

МЕЖДУНАРОДНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
Выпускается с 2004 года

ISSN 2224-168X
ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС: 00802
008022

Журнал включен в список Высшей аттестационной комиссии (ВАК) Беларуси по отраслям: ветеринарные науки, биологические науки, сельскохозяйственные науки, приказ ВАК № 101 от 04.07.2005 г.

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

Жалдыбин В.В. – кандидат ветеринарных наук, доцент

СЕКРЕТАРЬ:

Радюш И.С. – кандидат ветеринарных наук, доцент

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Ковалев Н.А. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик НАН Беларуси

Лысенко А.П. – доктор ветеринарных наук, профессор

Кучинский М.П. – доктор ветеринарных наук, профессор

Степанова Е.А. – кандидат ветеринарных наук, доцент

Борисовец Д.С. – кандидат ветеринарных наук, доцент

Щемелева Н.Ю. – кандидат ветеринарных наук, доцент

Кузьминский И.И. – кандидат ветеринарных наук, доцент

НАД НОМЕРОМ РАБОТАЛИ:

Ларькова А.Е.

Лукьянова И.А.

Пуныко С.Г.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ

Насонов И.В. – доктор ветеринарных наук, профессор (г. Минск)

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

Василевич Ф.И. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН (г. Москва)

Гавриченко Н.И. – доктор сельскохозяйственных наук, доцент (г. Витебск)

Гулюкин М.И. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН (г. Москва)

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

Красочко П.А. – доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор (г. Витебск)

Малашко В.В. – доктор ветеринарных наук, профессор (г. Гродно)

Стегний Б.Т. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик НААН Украины (г. Харьков)

Шабунин С.В. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН (г. Воронеж)

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

ВСЕ СТАТЬИ РЕЦЕНЗИРУЮТСЯ

© «Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария»

ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АВТОРАМИ МАТЕРИАЛОВ ЖУРНАЛА «ЭПИЗОТОЛОГИЯ ИММУНОБИОЛОГИЯ ФАРМАКОЛОГИЯ САНИТАРИЯ» ССЫЛКА НА ЖУРНАЛ **ОБЯЗАТЕЛЬНА**

СОДЕРЖАНИЕ**ЭПИЗООТОЛОГИЯ**

Цвирко Л.С., Науменко Т.В., Кляцко И.В. ЭПИЗОТОЛОГИЯ БЕШЕНСТВА В БЕЛОРУССКОМ ПОЛЕСЬЕ 3

ИММУНОБИОЛОГИЯ

Лысенко А.П., Высоцкий А.Э., Притыченко А.Н., Кучвальский М.В., Якобсон Е.И., Красникова Е.Л. ЛАТЕНТНАЯ ТУБЕРКУЛЕЗНАЯ ИНФЕКЦИЯ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА 11

Лысенко А.П., Кучвальский М.В., Притыченко А.Н., Высоцкий А.Э., Якобсон Е.И., Красникова Е.Л. УНИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА С ДЕФЕКТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКОЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ УЛЬТРАПАСТЕРИЗОВАННОГО МОЛОКА 22

Якубовский С.М., Насонов И.В., Кныш Н.В., Радюш И.С. СИНТЕЗ КОНЪЮГАТОВ АНТИТЕЛО-АНТИБИОТИК ДЛЯ БОРЬБЫ С БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ 31

Зайцева В.В. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ФОСФОЛИПИДОВ И ГУМИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ В СОСТАВЕ РАЗБАВИТЕЛЯ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМЫ БЫКА И ЧЕЛОВЕКА 37

Сарока А.М. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЯИЦ *HETERAKIS GALLINARUM* (GMELIN, 1790) 43

Костюк Н.И., Николаевич Л.Н., Барсукова М.В., Руколь В.М., Слепцов Ю.В., Борисик Р.Н., Андреева Е.Г. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ ЖИВОТНЫХ 49

