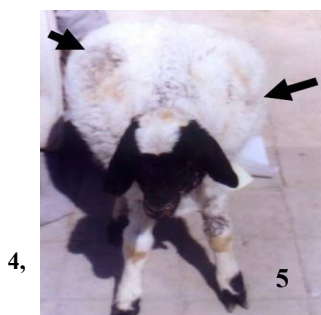
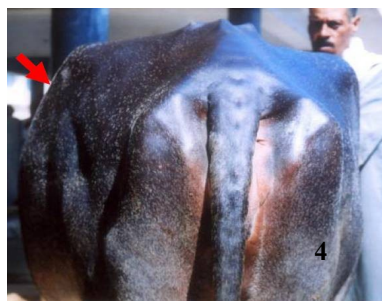
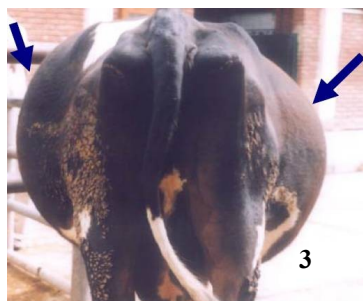
Рисунок 1– Вздутие живота у коровы абердин-ангусской породы при ПБН по V.Watt (2012) [13]



Рисунок 2– Характерный «L»-изгиб брюшной стенки у коров при ПБН (по данным краткого обзора проф. Ahmed A.Aamer) [17].

обусловленные функциональными или механическими факторами, могут являться также и следствием ПБН, протекающих в виде воспаления при микотических маститах, абсцессах сетки при травматическом ретикулеперитоните, ее адгезии к близлежащим тканям. Стеноз ретикуло-омазального отверстия может быть вызван заглатыванием плаценты, развитием папиллом или лимфосаркомы; **3)** расстройства функции и стеноз сычуга, вызванные первичными и вторичными причинами: в результате вскармливания коровам избыточного количества грубых кормов при недостатке питьевой воды или нарушениях пилоруса сычуга. В некоторых случаях наблюдается скручивание сычуга или лимфосаркома; **4)** редко встречаемые нарушения желудочно-кишечного тракта, связанные с нарушениями проходимости сычуга, наблюдаемые в последней четверти стельности: увеличенная в размере матка смещает сычуг краниально и его подвижность нарушается. *Диагностика ПБН* основывается на сборе данных анамнеза, пропедевтики (ректальная пальпация рубца справа от срединной линии, наличие характерного внешнего контура вздутия брюшной полости, ощупывание пищевода, шеи и брюшной стенки для обнаружения очага воспаления, обнаружение инородного тела и сопутствующих заболеваний, таких как лимфосаркома – путем проведения серологической диагностики) и специальных диагностических тестов, включая диагностическую лапаротомию. Дифференциальную диагностику характерного внешнего контура вздутия брюшной стенки «L-изгиб» («груша-яблоко») при ПБН необходимо проводить к изменению внешнего контура вздутия брюшной стенки при других формах тимпании коров (в том числе – периодической тимпанией молодняка), не

связанных с ПБН, что четко проиллюстрировал в своем кратком обзоре (Overview) «Abdominal Distension» проф. Ahmed A. Aamer из университета г. Асьют, Египет (рисунки 1,2,3,4,5,6) [17].



Рисунки 3,
5, 6 – Диф-

ференциальная диагностика: различные виды контуров изгиба брюшной стенки при тимпании жвачных, не связанной с ПБН и

«L-изгибом» : по данным краткого обзора проф. Ahmed A. Aamer, университет г. Асьют, Египет [17]

По данным Р. D. Constable (2012), уровни физиологических показателей организма коров с ПБН могут не отклоняться от нормы, однако в некоторых случаях наблюдается метаболический алкалоз. Концентрация ионов хлора в сыворотке крови может изменяться в зависимости от участка локализации стеноза в пищеварительном аппарате животных. Если стеноз локализован в сопредельных к сычугу участках пищеварительного канала, содержание ионов хлора не превышает значений нормы. Низкая концентрация ионов хлора в сыворотке крови объясняется оттоком сычужного содержимого в рубец (так называемая, «внутренняя рвота»), или стенозом на

уровне сычуга. Если концентрация ионов хлора в сыворотке крови понижена, то у коров, как правило, наблюдается метаболический алкалоз. ПБН по 3-му типу отличается повышенным уровнем ионов хлора в отличие от второго типа ПБН. Концентрация калия в сыворотке крови обычно может быть понижена из-за уменьшенного потребления его с кормом. Концентрация кальция в сыворотке крови часто умеренно понижена вследствие высокого уровня молокоотдачи, это так же может приводить к залеживанию у коров. Концентрация мочевины и креатинина в сыворотке крови повышается при обезвоживании попутно с возникновением азотемии. Величина гематокрита может повышаться вследствие обезвоживания или понижаться из-за хронической анемии, связанной с нарушением работы костного мозга. В случае развития перитонита возможна нейтрофилия, при лимфосаркоме – лимфоцитоз. При абсцедировании наблюдают гиперглобулинемию, повышение уровня общего белка в сыворотке крови [14].

Y. Gul и M. Issi (2009) исследовали образцы рубцового содержимого и пробы крови, отобранные из яремной вены у коров с клиническими признаками ПБН (52 головы), возникшего из-за травматического ретикулперитонита, а также в контрольной группе здоровых животных (10 голов) – для определения концентрации в них ионов хлора (показателя наличия у коров абомазо-руминального рефлюкса [3], по мнению авторов, связанного с ПБН и синдромом Хофлунда), проводился глюторальдегидный тест (GAR) [4]. В результате проведенных исследований было выявлено, что показатели температуры тела, частоты сокращений рубца, сердца и дыхания, GAR достоверно отличались между животными двух групп ($P < 0,01$), средний уровень GAR у коров экспериментальной группы составил $2,44 \pm 1,18$ мин, и имел статистически достоверную разницу от контрольной группы ($P < 0,001$). В своих выводах авторы указывают, что определение концентрации ионов хлора в рубцовом содержимом является важнейшим показателем диагностики синдрома абомазо-руминального рефлюкса у коров, который может использоваться так же для выявления функциональных стенозов пищеварительного канала, в случаях с травматическим ретикулперитонитом высокой диагностической ценностью обладает так же тест GAR [12].

Прогноз ПБН без проведения хирургического лечения дисфункций пищеварения – очень редко благоприятный. Больные животные постепенно утрачивают аппетит (однако периодически на некоторое время он может восстанавливаться), снижается молочная продуктивность, возникает брадикардия, обезвоживание, может наблюдаться гипо- или гиперфункция моторики рубца. Лечение синдрома ПБН должно быть патогенетическим, тем не менее, значительная роль отводится также лечению вторичных и сопутствующих заболеваний, симптоматической терапии, направленной на снижение газообразования в преджелудках, в том числе, путем фистульного вывода газов; иногда применяют антибиотикотерапию, поение вволю, назначения жидкостной электролитной терапии и подкожного введения раствора боро-

глюконата для коррекции нарушений обменных процессов [15,14].

Следует отметить, что в некоторых работах зарубежных исследователей [12] синдром ПБН отождествляется с другими заболеваниями желудочно-кишечного тракта, которых объединяет в себе синдром Хофлунда, рассмотренный нами ранее [1,2].

С целью профилактики ПБН необходимо строго соблюдать правила взятия крови из яремной вены, так как проколы с повреждением сосудисто-нервного пучка могут вызывать дегенерацию волокон блуждающего и симпатического нервов с последующим развитием парезов и параличей. Необходимо предупреждать возможные отравления сильнодействующими токсикантами, предотвращать попадания в организм животных инородных тел, по мнению P.D. Constable (2012) – именно травматический ретикулоперитонит и его последствия являются наиболее распространенной причиной ПБН у коров. Ранняя диагностика и оперативное лечение язв сычуга так же способствует профилактике ПБН [14].

ЛИТЕРАТУРА

1 Безбородов, П.Н. Синдром Хофлунда у высокопродуктивного скота / Животноводство России, №12, 2010.– С.23–25.

2 Безбородов П.Н., Синдром Хофлунда – малоизвестная патология пищеварительного тракта у высокопродуктивных коров / Вестник ФГОУ ВПО Брянской ГСХА, №4, 2010.–С.56–65.

3 Безбородов П.Н. Абомазо-руминальный рефлюкс – фактор нарушения обмена веществ у высокопродуктивных молочных коров / Вестник ОрелГАУ, №5 (26), 2010.– С.91–94.

4 Безбородов П.Н. Отечественные и зарубежные скрининг-тесты для диагностики воспалительного процесса острой фазы у молочных коров / «Развитие аграрного сектора в условиях вступления России в ВТО: проблемы и перспективы» : материалы Международной научно-практической конференции, Ч.2 – Смоленск.: Изд-во Смоленской ГСХА, 2012.–С.40–46.

5 H. Pfannkuche, D. Reiche, S. Hoppe, M. Schemann. Cholinergic and Noncholinergic Innervation of the Smooth Muscle Layers in the Bovine Abomasum / The anatomical record (267), 2002.– P. 70–77.