Красникова Е.Л., Мистейко М.М., Мальчик О.В., Лысенко А.П. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРЕХ СИСТЕМ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ PRDC-КОМПЛЕКСА 56

Мистейко М.М., Красникова Е.Л., Мальчик О.В., Андруевич А.С. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* И *HAEMOPHILUS PARASUIS* 61

ФАРМАКОЛОГИЯ

Кучинский М.П., Савчук Т.М., Кучинская Г.М., Байанков А.С. ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ АНТИПРОТОЗОЙНОГО ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНОГО ХИНАЗОЛИНОНА 68

САНИТАРИЯ

Кажеко О.А., Барановский М.В., Музыка А.А., Высоцкий А.Э. К ВОПРОСУ О САНИТАРНОМ СОСТОЯНИИ МОЛОКОПРОВОДЯЩЕЙ СИСТЕМЫ ДОИЛЬНЫХ УСТАНОВОК 75

CONTENTS**EPIZOOTOLOGY**

Tsvirko L.S., Naumenko T.V., Klyatsko I.V. EPIZOTOLOGY OF RABIES IN BELARUSIAN POLESSYE 3

IMMUNOBIOLOGY

Lysenko A.P., Vysotsky A.E., Pritychenko A.N., Kuchvalski M.V., Yakobson E.I., Krasnikova E.L. LATENT TUBERCULOSIS INFECTION IN CATTLE 11

Lysenko A.P., Kuchvalski M.V., Pritychenko A.N., Vysotsky A.E., Yakobson E.I., Krasnikova E.L. UNIQUE PROPERTIES OF CELL WALL DEFICIENT MYCOBACTERIA TUBERCULOSIS ISOLATED FROM ULTRAPASTEURIZED MILK 22

Yakubovsky S.M., Nasonov I.V., Knysh N.V., Radyush I.S. SYNTHESIS OF ANTIBODY-ANTIBIOTIC CONJUGATES TO COMBAT BACTERIAL INFECTIONS 31

Zaitseva V.V. EFFECT OF CONCENTRATION OF PHOSPHOLIPIDS AND HUMIC COMPOUNDS IN DILUENT COMPOSITION ON BIOLOGICAL PARAMETERS OF BULL AND HUMAN SPERM 37

Saroka A.M. FACTORS INFLUENCING THE BIOLOGICAL AND MORPHOMETRIC PARAMETERS OF *HETERAKIS GALLINARUM* EGGS (GMELIN, 1790) 43

Kostyuk N.I., Nikolaevich L.N., Barsukova M.V., Rukol V.M., Sleptsov Y.V., Borisik R.N., Andreeva E.G. DEVELOPMENT OF THE TECHNOLOGY OF FIBROBLAST ISOLATION FOR REGENERATIVE THERAPY IN ANIMAL 49

Krasnikova E.L., Misteyko M.M., Malchik O.V., Lysenko A.P. EFFICIENCY OF THREE SYSTEMS OF NUCLEIC ACID EXTRACTION FOR THE DIAGNOSIS OF PRDC-COMPLEX PATHOGENS 56

Misteyko M.M., Krasnikova E.L., Malchik O.V., Andrusovich A.S. MOLECULAR GENETIC DETECTION OF *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* AND *HAEMOPHILUS PARASUIS* 61

FARMACOLOGY

Kuchinsky M.P., Savchuk T.M., Kuchinskaya G.M., Bayankov A.S. STUDY OF THE TOXICITY OF AN ANTI-PROTOZOIC VETERINARY PREPARATION BASED ON A DERIVATIVE OF HINAZOLINONE 68

SANITATION

Kazheko O.A., Baranovsky M.V., Musica A.A., Vysotsky A.E. ON THE SANITARY CONDITION OF THE MILK TRANSFER SYSTEM OF MILKING MACHINES 75

Компьютерная верстка: ЛУКЪЯНОВА И.А.

Подписано в печать 18.05.2022 г.

Формат 60x84^{1/8} Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.

Уч.-изд. л. , усл. печ. л. 9,8 Тираж 100 экз. Заказ №

220063, г. Минск, ул. Брикета, 28. E-mail: bievvm@tut.by; office@bievm.by; knir@tut.by; knir@bievm.by

Республиканское унитарное предприятие «Информационно-вычислительный центр

Министерства финансов Республики Беларусь».

Свидетельства о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий

№ 1/161 от 27.01.2014, № 2/41 от 29.01.2014. Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.

УДК 619:616.98(476.2+476.7)

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-1-3-10>Цвирко Л.С., доктор биологических наук, профессор¹Науменко Т.В., врач высшей категории²Кляцко И.В., врач-эпидемиолог³¹Полесский государственный университет, г. Пинск²Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, г. Гомель³Брестский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, г. Брест

ЭПИЗООТОЛОГИЯ БЕШЕНСТВА В БЕЛОРУССКОМ ПОЛЕСЬЕ

Резюме

В статье освещены материалы ретроспективного и текущего анализа особенностей эпизоотической обстановки по бешенству на территории белорусского Полесья. За 64-летний период (1958–2021 гг.) на данной территории диагностирован 5871 случай заболевания животных бешенством. Бешенство установлено у 29 видов животных. Доминирующее место среди больных животных занимает лисица – 44,6 %. Основным источником инфицирования населения являются домашние животные.

Ключевые слова: бешенство, животные, распространение, белорусское Полесье.

Summary

The article covers materials of retrospective and current analysis of epizootic situation of rabies on the territory of Belarusian Polesye. During 64-year period (1958–2021) 5,871 cases of animal diseases by rabies have been diagnosed in this territory. Rabies was established in 29 animal species. Dominant place among sick animals is occupied by fox – 44, 6 %. Domestic animals are the main source of infection of the population.

Keywords: rabies, animals, distribution, belarusian Polesye.

Поступила в редакцию 16.03.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство (*Rabies*), вызываемое РНК-содержащим вирусом рода *Lyssavirus* из семейства *Rhabdoviridae*, – природно-очаговый зооноз, очаги которого формируются за счет циркуляции возбудителя среди широкого круга диких, домашних и сельскохозяйственных животных. В настоящее время оно встречается на территории большинства стран мира и зарегистрировано у более чем 30 видов млекопитающих. Но основными источниками инфицирования человека являются дикие и домашние псовые (*Canidae*).

На территории Беларуси заболевания бешенством людей и животных регистрируются на протяжении многих десятилетий. В 1909 г., например, по Минской и Могилевской губерниям отмечено 14 и 85 случаев заболеваний животных соответ-

ственно [10]. С 1923 по 1929 гг. в пределах республики было зарегистрировано 1996 случаев падежа животных от бешенства [3].

Официально первый случай гидрофобии у человека в республике зарегистрирован в 1923 г., а к 1929 г. сообщалось уже о 62 таких случаях [5]. Преобладающее большинство обратившихся за антирабическими прививками (84,1 %), как и заболевших бешенством (69,5 %), составляли укушенные собаками [2]. На долю собак приходилось 38,8 % всех случаев заболевших бешенством домашних и сельскохозяйственных животных [11].

Уже в первые годы наблюдений (1958–1973 гг.) были отмечены активные очаги бешенства в юго-восточной части республики (Гомельская область). Заболеваемость бешенством сельскохозяйст-

венных, домашних и диких животных в расчете на 10 тыс. га здесь составляла 0,24 [1].