6 T.J. Parkinson, J.J. Vermunt and J. Malmo. Diseases of Cattle in Australasia / A comprehensive textbook : New Zealand Veterinary Association Foundation for Continuing Education, Wellington, 2010.

7 O.M. Radostits, C.C. Gay, K.W. Hinchcliff, P.D. Constable / Veterinary Medicine, 10th Edition., 2007.– P. 346–350.

8 J. Rehage, M. Kaske, N. Stockhofe-Zurwieden, E. Yalcin. Evaluation of the pathogenesis of vagus indigestion in cows with traumatic reticuloperitonitis / J. Am. Vet. Med. Assoc. Dec 15; 207(12), 1995.– P.1607–11.

9 U. Braun, S. Rauch, M. Hässig. Ultrasonographic evaluation of reticular motility in 144 cattle with vagal indigestion. / Veterinary Record (164), 2009. – P.11–13.

10 U. Braun, K. Hausammann, C. Oertle. Vagus indigestion in 20 cows as a result of failure of omasal transport. / Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, Vol. 103, № 6. –1990. –P. 192–197.

11 N. Sattler, G. Fecteau, P. Hélie, J.M. Lapointe, L. Chouinard, M. Babkine, A. Desrochers, Y. Couture, P. Dubreuil. Etiology, forms, and prognosis of gastrointestinal dysfunction resembling vagal indigestion occurring after surgical correction of right abomasal displacement. / Can. Vet. J. v.41 (10), Oct. 2000 – P. 777–785.

12 Y. Gul, M. Issi. Evaluation of glutaraldehyde test and amount of rumen content chlorine in cases of vagal indigestion (Hoflund syndrome) due to reticuloperitonitis traumatica. / Veterinarski arhiv 79 (4), 2009. – P. 351–360.

13 Интернет-сайт, посвященный ветеринарным проблемам животноводства: «Flock and Herd. Case Notes». www.flockandherd.net.au [Электронный ресурс] : статья B.Watt. Vagus indigestion in an angus cow / Tablelands Livestock Health and Pest Authority, Bathurst, Австралия. Режим доступа:<http://www.flockandherd.net.au/cattle/reader/vagus%20indigestion.html> – от 25.09.2013.

14 Ветеринарный интернет-портал «The Merck Veterinary Manual» компании «Merck & Co., Inc». (1955-2013). www.merckmanuals.com/vet/ [Электронный ресурс] : статья P.D. Constable. Vagal Indigestion Syndrome in Ruminants (Chronic indigestion).- 2013. Режим доступа:http://www.merckmanuals.com/vet/digestive_system/diseases_of_the_ruminant_forestomach/vagal_indigestion_syndrome_in_ruminants.html?qt=vagus&alt=sh – от 25.09.2013.

15 Официальный интернет-сайт университета г. Пердью (США) с библиотечной-депозитарием. www.addl.purdue.edu [Электронный ресурс] : статья J.Russo, L. Andrews-Jones. Vagus Indigestion in Dairy and Beef Cattle / в разделе «Fall 1996. Newsletter». Режим доступа: <https://www.addl.purdue.edu/newsletters/1996/fall/vagus.shtml> – от 25.09.2013.

16 Некоммерческий интернет-сайт «РГАУ-МСХА. Зооинженерный факультет» с библиотекой-депозитарием. www.activestudy.info [Электронный ресурс] : раздел Лекции / Нервные болезни животных / Парезы и параличи блуждающих нервов. Режим доступа: <http://www.activestudy.info/parezy-i-paralichi-bluzhdayushhix-nerвов/> – от 25.09.2013. 17. Официальный сайт министерства высшего образования Арабской республики Египет. www.developmentvet.aun.edu.eg [Электронный ресурс] : раздел сайта «Faculty of Veterinary Medicine, Assiut University» / файл-краткий обзор проф. Ahmed A.Aamer «Abdominal Distension». Режим доступа: <http://www.developmentvet.aun.edu.eg/New%20Microsoft%20Word%20Document.pdf> – от 25.09.2013.

17 Официальный сайт министерства высшего образования Арабской республики Египет. www.developmentvet.aun.edu.eg [Электронный ресурс] : раздел сайта «Faculty of Veterinary Medicine, Assiut University» / файл-краткий обзор проф. Ahmed A. Aamer «Abdominal Distension». Режим доступа: <http://www.developmentvet.aun.edu.eg/New%20Microsoft%20Word%20Document.pdf> – от 25.09.2013.

Кучинский М.П., доктор ветеринарных наук
Малиновский И.Ф., кандидат ветеринарных наук
Новикова О.Н., кандидат ветеринарных наук
Кучинская Г.М., научный сотрудник

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

ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА И ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У СВИНЕЙ

ВВЕДЕНИЕ

Желудочно-кишечные и респираторные болезни молодняка, в этиологии которых такие инфекционные агенты, как вирусы и микробы играют ведущую роль, относятся к наиболее важным проблемам современного животноводства Республики Беларусь [1, 2, 3]. У некоторых из возбудителей вирулентные и патогенные свойства значительно повышаются на фоне неблагоприятных условий содержания и неполноценного кормления животных, что довольно часто наблюдается в наших хозяйствах.

Большинство исследователей считает, что при смешанных инфекциях в качестве первичного возбудителя выступают вирусы, а вторичное инфицирование уже происходит за счет бактерий. Вирусы, размножаясь в клетках эпителия слизистых оболочек желудочно-кишечного и респираторного тракта, вызывают нарушение их целостности, что способствует колонизации и проникновению бактерий и развитию тяжелых патологических процессов.

Известно также, что многие вирусные заболевания наслаиваются на бактериальные и протекают совместно с ними, негативно влияя на функционирование многих органов и систем, включая и иммунную. По данным некоторых исследователей, ассоциации вирусов и бактерий играют основную роль в этиологии массовых гастропневмоэнтеритов молодняка [4].

В комплексе мероприятий по профилактике и ликвидации инфекционных болезней животных, наряду со специфическими средствами защиты, важная роль отводится и фармакологическим препаратам.

В практике современного животноводства достаточно много используется лекарственных средств антимикробного спектра действия. Выбор же препаратов для лечения животных, больных вирусными заболеваниями, весьма ограничен. Это касается и инъекционных препаратов, позволяющих одновременно эффективно бороться с бактериальными и вирусными пато-

генами. В Республике Беларусь зарегистрирован и используется импортный препарат «Рибафлор» (производитель – фирма Marichem AG, Швейцария), содержащий в своем составе энрофлоксацин и рибавирин.

В связи с тем, что в последние годы в республике уделяется большое внимание импортозамещению и расширению ассортимента отечественных средств защиты животных, весьма актуальным является создание комплексных препаратов нового поколения на основе антимикробных и антивирусных субстанций, эффективных при ассоциативных инфекциях.

Целью настоящей работы явилось изучение острой токсичности и специфической эффективности нового комплексного препарата «Ципровирин», созданного на основе ципрофлоксацина и рибавирина, предназначенного для лечения ассоциативных болезней молодняка сельскохозяйственных животных. Исследования выполнялись в рамках задания «Разработать и внедрить в производство технологию изготовления комплексного инъекционного препарата, обладающего антибактериальным и антивирусным действием, для профилактики и терапии инфекционных заболеваний молодняка с/х животных» ГП «Инновационные биотехнологии» (2010–2012 годы).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в отделе токсикологии и незаразных болезней животных и виварии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Для изготовления препарата в качестве антивирусного компонента был использован рибавирин и противобактериальный компонент ципрофлоксацин.

Острую токсичность препарата изучали согласно «Методическим указаниям по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемым в ветеринарии» [5].

Опыты проведены на 70 белых мышах обоего пола, разделенных на 7 равных групп, массой тела 20–22 г. Животные содержались на стандартном рационе со свободным доступом к корму и воде. Препарат вводили натошак в желудок с помощью шприца с металлическим зондом. Испытаны следующие дозы препарата: 5000, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000 и 35000 мг/кг массы тела.

После введения препарата за мышами вели постоянное клиническое наблюдение в течение 14 дней, учитывая поведенческие реакции, поедаемость корма, время возникновения и характер проявления интоксикации, сроки наступления гибели животных. Павших животных подвергали патологоанатомическому исследованию. Расчет параметров острой токсичности проводили по методу Кербера.

Противовирусную активность изучали на лабораторной модели инфекции гриппа А1/Н1N1 [6]. В работе использовали 50 белых мышей массой 6 – 8 г. Вируссодержащую экстраэмбриональную жидкость вводили

белым мышам внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл/мышь, что соответствовало ЛД₁₀₀. Через сутки после заражения мышей лечили препаратом. В эксперименте изучали лечебную эффективность препарата при различных схемах его применения и различных дозах. Препарат дозировали по рибавирину, инъецируя его мышам подкожно в дозе 1,5 мг/кг живой массы (предполагаемая терапевтическая доза) однократно и 5-тикратно. Лечение подопытных мышей начинали через 24 часа после заражения. Одновременно контрольным животным вводили вируссодержащую жидкость по такой же схеме и в количестве, как и опытным мышам. Оценку противовирусной активности проводили по количеству погибших и выживших опытных лабораторных животных в сравнении с контрольными.

Исследования по определению бактерицидной активности ципрофлоксацина осуществляли по следующей схеме:

- проводили пошаговое разведение дистиллированной водой ципрофлоксацина от 1,6 до 0,01 % концентрации;

- суточные агаровые культуры *Escherichia coli* A20, *Salmonella dublin*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* смывали физиологическим раствором (рН 7,2–7,4) с МПА и доводили концентрацию бактериальной взвеси с помощью денситометра (McFarland Densitometer, Biosan Ltd.) до 10⁹ микробных тел/мл, затем 10 мкл взвеси смешивали с 10 мл стерильного физиологического раствора;

- в чашки Петри вносили по 15 мл 4% МПА;

- предварительно подготовленный 1,4–1,6% (мягкий) мясопептонный агар в пробирках охлаждали до температуры 50 °С и в него вносили 100 мкл микробной взвеси тест-бактерий. Содержимое в пробирках энергично перемешивали и сразу же наносили вторым слоем в чашку Петри, равномерно распределяя методом растекания.

После застывания агара готовили лунки диаметром 7 мм и вносили ципрофлоксацин в определенной концентрации в каждую лунку. Учет результатов проводили через 24 часа термостатирования при температуре 37 °С. Степень антибактериальной активности оценивали с помощью измерения зоны задержки роста индикаторной культуры вокруг лунки с исследуемым образцом препарата.

Клинические испытания по определению лечебной эффективности ципровирина на поросятах проведены в СПК «Боровое 2003» Дзержинского района Минской области на СТФ «Петрашевичи», стационарно неблагополучной в последние 2 года по респираторно-репродуктивному синдрому свиней (РРСС). Течение данного заболевания было осложнено условно-патогенной микрофлорой (пастереллы). Диагноз был подтвержден лабораторными исследованиями биоматериала от больных и павших животных.

Заболевания диагностировали у поросят 30–35-тидневного возраста, находившихся под свиноматками. Заболевало от 10 до 100% животных. Клинически они проявлялись отставанием в росте и развитии, истощением,

снижением аппетита, жаждой, диареей, синюшностью ушей и кожи живота. В течение 5–7 дней наблюдался значительный отход молодняка, в среднем, 50 – 70%. В отдельных случаях смертность достигала 100%.

Из больных поросят было сформировано четыре опытные и одна контрольная группы по 10 голов в каждой.

Поросятам первой и второй опытных групп препарат вводили внутримышечно один раз в сутки в дозе 150 мг/кг массы тела в течение 3 и 5 дней.

Поросятам третьей и четвертой опытных групп препарат инъецировали в дозе 250 мг/кг массы тела однократно в сутки в течение 3 и 5 дней.

Поросятам контрольной группы применяли ветеринарный препарат-аналог «Рибафлор» производства Швейцарской фирмы «Mérieux» согласно инструкции по его применению.

За поросятами всех групп в период проведения лечебных мероприятий и в течение 7 – 10 дней по их окончании вели клиническое наблюдение. Условно выздоровевшими считали поросят, у которых отсутствовали гипертермия и стабилизировался клинико-функциональный статус.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ результатов изучения острой токсичности показал, что при однократном внутрижелудочном введении мышам ципровирин в дозе 5000 мг/кг в течение всего срока наблюдения клинических признаков интоксикации не наблюдалось. Клинико-функциональный статус у всех животных не имел отклонений от нормы. В течение опытного периода гибели мышей в группе не было.

Препарат в дозе 10000 мг/кг вызвал у 2 особей снижение двигательной активности и реакции на внешние раздражители. Подобное состояние наблюдалось 1,5 – 2 часа. У остальных мышей данной группы клинических признаков интоксикации не было. В течение срока наблюдения все 10 мышей оставались живыми.

Препарат в дозе 15000 мг/кг через 1,5–2 часа вызвал у 2-х мышей снижение двигательной активности и ослабление реакции на внешние раздражители. У одного животного впоследствии развилось коматозное состояние и оно погибло через 5 часов после введения препарата. Больше гибели животных в данной группе не было.

Внутрижелудочное введение препарата в дозе 20000 мг/кг приводило к снижению двигательной активности и ослаблению реакции на внешние раздражители у 5 мышей. Через 2–3 часа у 2-х мышей возникла кома, и они погибли через 4–4,5 часа после введения ципровирин. У 3-х больных животных стабилизация клинико-функционального статуса произошла через 24 часа. У остальных 5 мышей данной группы после введения препарата клинических признаков интоксикации не отмечено.

У всех мышей после введения ципровирин в дозе 25000 мг/кг

наблюдались клинические признаки интоксикации в виде снижения двигательной активности и угнетения, переходящего у 7 особей в кому. В течение суток эти животные погибли. Три мыши из данной группы оставались живыми в течение всего опытного периода.

У всех мышей через 25–30 минут после введения препарата в дозе 30000 мг/кг развилась гипо- и адинамия и угнетение, а у 9 особей развилась кома. Гибель животных наблюдалась в течение 2 – 2,5 часов после обработки.

После внутрижелудочного введения препарата в дозе 35000 мг/кг у всех мышей отмечена адинамия и кома. В данной группе в течение 2-х часов погибли все животные.

При патологоанатомическом исследовании органов погибших животных установлено кровенаполнение печени и почек, незначительное увеличение в объеме сердца и катарально-геморрагические изменения в желудочно-кишечном тракте.

При расчете параметров острой токсичности установлено, что ЛД₅₀ при пероральном введении ципровирин белым мышам составила 23000 мг/кг массы тела.

Препарат в дозе 5000 мг/кг массы тела при пероральном применении не вызывает интоксикации и гибели животных, т.е. является безвредным.

Анализ результатов бактерицидной активности препарата *in vitro* показал, что начиная с 0,001% концентрации ципрофлоксацин вызывает задержку роста всех испытанных тест-бактерий. Причем, диаметр зон задержки роста начинает возрастать с ростом концентрации действующего вещества в лунке и составляет от 11 мм до 23 мм.

Изучение противовирусной активности *in vivo* показало, что однократное введение ципровирин в дозе 1,5 мг/кг не оказывало лечебного эффекта, гибель мышей в этой группе составила 100%. Курсовое введение препарата в дозе 1,5 мг/кг в течение 5 суток сопровождалось выраженным терапевтическим эффектом. Все мыши этой группы остались живы, при этом у них не отмечалось признаков инфекционного заболевания. Гибель мышей в контрольной группе составила 100%.

Таким образом, по результатам эксперимента выявлена 100% терапевтическая эффективность препарата в дозе 1,5 мг/кг при его курсовом введении в течение 5 суток.

Клинические испытания на поросятах показали, что наиболее рациональной схемой применения препарата при ассоциативных болезнях является курсовое лечение продолжительностью 3–5 дней, приводящее к выздоровлению в течение 5,0–5,4 суток. У импортного аналога терапевтическая эффективность была аналогичной.

ВЫВОДЫ

1 На лабораторной модели инфекции гриппа A1/H1N1 у мышей установлена терапевтическая эффективность ципровирина. При подкожном введении мышам в дозе 1,5 мг/кг ежедневно в течение 5 суток терапевтический эффект ципровирина составил 100%.

2 Ципрофлоксацин, входящий в состав препарата, в концентрации 0,001% и выше оказывает бактерицидную активность *in vitro*, что проявляется в задержке роста тест-бактерий. С повышением концентрации действующего вещества в агаре диаметр зон задержки роста увеличивается.

3 Среднесмертельная доза ЛД₅₀ ципровирина при внутрижелудочном введении для белых мышей составляет 23000 мг/кг массы тела, что согласно ГОСТ 12.007 – 76 позволяет отнести препарат к 4 классу опасности.

4 При смешанных вирусно-бактериальных инфекциях поросят оптимальной терапевтической дозой препарата является – 150,0 мг/кг массы тела, а наиболее рациональной схемой следует считать его курсовое применение в течение 3 – 5 дней.

Дальнейшие исследования по оценке специфической эффективности комплексного препарата, обладающего бактерицидным и вирулицидным действием, позволяет разработать схему его применения при моно- и ассоциативных инфекционных болезнях молодняка сельскохозяйственных животных и рекомендовать для применения в практике ветеринарной медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1 Красочко, П.А. Эффективность использования рекомбинантного интерферона и пробиотиков при терапии респираторных заболеваний теллят / П. А. Красочко, И.В. Чуенко // Материалы IV Съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов России «Актуальные вопросы ветеринарной фармакологии, токсикологии и фармации» : 16–17 мая 2013 г., Москва / ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К. И. Скрябина». – Воронеж, Изд-во «Истоки», 2013. – С. 359–361.

2 Малиновский, И.Ф. Профилактика отечной болезни поросят послеотъемного периода выращивания / И.Ф. Малиновский, М.П. Кучинский // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – 2011. – №1. – С.27–32.

3 Пукшлис, А.И. Характеристика факторов патогенности бактерий *Escherichia coli* и их значение в диагностике и специфической профилактики / А.И. Пукшлис, Ю.В. Ломако // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – 2011. – №2. – С.29–35.