В белорусском Полесье (Гомельская, Брестская области) бешенство животных официально регистрируется с 1950 г. В 1950–1959 гг. в сумме по областям наиболее велика была доля заболевших собак (57,6 %). В этот же период часто имели место заболевания крупного рогатого скота. На долю диких животных в тот период приходилось 1,1 % [9]. Но затем ситуация стала быстро меняться. В 1960–1969 гг. на долю диких животных приходилось уже 10,0 %; 1970–1979 гг. – 43,6 %; 1988–1989 гг. – 58,9 % зарегистрированных заболеваний. В 2000–2021 гг. доля диких животных от всех заболевших составляет 59,7 %, домашних – 25,6 %, сельскохозяйственных животных – 14,6 %.

Эпизоотии бешенства среди диких животных создают опасность роста этого заболевания у домашних и сельскохозяйственных животных, а также у людей. Гидрофобия у людей в Полесье официально регистрируется с 1949 г. Всего за 1949–1977 гг. отмечено 57 случаев, или 43,8 % всех заболевших в республике. С 1996 г. отмечается четкая тенденция роста ежегодной обращаемости населения за антирабической помощью. В Брестском регионе в 1980 г. обращаемость населения за антирабической помощью составляла 113,9 на 100 тыс. населения, к 2000 г. этот показатель резко возрастает и составляет 257,3 обращений. В Гомельской области к 1994 г. она достигла 211,6 обращений на 100 тыс. населения, после чего имела постоянную тенденцию роста, превышая в отдельные годы республиканские показатели, колеблющиеся в пределах от 209,6 до 224,9 обращений на 100 тыс. населения.

Растет число лиц, пострадавших от укусов или ослюнений животных с лабораторно подтвержденным диагнозом «бешенство»: если в 2013 г. их было 148, то в 2016 г. – 333 (рост в 2,3 раза). Среди пострадавших 58,5 % были покусаны домашними животными (собаки, кошки), 27,1 %

пострадали при контакте с сельскохозяйственными и 14,4 % – с дикими животными.

Цель исследования – проведение эпизоотологического мониторинга циркуляции вируса бешенства на территории белорусского Полесья за период с 1958 г. по 2021 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований являлись данные официального учета заболеваемости бешенством животных из учетно-отчетной документации и ежегодных информационно-аналитических бюллетеней Гомельского и Брестского областных центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья (ЦГЭиОЗ), результаты полевых и лабораторных исследований областных и районных ветеринарных учреждений, а также статистические издания и публикации, которые содержат информацию о эпизоотической ситуации по бешенству в регионе белорусского Полесья.

Дескриптивному эпизоотологическому анализу (сравнительно-историческому и сравнительно-географическому) подвергнута заболеваемость бешенством животных в Гомельской и Брестской областях с хронологической глубиной анализа в 64 года (с 1958 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В заболеваемости животных бешенством в регионе белорусского Полесья можно выделить несколько этапов (таблица 1). Первый – с 1958 г. по 1977 г., для которого характерны периоды подъема и спада инфекции с регистрацией бешенства в основном среди сельскохозяйственных и домашних животных. Общее число случаев, зарегистрированных за этот период, составляет 779, среднегодовое – 39. Максимальное годовое число случаев – 107, т.е. на 64 % выше среднегодового, приходится на 1959 и 1961 гг. и совпадает с годами подъема заболеваемости крупного рогатого скота и домашних псовых (собак).

Таблица 1. – Случаи бешенства животных на территории Брестской и Гомельской областей в 1958–2021 гг.

Годы	Всего заболевших животных	Дикие животные, % от общего количества заболевших животных	Домашние животные, % от общего количества заболевших животных	Сельскохозяйственные животные, % от общего количества заболевших животных
1958–1977	779	18,5	37,3	44,3
1978–1999	539	56,8	26,1	17,1
2000–2021	4553	59,7	25,6	14,6

За этот период бешенство диагностировано у 4 видов сельскохозяйственных, 2 видов домашних и 5 видов диких плотоядных животных (таблица 2). 44,3 % всей заболеваемости бешенством приходилось на сельскохозяйственных животных. Наибольшее число случаев бешенства зарегистрировано среди крупного рогатого скота – 80,0 % и свиней – 15,6 %. На долю ло-

шадей приходилось 4,1 % всех больных сельскохозяйственных животных, мелкого рогатого скота – 0,3 %. Среди плотоядных бешенство распределялось следующим образом: собаки – 87,6 %, кошки – 12,4 %, лисицы – 77,6 %, волки – 14,0 %, енотовидные собаки – 4,9 %, барсуки – 2,8 %, рыси – 0,7 %.