4 Красочко, П.А. Изучение антипролиферативных и антивирусных свойств интерферонов в системе *in vitro* / П. А. Красочко, А.С. Ястребов, Д.С. Борисов. // Материалы IV Съезда ветеринарных фармакологов и ток-

сикологов России «Актуальные вопросы ветеринарной фармакологии, токсикологии и фармации»: 16-17 мая 2013 г., Москва / ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К. И. Скрябина». – Воронеж, Изд-во «Истоки», 2013. – С. 361–364.

5 Высоцкий, А.Э. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии / А.Э. Высоцкий, М.П. Кучинский, Б.Я. Бирман [и др.]. – Мн., 2007. – 156 с.

6 Новикова О.Н. Адаптация вируса гриппа А1/Н1N1 к белым мышам для оценки терапевтической эффективности рибавирина и сапонина./О.Н. Новикова, А.А. Згировская, Ю.В. Ломако, А.А. Гусев, // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария.– 2010. –№1. – С.3 – 6.

Насонов И.В., доктор ветеринарных наук

Черник М.И., кандидат ветеринарных наук

Капанский А.А., кандидат сельскохозяйственных наук

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

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА «ФЕНБЕНДАФАРМ 22,5%» ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ГЕЛЬМИНТОЗОВ РЫБ

ВВЕДЕНИЕ

Республика Беларусь располагает огромными пространствами внутренних водоёмов, большинство из которых имеют главное значение при выращивании рыбы и гидробионтов, а также служат для снабжения водой населения и различных производственных объединений. В связи с сокращением ресурсов Мирового океана и внутренних водоёмов аквакультура приобретает все большее значение. Многие считают ее индустрией будущего, т.к. по продуктивности она значительно превосходит культивирование наземных животных. Так, если средняя промысловая биомасса наземных охотничьих позвоночных не превышает 1 кг/га, то средняя промысловая биомасса рыб в водоеме достигает 75–150 кг/га, а при проведении мероприятий по интенсификации рыбоводства способна увеличиваться до 300–500 кг/га.

Мясо рыб богато фосфором, аминокислотами, витаминами и микроэлементами, отсутствующими в других пищевых продуктах. Оно легко усваивается организмом и рекомендуется как диетическое питание. По содержанию протеина (16–18%) мясо рыб мало отличается от мяса крупного рогатого скота, свиней и птиц, но в то же время содержит в 5 раз меньше соединительной ткани, что обеспечивает быстрое разваривание и нежную консистенцию после тепловой обработки. Только в рыбе содержится докеновая кислота (ДГК), являющаяся составным элементом ткани головного мозга и играющая существенную роль в формировании здоровой нервной системы и зрения. В разных странах на долю рыбы приходится от 18 до 83 % белкового рациона человека [1].

На сегодняшний день в рыбохозяйственных водоемах республики регистрируются более 60 ихтиопатогенов, относящихся к 12 систематическим группам паразитических организмов. Это – вирусы, бактерии, грибы, простейшие, моногенгеи, нематоды, трематоды, цестоды, скребни, пиявки, юниониды и ракообразные [2]. Следует учитывать, что рыба может быть источником заболеваний человека и теплокровных животных [3].

Наличие такого множества ихтиопатогенов связано как с разнообразием форм хозяйствования в республике, так и с выращиванием различных по видовому составу рыб.

Игнорирование вопросов, связанных с болезнями различных представителей прудовых рыб, рано или поздно приведет рыбоводное хозяйство к большим экономическим потерям. Для того чтобы избежать их, необходимо организовать регулярный ихтиопатологический мониторинг. Успехи современного рыбоводства зависят в значительной степени от обеспечения его эпизоотического благополучия. Устойчивого эпизоотического благополучия рыбоводческих предприятий и рыбохозяйственных водоемов можно достичь лишь при своевременном и тщательном выполнении всего комплекса лечебных и профилактических мероприятий, предусматривающих высокий уровень ветеринарной, санитарной, рыбоводной и агромелиоративной культуры производства, созданием оптимальных экологических условий в прудах, рыбохозяйственных водоемов. Значительный объем исследований по изучению этиологии заболеваний рыб и разработке мер борьбы и профилактики выполняет на текущий момент РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им С.Н. Вышелесского».

В последнее время в ветеринарной практике широкое применение нашли лечебные корма с добавлением антгельминтиков широкого спектра действия.

В связи с этим интерес представляет современный препарат «Фенбендафарм 22,5%» производства СП «Ветинтерфарм ООО», (г. Минск), рекомендуемый для оздоровления сельскохозяйственных животных при гельминтозах.

Целью наших исследований было изучение возможности использования в прудовом рыбоводстве и расширение сферы применения препарата «Фенбендафарм 22,5%» при кавиозе, кариофиллезе, ботриоцефалезе, филометроидозе и смешанных цестодозах рыб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились в лаборатории болезней рыб и пчел отдела болезней птиц РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и ОАО «Рыбхоз «Волма» Червенского района Минской области.

Рыба содержалась в прудах площадью 80-120 га с карпом как в монокультуре, так и в условиях поликультуры (карп+амур; карп+толстолобик, карась как сорная рыба имеется во всех прудах).

Плотность заселения составляла (в шт./га): карпа - 600 (соотношение зеркальных и чешуйчатых особей 1:1), толстолобика - 400, белого амура - 300.

Исследования проводили на нагульных прудах №6 и №1, где содержалась рыба в поликультуре. Препарат применяли с лечебно-

профилактической целью прудовой рыбе путем скармливания групповым способом с комбикормом в дозе 5 кг «Фенбендафарм 22,5%» на одну тонну комбикорма.

Гранулированный комбикорм был изготовлен заводским способом.

Препарат «Фенбендафарм 22,5%» применяли прудовой рыбе в нагульном пруде №6, путем скармливания его с комбикормом для профилактики кавиоза (*Knawia sinensis*), кариофиллеза (*Caryophyllaeus fimbriiceps*), ботриоцефалеза (*Bothriocephalus acheilognathi*) и смешанных цестодозов.

Пруд №1 являлся контрольным, где скармливался комбикорм без препарата.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При проведении контрольного облова прудов температура воды составляла +18,5⁰С, воздуха +20,0⁰С.

Клиническому и ихтиопатологическому исследованию подвергнуто по 40 экземпляров двухлетков из нагульных прудов №1 и №6 из разных участков водоема с целью определения видовой принадлежности гельминтов, экстенсивности (ЕИ) и интенсивности инвазии (ИИ) рыб кишечными гельминтами.

При вскрытии рыбы, которое провели до дегельминтизации, установлено, что ЕИ составляла 15% кавиоз, 18% филометроидоз, 10% ботриоцефалез. При этом у 35% инвазированных экземпляров выявили смешанную инвазию, когда в кишечнике регистрировали одновременно возбудителей ботриоцефалеза и кавиоза. Интенсивность инвазии (ИИ) рыб кишечными гельминтами была следующая: кавиоз 1-5; ботриоцефалез 1-3; филометроидоз 1-2. В 5% выявлено по 1 экз. возбудителей кариофиллеза.

При клиническом осмотре двухлетков карпа признаков инфекционных заболеваний не выявлено. При патологоанатомическом вскрытии внутренние органы у рыб были в норме, без изменений.

Лечебный комбикорм вносили в места кормления из расчета 5% лечебного корма от массы рыбы один раз в день два дня подряд. Рыба активно поедала комбикорм. В контроле рыбу кормили обычным комбикормом без добавок.

За состоянием рыбы в течение трех суток велось наблюдение. На поверхности водоемов погибшая и больная рыба выявлена не была.

Через 7 дней после дегельминтизации было отобрано также по 40 экз. рыбы из прудов №1 и №6 для проведения гельминтологического вскрытия с целью определения эффективности дегельминтизации.

При вскрытии рыбы, которое провели после дегельминтизации, установлено, что рыба в прудах, где применялся препарат «Фенбендафарм 22,5%», полностью избавилась от паразитов.

В контроле (нагульный пруд №1) экстенсивность инвазии не изменилась.

В результате применения препарата с лечебно-профилактической целью прудовой рыбе путем скармливания групповым способом с комбикормом в дозе 5 кг препарата «Фенбендафарм 22,5%» (нагульный пруд №6) на одну тонну комбикорма рыба полностью избавилась от паразитов.

Для проведения ветеринарно-санитарной оценки были отобраны образцы рыб из опытных и контрольных прудов. По органолептическим, физико-химическим показателям и безвредности мышечная ткань рыб из опытных прудов спустя 14 дней после скармливания препаратов не имела достоверных отличий от контроля. Тест на безвредность рыбы (с использованием тест-объекта *Tetrahymena pyriformis*) на 10-ый день после скармливания препарата «Фенбендафарм 22,5%» свидетельствовал об отсутствии токсичности препарата.

При применении препарата у рыб не было отмечено побочных эффектов или осложнений. На протяжении опыта гибели рыбы в контрольных и опытных прудах не наблюдалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препарат «Фенбендафарм 22,5%» может быть рекомендован для терапии и профилактики кавиоза, кариофиллеза, ботриоцефалеза, филометроидоза и смешанных цестодозов рыб путем скармливания групповым способом с комбикормом 5 кг препарата на одну тонну комбикорма из расчета 5% лечебного корма от массы рыбы один раз в день два дня подряд.