Таблица 2. – Видовой состав основных животных в зарегистрированной заболеваемости бешенством по белорусскому Полесью за 1958–1977 гг.

Вид животных	Доля заболевших, %			
	среди всех зарегистрированных заболевших животных	среди сельскохозяйственных животных	среди домашних животных	среди диких животных
Лошади	1,80	4,06		
Крупный рогатый скот	35,43	80,0		
Собаки	32,73		87,63	
Кошки	4,62		12,37	
Лисицы	14,25			77,62
Волки	2,57			13,99
Енотовидные собаки	0,90			4,89

В период с 1978 по 1999 гг. случаи бешенства у животных регистрируются ежегодно, отмечается рост (в 2,1 раза) случаев в популяции диких животных. Общее число зарегистрированных за этот период случаев составляет 539, среднегодовое – 25. Максимальное годовое число случаев – 75, т.е. на 67 % выше среднегодового – приходится на 1987-й год и совпадает с одним из годов подъема заболеваемости лисиц. Болезнь диагностирована у 306 диких плотоядных (56,8 %). Доля лисицы по сравнению

с предыдущим периодом увеличивается с 77,6 % до 89,2 % (таблица 3), доля енотовидных собак, больных бешенством, уменьшается с 4,9 % до 3,6 %, волков – с 14,0 % до 6,5 %.

Из числа заболевших в этот период сельскохозяйственные животные составили 17,1 %, домашние животные – 26,1 %. Среди сельскохозяйственных животных доминирует крупный рогатый скот – 80,4 %, среди домашних животных преобладают собаки – 59,6 %.

Таблица 3. – Видовой состав основных животных в зарегистрированной заболеваемости бешенством по белорусскому Полесью за 1978–1999 гг.

Вид животных	Доля заболевших, %			
	среди всех зарегистрированных заболевших животных	среди сельскохозяйственных животных	среди домашних животных	среди диких животных
Лошади	2,23	13,04		
Крупный рогатый скот	13,73	80,43		
Собаки	15,58		59,57	
Кошки	10,20		39,01	
Лисицы	50,65			89,22
Волки	3,71			6,54
Енотовидные собаки	2,04			3,59

С середины 90-х годов обстановка по бешенству характеризуется существенно высокими значениями эпизоотологических признаков, свидетельствующих об активности природных циклов инфекции с преобладающей инцидентностью среди диких животных. Резкий рост случаев дикого бешенства относится к 2000–2021 гг., когда число зарегистрированных больных диких животных по сравнению с первым периодом наблюдения увеличивается в 19 раз и достигает 59,7 % от числа всех заболевших животных. Больные бешенством лисицы составляют 49,1 % среди всех зарегистрированных заболевших животных и 82,2 % – среди заболевших диких. Как видно из таблицы 4, все бо-

лее важную роль в циркуляции возбудителя приобретает енотовидная собака (8,7 %), роль волка в циркуляции возбудителя рабической инфекции снижается с 6,5 % до 2,8 %.

Общее число случаев, зарегистрированных с 2000 г. по 2021 г., составляет 4553, среднегодовое – 207. Максимальное годовое число случаев – 332 (на 38 % выше среднегодового) – приходится на 2007 г. и совпадает с максимальным за 22-летний период наблюдения пиком заболеваемости лисицы (210 случаев). На этот же год приходится один из четырех максимумов заболеваемости за данный период по числу зарегистрированных видов.

Таблица 4. – Видовой состав основных животных в зарегистрированной заболеваемости бешенством по белорусскому Полесью за 2000–2021 гг.