ЛИТЕРАТУРА

1 Мамонтов, Ю.П. Современное состояние и перспективы развития аквакультуры в России: Автореф. дис. на соиск. уч. степ. докт. с.-х. наук — Краснодар : Кубан. гос. аграр. ун-т, 2000. — 58 с.

2 Безнос, Т.В. Андросик Н.Н. Видовое разнообразие паразитов рыб Республики Беларусь Тезисы докладов У11 Зоологической научной конференции: "Структурно-функциональное состояние биологического разнообразия животного мира Белоруссии", Минск, 1999.—С. 360–361.

3 Бауэр, О.Н. Болезни прудовых рыб. // 2-е изд. М., Легкая и пищевая промышленность [и др.], 1981. — 320с.

Насонов И.В., доктор ветеринарных наук

Черник М.И., кандидат ветеринарных наук

Капанский А.А., кандидат сельскохозяйственных наук

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

«АЛБЕНДАФАРМ 10%» В ЛЕЧЕНИИ И ПРОФИЛАКТИКЕ ГЕЛЬМИНТОЗОВ РЫБ

ВВЕДЕНИЕ

Рыбохозяйственная деятельность в Республике Беларусь представлена двумя основными направлениями: разведение и выращивание рыбы в искусственных условиях и ловля рыбы в рыболовных угодьях.

Аквакультура страны включает прудовое рыбоводство, выращивание рыбы в садках, бассейнах и в установках замкнутого водообеспечения.

В этом направлении работают специализированные рыбоводные организации, фермерские хозяйства, индивидуальные предприниматели, а также физические лица и другие организации, у которых рыбоводство не является основным видом деятельности.

Общая площадь прудового фонда, находящегося в ведении различных организаций, занимающихся разведением рыбы, составляет 29,96 тыс. га. Основным видом выращивания остается карп, однако его доля снижена с 90 до 75% в связи с наращиванием разведения толстолобика, белого амура, европейского сома и щуки.

По данным Министерства сельского хозяйства и продовольствия в Республике Беларусь за 2012 год было выращено 21,1 тыс. тонн прудовой рыбы, в том числе 16,6 тыс. т товарной и 4,2 тыс. т посадочного материала.

За 2006–2010 годы суммарное производство (реализация) товарной рыбы составило 61,7 тыс. тонн, что в 2,3 раза больше, чем в предыдущие пять лет. Реализация товарной рыбы с 2004 года по 2010 год выросла в 3,2 раза [1].

Главными задачами белорусских рыбоводов в ближайшие годы являются расширение видового состава, прежде всего за счет ускоренного наращивания объемов производства ценных видов рыб, таких как форель, осетровые и сомовые виды, а также качественное развитие ее переработки. Сейчас на их долю приходится около 1,5% от общего объема производства.

Однако успехи современного рыбоводства зависят в значительной степени от обеспечения его эпизоотического благополучия которое можно достичь лишь при своевременном и тщательном выполнении всего комплекса лечебных и профилактических мероприятий с использованием современных

препаратов [2]. В ветеринарной практике широкое применение нашли лечебные корма с добавкой антгельминтиков широкого спектра действия.

Интерес представляет современный препарат «Альбендафарм 10%» производства СП «Ветинтерфарм ООО», (г. Минск), рекомендуемый для оздоровления сельскохозяйственных животных при гельминтозах.

Целью наших исследований явилось расширение сферы применения препарата «Альбендафарм 10%» и изучение возможности его использования в прудовом рыбоводстве при кавиозе, кариофиллезе, ботриоцефалезе и смешанных цестодозах рыб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились в лаборатории болезней рыб и пчел отдела болезней птиц РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского» и ОАО «Рыбхоз «Волма» Червенского района Минской области.

Рыба содержалась в прудах площадью 80 – 120 га с карпом, как в монокультуре, так и в условиях поликультуры (каarp+амур; карп+толстолобик, карась как сорная рыба имеется во всех прудах).

Плотность заселения составляла (в шт./га): карпа – 500 (соотношение зеркальных и чешуйчатых особей 1:1), толстолобика – 300, белого амура – 200.

Исследования проводили на нагульных прудах №2 и №5, где содержалась рыба в поликультуре. Препарат использовали с лечебно-профилактической целью прудовой рыбе путем скармливания групповым способом с комбикормом в дозе 3 кг «Албендафарм 10%» на одну тонну комбикорма.

Лечебный комбикорм готовился заводским способом.

Препарат «Албендафарм 10%» применен на прудовой рыбе на нагульном пруде №2 путем скармливания его с комбикормом для профилактики кавиоза (*Knawia sinensis*), кариофиллеза (*Caryophyllaeus fimbriiceps*), ботриоцефалеза (*Bothriocephalus acheilognathi*) и смешанных цестодозов.

Пруд №5 являлся контрольным, где скармливался комбикорм в чистом виде.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При проведении контрольного отлова температура воды в прудах составляла +18,5⁰С, воздуха +20,0⁰С.

Клиническому и ихтиопатологическому исследованию подвергнуто по 40 экземпляров двухлетков из нагульных прудов №2, №5, выявленных из разных участков водоема с целью определения видовой принадлежности гельминтов, экстенсивности (ЕИ) и интенсивности инвазии (ИИ) рыб кишечными гельминтами.

При вскрытии рыбы, которое провели до дегельминтизации, установлено, что ЕИ составляла: 15% – кавиоз, 10% – ботриоцефалез. При этом у 35% инвазированных экземпляров выявили смешанную инвазию, когда в их кишечнике регистрировали одновременно возбудителей ботриоцефалеза и кавиоза. Интенсивность инвазии (ИИ) рыб кишечными гельминтами была следующая: кавиоз 1 – 5; ботриоцефалез 1 – 3. В 5% случаев выявлено по 1 экз. возбудителей кариофилеза.

При клиническом осмотре двухлетков карпа признаков инфекционных заболеваний не выявлено. При патологоанатомическом вскрытии внутренние органы у рыб в норме, без изменений.

Лечебный комбикорм вносили в места кормления из расчета 5% лечебного корма от массы рыбы один раз в день два дня подряд. Рыба активно поедала комбикорм. В контроле рыбу кормили обычным комбикормом без добавок.

За состоянием рыбы в течение трех суток велось клиническое наблюдение, на поверхности водоемов погибающая и больная рыба выявлена не была.

Через 7 дней после дегельминтизации было отобрано также по 40 экз. рыбы из прудов №2 и 5 для проведения гельминтологического вскрытия с целью определения эффективности дегельминтизации.

При вскрытии рыбы, которое провели после дегельминтизации, установлено, что рыба в опытных прудах, где применялся препарат «Албендафарм 10%», полностью избавилась от паразитов.

В контроле (нагульный пруд №5) экстенсивность инвазии не изменилась.

В результате применения препарата «Албендафарм 10%» с лечебно-профилактической целью прудовой рыбе путем скармливания групповым способом с комбикормом в дозе 3 кг (нагульный пруд №2) на одну тонну комбикорма 5% лечебного корма от массы рыбы один раз в день два дня подряд рыба полностью избавилась от паразитов.

Была проведена ветеринарно-санитарная оценка образцов рыбы из опытных и контрольных прудов. По органолептическим, физико-химическим показателям (рН, амино-амиачный азот, реакция на аммиак, сероводород, полипептиды, пероксидазу, редуктазная проба) и безвредности мышечная ткань рыб из опытных прудов спустя 14 дней после скармливания препаратов не имела достоверных отличий от контроля. Тест по определению безвредности рыбы (с использованием тест – объекта *Tetrahymena pyriformis*) на 10-ый день после скармливания препарата «Албендафарм 10%» свидетельствовал об отсутствии токсичности испытуемого препарата.

При применении препарата у рыб не было отмечено побочных эффектов или осложнений. На протяжении опыта гибели рыбы в контрольных и опытных прудах не наблюдалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препарат «Албендафарм 10%» может быть рекомендован для терапии и профилактики кавиоза, кариофиллеза, ботриоцефалеза и смешанных цестодозов рыб путем скармливания групповым способом с комбикормом в дозе 3 кг препарата на одну тонну комбикорма из расчета 5% лечебного корма от массы рыбы один раз в день два дня подряд.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 <http://www.mshp.minsk.by/sh/animal/fish/>
- 2 Мамонтов Ю.П. Современное состояние и перспективы развития аквакультуры в России: Автореф. дис. на соиск. уч. степ. докт. с.-х. наук — Краснодар: Кубан. гос. аграр. ун-т, 2000. — 58 с.

Кучинский М.П., доктор ветеринарных наук, доцент
Калюта Л.Л., младший научный сотрудник

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

ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА «ПОЛИВИСОЛ» ПРИ ДИАРЕЕ У НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания желудочно-кишечного тракта с симптомокомплексом диареи являются основной причиной гибели телят в первые недели жизни. Широкое распространение данной группы болезней объясняется их полиэтиологичностью. Среди множества факторов, которые могут вызывать диарею, выделяют инфекционные (бактерии, вирусы, гельминты, простейшие и их ассоциации), а также неинфекционные или алиментарно-функциональные, связанные, главным образом, с нарушением технологии получения и выращивания молодняка [2]. Известно, что диарея у телят сопровождается большими потерями жидкости, а несформированность механизмов регуляции водно-электролитного обмена обуславливает быстрое развитие эксикоза, приводящего к гибели животного [3]. Адекватная водовосполняющая терапия позволяет поддерживать теленка до восстановления функции желудочно-кишечного тракта и поэтому является ключевым фактором, определяющим успех лечения животного с диареей. Регидратация подразумевает не только возмещение дефицита жидкости, но и коррекцию кислотно-основных и электролитных нарушений, восстановление гемодинамики и микроциркуляции, устранение гипоксии органов и тканей, дезинтоксикацию.

Целью настоящего исследования было изучение терапевтической эффективности при диспепсии у телят нового препарата «Поливисол», разработанного в отделе токсикологии и незаразных болезней животных РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Испытуемый препарат представляет собой дезинтоксикационный раствор для внутривенного введения. В его состав входит низкомолекулярный поливинилпирролидон, хлориды натрия, кальция и магния, ацетаты натрия и калия. Активным компонентом препарата является полимер поливинилпирролидон, обладающий способностью связывать и выводить из организма циркулирующие в крови токсины. При введении поливинилпирролидона в сосудистое русло возрастает коллоидно-осмотическое давление и увеличивается объем внутрисосудистой жидкости. Также поливинилпирролидон способствует ликвидации стаза эритроцитов в капиллярах, в результате

чего уменьшаются явления кислородного голодания органов и тканей [1]. Катионы натрия, калия, кальция и магния участвуют в поддержании водно-солевого баланса, осмотического давления и pH среды, регулируют проницаемость мембран, внутриклеточный обмен различных метаболитов, процессы нервной возбудимости и мышечных сокращений. Органический анион ацетат подвергается метаболизму в скелетной мускулатуре с высвобождением гидрокарбонатного иона, который вступает в буферные реакции кислотно-основного равновесия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические испытания были проведены на базе СПК «Валище» Пинского района Брестской области. Хозяйство благополучно по инфекционным заболеваниям крупного рогатого скота, вакцинация и дегельминтизация поголовья проводится согласно утвержденной схемы. Для эксперимента были сформированы две опытные группы телят (первая и вторая) в возрасте 5 – 10 дней с клиническими признаками диспепсии. Группы формировались в соответствии с принципом условных аналогов по мере выявления больных животных.

Для регидратационной терапии телятам первой опытной группы применяли раствор Рингера-Локка, молодняку второй опытной – аналогичный раствор, а также дополнительно поливисол в дозе 10 – 15 мл/кг массы тела. Растворы телятам вводили внутривенно с соблюдением правил асептики и антисептики два раза в сутки. Общий объем инфузий, необходимый для введения, определяли исходя из степени обезвоживания и потребности животных в жидкости в соответствии с существующими рекомендациями [4]. При восстановлении у телят аппетита и сосательного рефлекса инфузионную терапию прекращали. С целью недопущения активизации условно-патогенной микрофлоры молодняку обеих групп применяли антибактериальный препарат «Амоксициллин 15%», согласно инструкции. Телята опытных групп находились в одинаковых условиях содержания. Наблюдения за животными вели на протяжении всего периода терапевтических мероприятий и еще 10 – 14 дней после выздоровления. При этом учитывали продолжительность болезни, выраженность клинических признаков и сохранность молодняка. К условно выздоровевшим относили телят, у которых прекращалась диарея, восстанавливался аппетит и исчезали признаки эксикоза. Образцы цельной крови (стабилизированной гепарином) для гематологических исследований отбирали по следующей схеме: в первый день опыта (до начала терапии), на второй и третий дни лечения и спустя одни сутки после клинического выздоровления. Для корректной интерпретации результатов лабораторных исследований также произвели отбор проб крови от клинически здоровых (активных, с хорошим аппетитом, блестящим шерстным покровом) телят (n=10), которые составили группу контроля. В цельной крови определяли количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, концен-

трацию гемоглобина, гематокрит, среднее содержание и концентрацию гемоглобина в эритроците.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При клиническом осмотре заболевших телят регистрировали следующие симптомы: депрессия, общая слабость, отсутствие аппетита и сосательного рефлекса, снижение реакции на внешние раздражители. Со стороны пищеварительной системы: усиление перистальтических шумов, учащение акта дефекации, выделение неоформленных фекалий от жидкой до водянистой консистенции, в некоторых случаях – с прожилками слизи и включениями крови. Также отмечали признаки эксикоза: уменьшение эластичности кожи, сухость и бледность видимых слизистых оболочек, снижение скорости наполнения капилляров, западение глазных яблок и пр. По мере выявления больные животные включались в опытные группы и подвергались терапии, описанной в разделе «Материалы и методы».

В ходе эксперимента нами были установлены некоторые различия между группами животных как по длительности заболевания, так и по характеру проявления симптомов болезни. Так, телята, получавшие раствор Рингера-Локка и поливисол, лучше реагировали на проводимую терапию. В большинстве случаев на второй-третий день лечения у животных восстанавливался ментальный статус и сосательный рефлекс, что, вероятно, было связано с ликвидацией гиповолемии и нормализацией кислотно-основного равновесия. Также уменьшались или исчезали симптомы эксикоза (сухость и бледность видимых слизистых оболочек, пониженная температура конечностей, западение глазных яблок и пр.). При еще сохраняющейся диарее у телят появлялся аппетит, они становились подвижнее, проявляли интерес к окружающей обстановке. Восстановление клинико-функционального статуса телят первой опытной группы происходило в более длительные сроки. При этом как системные симптомы (эксикоз, депрессия), так и нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта сохранялись дольше и были более выражены. Средняя продолжительность болезни молодняка первой опытной группы составила $4,6 \pm 0,22$ дня, а второй опытной – $3,7 \pm 0,15$ дня ($P < 0,01$). Среднее количество дней инфузионной терапии у телят первой опытной группы составило $3,3 \pm 0,21$ дня, а второй – $2,4 \pm 0,27$ ($P < 0,05$). Падежа животных в обеих группах не было. Важно отметить не только достоверное сокращение длительности диареи, но и продолжительности инфузионной терапии. Последнее актуально, поскольку восстановление у телят сосательного рефлекса позволяет заменить внутривенное введение жидкости на пероральную регидратацию, что менее трудоемко и более физиологично.

В результате гематологических исследований было установлено повышение показателей «красной крови» у молодняка с диареей. Так, в 1-ый день исследования количество эритроцитов у больных телят было выше,

чем у здоровых сверстников на 37,62% ($P<0,001$) и 49,53% ($P<0,001$), уровень гематокрита – на 41,38% ($P<0,001$) и 51,72% ($P<0,001$), концентрация гемоглобина – на 25,86% ($P<0,001$) и 28,09% ($P<0,001$) соответственно в первой и второй опытных группах. Очевидно, что повышение этих показателей имело относительный характер и было обусловлено уменьшением объема плазмы вследствие обезвоживания организма. Количество лейкоцитов, напротив, было ниже, чем у здоровых животных – на 17,46% и 35,19% ($P<0,05$) в первой и второй опытной группах соответственно, что, видимо, было связано с потерей этих клеток через желудочно-кишечный тракт.

Динамика гематологических показателей телят опытных групп в ходе терапии представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Гематологические показатели телят первой и второй опытных групп в разные сроки эксперимента ($M\pm m$)

Группы животных	Стартовый этап	2-ой день лечения	3-ий день лечения	Одни сутки после клин.выздоровления
Эритроциты $\times 10^{12}/л$				
1-я опытная	10,17 $\pm$ 0,40	10,74 $\pm$ 0,44	9,67 $\pm$ 0,31	7,16 $\pm$ 0,43
2-я опытная	11,05 $\pm$ 0,53	9,83 $\pm$ 0,45	8,58 $\pm$ 0,27*	6,96 $\pm$ 0,22
Гематокрит, л/л				
1-я опытная	0,41 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,01
2-я опытная	0,44 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,01*	0,34 $\pm$ 0,01*	0,28 $\pm$ 0,01
Гемоглобин, ммоль/л				
1-я опытная	12,41 $\pm$ 0,20	12,11 $\pm$ 0,35	10,36 $\pm$ 0,65	9,01 $\pm$ 0,49
2-я опытная	12,63 $\pm$ 0,41	11,25 $\pm$ 0,23	9,81 $\pm$ 0,57	9,37 $\pm$ 0,47
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, фмоль				
1-я опытная	1,35 $\pm$ 0,01	1,44 $\pm$ 0,09	1,45 $\pm$ 0,07	1,70 $\pm$ 0,10
2-я опытная	1,38 $\pm$ 0,02	1,52 $\pm$ 0,09	1,55 $\pm$ 0,09	1,52 $\pm$ 0,04
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, ммоль/л				
1-я опытная	33,92 $\pm$ 0,69	32,41 $\pm$ 0,76	34,76 $\pm$ 0,99	33,49 $\pm$ 1,00
2-я опытная	34,48 $\pm$ 0,77	33,91 $\pm$ 0,78	33,59 $\pm$ 0,92	35,27 $\pm$ 0,94
Лейкоциты, $\times 10^9/л$				
1-я опытная	6,38 $\pm$ 0,83	5,06 $\pm$ 0,60	4,70 $\pm$ 0,48	6,98 $\pm$ 0,89
2-я опытная	5,01 $\pm$ 0,68	4,81 $\pm$ 0,72	6,07 $\pm$ 0,37*	7,94 $\pm$ 0,78
Тромбоциты, $\times 10^9/л$				
1-я опытная	371,40 $\pm$ 32,02	344,40 $\pm$ 39,89	409,00 $\pm$ 51,13	403,90 $\pm$ 40,27
2-я опытная	399,10 $\pm$ 28,46	380,30 $\pm$ 48,23	393,50 $\pm$ 67,28	457,80 $\pm$ 61,81

Примечание – * достоверность различий по отношению к 1-ой опытной группе при уровне значимости $P<0,05$

На вторые сутки у телят второй группы количество эритроцитов уменьшилось на 11,04% и было ниже среднего значения телят первой опытной группы на 8,47%. Гематокрит у телят второй группы снизился на 13,64% и при этом был достоверно ниже этого показателя телят первой группы на 11,63% ($P<0,05$). На третьи сутки терапии количество эритроцитов у животных второй опытной группы было ниже, чем у телят первой группы на 11,27% ($P<0,05$), уровень гематокрита – на 12,82% ($P<0,05$), концентрация гемоглобина – на 5,31%. Количество лейкоцитов у молодняка второй опытной группы на данном этапе было выше, чем у телят первой группы на 29,15% ($P<0,05$). Спустя сутки после клинического выздоровления статистически значимых межгрупповых различий по показателям общеклинического анализа крови зарегистрировано не было.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что включение препарата «Поливисол» в схему лечения телят с симптомокомплексом диареи способствовало более эффективной регидратации и восстановлению объема внутрисосудистой жидкости. Это подтверждается стабилизацией гематологического профиля животных, а именно, устранением гемоконцентрации, что характеризовалось более низкими значениями показателей «красной крови» (количества эритроцитов, концентрации гемоглобина, гематокрита), зарегистрированными в ходе терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования было установлено, что новый ветеринарный препарат «Поливисол» обладает хорошей терапевтической эффективностью при диспепсии у телят. Применение поливисола в сочетании с раствором Рингера-Локка способствует сокращению длительности болезни, а также нормализации гематологического профиля и клинико-функционального статуса молодняка. На основании полученных результатов можно рекомендовать поливисол для применения телятам в качестве средства патогенетической терапии заболеваний желудочно-кишечного тракта, сопровождающихся диареей.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Гуменюк, Н.И. Инфузионная терапия / Н.И. Гуменюк, С.И. Киркилевский. – Киев: Книга плюс, 2004. – С. 140 – 142.
- 2 Карпуть, И.М. Иммунная реактивность и болезни телят: монография / И.М. Карпуть, С.Л. Борознов. – Витебск: УО ВГАВМ, 2008. – С. 52 – 53.
- 3 Calves with diarrhea and water-electrolyte balance / A. Dratwa-Chalupnik [et al.] // *Medycyna Wet.* – 2012. – Vol. 68, №1. – P. 5 – 8.
- 4 Naylor, J.M. Advances In Oral And Intravenous Fluid Therapy Of Calves With Gastrointestinal Disease / J.M. Naylor, G.A. Zello, S.Abeysekara // *World Buiatrics Congress, Nice, France, 2006.* – 13 p.

СОДЕРЖАНИЕ

Объедков Г.А. К ИСТОРИИ БЕЛОРУССКОГО РЕСПУБЛИКАНСКОГО УНИТАРНОГО ПРЕДПРИЯТИЯ «ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМ. С.Н. ВЫШЕЛЕССКОГО» (К 90—ЛЕТИЮ)	3
<i>ЭПИЗООТОЛОГИЯ, ДИАГНОСТИКА, ИММУНОЛОГИЯ БОЛЕЗНЕЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ</i>	
Аксенов А.М., Русинович А.А. ВЕТЕРИНАРНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ПО ОБЕСПЕЧЕНИЮ ЭПИЗООТИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ И БЕЗОПАСНОСТИ ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО СЫРЬЯ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ	14
Лизун Р.П., Даровских И.А. ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ПТИЧЬИХ ИЗОЛЯТОВ САЛЬМОНЕЛЛ В ЭПИДЕМИОЛОГИИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА	23
Литвиненко О.П., Неволько О.М., Неволько И.О. ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ЭПИЗООТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ЭХИНОКОККОЗНОЙ ИНВАЗИИ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ ЗА ПЕРИОД С 2004 ПО 2011 ГОД	28
Ивашкевич О.П. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ АКУШЕРСКО-ГИНЕКОЛОГИЧЕСКОЙ ПОМОЩИ ХОЗЯЙСТВАМ И НАУЧНЫЕ РАЗРАБОТКИ В ЭТОЙ ОБЛАСТИ – ВАЖНЕЙШЕЕ НАПРАВЛЕНИЕ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ОТДЕЛА ПАТОЛОГИИ РАЗМНОЖЕНИЯ	33
Ивашкевич О.П., Ботяновский А.Г. ЛЕЧЕНИЕ КОРОВ, БОЛЬНЫХ СКРЫТЫМ ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ	36
Неволько О.М., Красочко П.А., Дедок Л.А., Литвинчук О.В., Кравченко А.Л., Неволько И.О. СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ У ДИКИХ КАБАНОВ В УКРАИНЕ В 2005 – 2012 ГОДАХ	40
Головко А.Н., Пинчук Н.Г., Дмитриева Г.В. МОНИТОРИНГ СООТВЕТСТВИЯ ДЕЙСТВУЮЩЕЙ НОРМАТИВНО-ЗАКОНОДАТЕЛЬНОЙ БАЗЫ В УКРАИНЕ МЕЖДУНАРОДНЫМ РЕКОМЕНДАЦИЯМ ПО ОБЯЗАТЕЛЬНОМУ ПЕРЕЧНЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ В СЫРЬЕ И ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	45

Яненко У. Н., Гудзь Н. В., Яненко В. М., Ничик С.А. АНТИЛИЗОЦИМНЫЕ И ТОКСИНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ВАКЦИННОГО ШТАММА ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ <i>B. ANTHRACIS</i> UA -07	51
Сусский Е.В. ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ БАКТЕРИЙ И ВИРУСОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНО-КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА	56
Ломако Ю.В., Новикова О.Н., Гусев А.А., Пукшлис А.И., Конончик Е.С. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭНТЕРОТОКСИГЕННЫХ СВОЙСТВ АДГЕЗИВНЫХ ШТАММОВ <i>E. COLI</i>, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ МОЛОДНЯКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ	63
Ушкалов В.А., Ковтун В.А., Мачуский А.В. СОВЕРШЕНСТВО-ВАНИЕ СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА	69
Ковалев Н.А., Бучукур Д.В. ПЕРСПЕКТИВЫ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ БЕШЕНСТВА	77
Гусев А.А., Лемеш А.П., Красникова Е.Л. ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ, БОЛЕЗНИ АУЕСКИ И ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ И СТРАНАХ БЛИЖНЕГО И ДАЛЬНОГО ЗАРУБЕЖЬЯ	85
Ероховец Н.Ф., Гусев А.А., Згировская А.А., Ломако Ю.В., Конончик Е.С. К ВОПРОСУ О СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКЕ БОЛЕЗНИ АУЕСКИ СВИНЕЙ	97
Кухтын Н. Д., Перкий Ю. Б., Крушельницкая Н. В. ВЛИЯНИЕ ТРИПСИНА НА МИКРОБНЫЕ БИОПЛЕНКИ, СФОРМИРОВАННЫЕ БАКТЕРИЯМИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ С ДОИЛЬНОГО ОБОРУДОВАНИЯ И МОЛОКА СЫРОГО	106
Финогенов А.Ю., Финогенова Е.Г., Zubовский Д.К., Шимко О.В. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ СПОРТИВНЫХ ЛОШАДЕЙ ПРИ ФОНОФОРЕЗЕ ХОНДРОПРОТЕКТОРОВ	111
Борисовец Д.С., Ястребов А.С., Красочко П.А., Андросик Л.Д. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ИНТЕРФЕРОНА, ИНДУКТОРА ИНТЕРФЕРОНА И АЛЬВЕОЗАНА В НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОМ ОПЫТЕ	119

Лысенко А.П., Михалевич Е.А., Лемиш А.П., Великий С.В. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПРИЧИН РЕАКЦИЙ НА ТУБЕРКУЛИН У КОРОВ	128
Марущак Л.В., Неволько О.М. РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ И ОПТИМИЗАЦИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КУ-ЛИХОРАДКИ	140
Ситюк Н.П., Ничик С.А. РАЗРАБОТКА И ИСПЫТАНИЕ ПРИЖИЗНЕННОГО СПОСОБА ОТБОРА СЛЮНЫ ДИКИХ КАБАНОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУ- МЕ СВИНЕЙ	147
Лемиш А. П., Красникова Е. Л., Великий С. В., Рубникович Т.П. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПЦР- ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОМА ВОЗ- БУДИТЕЛЯ НЕКРОБАКТЕРИОЗА (<i>FUSOBACTERIUM</i> <i>NECROPHORUM</i>)	152
Лемиш А.П., Красникова Е.Л., Вербицкий А. А., Рубникович Т.П. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИЧЕСКИХ И ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ <i>BOR-</i> <i>DETELLA BRONCHISEPTICA</i> , ОСНОВАННЫХ НА МОЛЕКУ- ЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДАХ	158
Чехун А.И., Коваленко В.Л., Ничик С.А. ВЛИЯНИЕ ДЕЗИН- ФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ <i>ESCH-</i> <i>ERICHIA COLI</i> И <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	167
Бабак В.А., Гусев А.А., Пунтус И.А., Згировская А.А., Лома- ко Ю.В. ВАКЦИНА ЖИВАЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННАЯ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ОСПЫ ОВЕЦ	173
Згировская А.А., Минчук Ю.Н., Гусев А.А., Ломако Ю.В., Ананчиков М.А., Ероховец Н.Ф., Бабак В.А., Пунтус И.А. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ЖИВОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ	184
Ломако Ю.В., Зубовская И.В., Амосова Л.А., Карпович В.К. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ВАК- ЦИНЫ (КСКП) ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОЛИБАКТЕРИОЗА, САЛЬМОНЕЛЛЕЗА, КЛЕБСИЕЛЛЕЗА И ПРОТЕОЗА КРУПНО- ГО РОГАТОГО СКОТА	193

**Ковалев Н.А., Гусев А.А., Красочко П.А., Усень М.М., Бучу-
кури Д.В., Бутько Л.В. ВАКЦИНА ПРОТИВ БЕШЕНСТВА,
ЧУМЫ, ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА И ИНФЕКЦИОННО-
ГО ГЕПАТИТА ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ. ЧАСТЬ 1. РЕ-
ПРОДУКЦИЯ И ИНАКТИВАЦИЯ ВАКЦИННЫХ ВИРУСОВ** 199

**Ковалев Н.А., Гусев А.А., Красочко П.А., Усень М.М., Бучу-
кури Д.В., Бутько Л.В. ВАКЦИНА ПРОТИВ БЕШЕНСТВА, ЧУ-
МЫ, ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА И ИНФЕКЦИОННОГО
ГЕПАТИТА ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ. ЧАСТЬ 2. КОН-
СТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИНЫ И ИЗУЧЕНИЕ ЕЕ ИММУНО-
ГЕННОСТИ** 208

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК И ВИРУСОВ

**Пунтус И.А., Бабак В.А., Гусев А.А., Згировская А.А., Филип-
кова А.Е., Гром А.А., Волчецкая А.Ю. КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК
ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИН** 216

**Красочко П. А., Борисовец Д. С., Станкуть А. Э., Радько В. Л.
ВЛИЯНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА МОР-
ФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИ-
НИИ КЛЕТОК MDBK** 230

**Сусский Е.В., Красочко П.А. ОЦЕНКА СУБЛИНИЙ КЛЕТОК
MDBK ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ПАРАГРИППА-3
И ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГА-
ТОГО СКОТА** 237

**Скрыпник В.Г., Колесникова Е.Ю. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНО-
СТИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТОВ
МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СРЕДСТВ СТАНДАРТИЗАЦИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ** 246

ПАРАЗИТОЛОГИЯ

**Якубовский М.В. ИММУНИТЕТ ПРИ ПАРАЗИТАРНЫХ БО-
ЛЕЗНЯХ ЖИВОТНЫХ** 256

**Ятусевич А.И., Субботин А.М., Самсонович В.А. ФУНКЦИО-
НИРУЮЩАЯ ПАРАЗИТАРНАЯ СИСТЕМА ДОМАШНЕЙ И
ДИКОЙ СВИНЬИ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ** 266

**Степанова Е.А., Якубовский М.В., Кузьминский И.И., Степа-
нов С.Н. ДИАГНОСТИКА ФАСЦИОЛЕЗА НА РАННИХ СТА-
ДИЯХ РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ** 275

Якубовский М.В., Щемелева Н.Ю., Кузьминский И.И., Пепелева О.П. ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОСТИМУЛЯТОРА «ЯНСЕВИТ» ПРИ ПАРАЗИТАРНЫХ БОЛЕЗНЯХ	281
Степанова Н.А. ПРИМЕНЕНИЕ ПРОБИОТИКА «МУЛЬТИБАКТЕРИН ВЕТЕРИНАРНЫЙ BS+LA» ПРИ ДЕГЕЛЬМИНТИЗАЦИИ ЦЫПЛЯТ	288
Кикоть А.В. ВСПЫШКА ФУРУНКУЛЕЗА РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ НА УКРАИНЕ	293
Галушка С.А. ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ КРУСТАЦЕОЗОВ РЫБ НА УКРАИНЕ	298
Евтушенко И.Д., Евтушенко А.В. СОВРЕМЕННОЕ ЭПИЗООТИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ПО ПАРАЗИТАРНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ РЫБ В УСЛОВИЯХ СЕВЕРО-ВОСТОЧНОГО РЕГИОНА УКРАИНЫ	301
Якубовский М.В., Мясцова Т.Я., Оленич В.П. ВЛИЯНИЕ ДЕГЕЛЬМИНТИЗАЦИИ НА ОБМЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ У ТЕЛЯТ ПРИ СПОНТАННЫХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ПАРАЗИТОЗАХ	308
Степанова Е.А., Якубовский М.В., Мясцова Т.Я. КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГИПОДЕРМАТОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА	317
Темный Н.В. ОТРИЦАТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ ПРИ ПОГОЛОВНОЙ ДЕГЕЛЬМИНТИЗАЦИИ ДОЙНЫХ КОРОВ И ПУТИ ЕГО ПРЕОДОЛЕНИЯ	324
Якубовский М.В., Кузьминский И.И. ВЛИЯНИЕ СТРОНГИЛ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА НА ИММУНИТЕТ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ ТИМАЛИНА И АЛЬВЕОЗАНА	329

БОЛЕЗНИ ПЧЕЛ, ФАРМАКОЛОГИЯ

Полторжицкая Р.С., Черник М.И. МИКРОБНЫЙ ПЕЙЗАЖ УЛЬЯ ПЧЕЛ В НОРМЕ И ПРИ НОЗЕМАТОЗНОЙ ИНВАЗИИ	335
Гнатенко А.В., Коваленко В.Л., Яненко У.Н. ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЦИДНОГО ПРЕПАРАТА «АРГИЦИД» НА АЭРОБНУЮ СПОРООБРАЗУЮЩУЮ МИКРОФЛОРУ	342
Коваленко В.Л., Гнатенко А.В., Ничик С.А. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ БАКТЕРИЦИДНОГО ПРЕПАРАТА «АРГИЦИД» В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ	345

Маслак В.Ю. ЕСТЕСТВЕННАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И ПРОДУКТИВНОСТЬ ТЕЛЯТ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВКУСО-АРОМАТИЧЕСКОЙ ДОБАВКИ «АЦЕВАНДОЛ»	348
Безбородов П.Н. ДИСФУНКЦИЯ БЛУЖДАЮЩЕГО НЕРВА В ПАТОЛОГИИ ПРЕДЖЕЛУДКОВ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА	356
Кучинский М.П., Малиновский И.Ф., Новикова О.Н., Кучинская Т.М. ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА И ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У СВИНЕЙ	364
Насонов И.В., Черник М.И., Капанский А.А. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА «ФЕНБЕНДАФАРМ 22,5%» В ЛЕЧЕНИИ И ПРОФИЛАКТИКЕ ГЕЛЬМИНТОЗОВ РЫБ	371
Насонов И.В., Черник М.И., Капанский А.А. «АЛБЕНДАФАРМ 10%» В ЛЕЧЕНИИ И ПРОФИЛАКТИКЕ ГЕЛЬМИНТОЗОВ РЫБ	375
Кучинский М.П., Калюта Л.Л. ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА «ПОЛИВИСОЛ» ПРИ ДИАРЕЕ У НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ	379

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

научное издание

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ НАУКИ

**материалы
международной научно-практической конференции**

Составитель Гусева Е.В.

Ответственные редакторы:

Володкович М.М.

Гузовская В.С.

Выпускающий редактор Ларькова А.Е.

Компьютерная вёрстка:

Лихачёва М.И., Леонтьева Л.В.

Подписано в печать 02.09.2013г.

Формат 60х84^{1/8} Бумага офсетная.

Гарнитура Таймс.

Усл. печ. л 22,8 Тираж 150 экз. Заказ № 98

220003, г. Минск, ул. Брикета, 28.

E-mail: bievm@tut.by

KNIR@tut.by

Переплёт: ООО «Инфоэксперт», г. Минск, пр-т Независимости, д.11 корп. 2

Отпечатано на полиграфической базе отдела научно-информационного
анализа, стандартизации и патентных исследований

**РУП “ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ
ИМ. С.Н. ВЫШЕЛЕССКОГО”**