Вид животных	Доля заболевших, %			
	среди всех зарегистрированных заболевших животных	среди сельскохозяйственных животных	среди домашних животных	среди диких животных
Лошади	0,57	3,90		
Крупный рогатый скот	13,57	92,65		
Собаки	13,49		52,61	
Кошки	12,04		46,96	
Лисицы	49,07			82,16
Волки	1,69			2,83
Енотовидные собаки	5,23			8,75

Кроме основных носителей вируса бешенства (лисица, енотовидная собака, волк), начиная с 2000 г., отмечены случаи активного вовлечения в эпизоотический процесс лесной куницы, рыси, барсука, лесного хоря. Единичные случаи бешенства диагностированы у горностая, ласки, американской норки. В юго-восточной части Полесья, кроме хищных плотоядных, в циркуляцию возбудителя рабической инфекции активно вовлекаются грызуны (Брагинский, Буда-Кошелевский, Гомельский, Добрушский, Октябрьский, Петриковский, Мозырский, Речицкий, Светлогор-

ский, Чечерский районы) и парнокопытные (Брагинский, Ветковский, Гомельский, Лоевский, Наровлянский, Речицкий, Рогачевский районы). Среди этих животных вирус чаще всего обнаруживался у лесной куницы (69 случаев) и лесного хоря (36 случаев).

В целом же в белорусском Полесье наблюдались случаи вовлечения в эпизоотический процесс вируса бешенства 19 видов диких животных, из которых на долю лисицы приходится 82,6 % обследованных животных с лабораторно подтвержденным диагнозом «бешенство» (таблица 5).

Таблица 5. – Видовой состав диких животных с лабораторно подтвержденным диагнозом «бешенство», обнаруженных в белорусском Полесье за 64 года

Вид животных	Количество больных	
	абс.	%
Отряд Хищные – <i>Carnivora</i>		
Волк – <i>Canis lupus L.</i>	117	3,69
Лисица обыкновенная – <i>Vulpes vulpes L.</i>	2618	82,64
Собака енотовидная – <i>Nyctereutes procyonoides Gray</i>	257	8,11
Куница лесная – <i>Martes martes L.</i>	69	2,18
Горностай – <i>Mustela erminea L.</i>	1	0,03
Ласка – <i>Mustela nivalis L.</i>	1	0,03
Хорь лесной – <i>Mustela putoris L.</i>	36	1,14
Норка американская – <i>Mustela vison Schreb.</i>	2	0,06
Барсук обыкновенный – <i>Meles meles L.</i>	11	0,35
Рысь обыкновенная – <i>Lynx lynx L.</i>	16	0,51
Отряд Грызуны – <i>Rodentia</i>		
Белка – <i>Sciurus vulgaris L.</i>	3	0,09
Бобр обыкновенный – <i>Castor fiber L.</i>	9	0,28
Ондатра – <i>Ondatra zibethicus L.</i>	4	0,13
Выдра речная – <i>Lutra lutra L.</i>	1	0,03
Крыса серая – <i>Rattus norvegicus Berk</i>	8	0,26
Мышь*	5	0,16
Отряд Рукокрылые – <i>Chiroptera</i>		
Летучая мышь*	2	0,06
Отряд Парнокопытные – <i>Artiodactyla</i>		
Лось – <i>Alces alces L.</i>	6	0,19
Кабан – <i>Sus scrofa L.</i>	2	0,06
Всего	3168	100

Примечание – *вид животного не установлен

По административным районам распределение случаев болезни среди носителей рабической инфекции существенно различается. В период с 1969 г. по 1999 г. число зарегистрированных случаев бешенства диких животных по районам, где регистрировались заболевания, колеблется от 1 до 31 при среднем значении 12,1 случаев на район. Более 1,5 особей выявленных больных животных на 10 тыс. га общей площади приходится на территорию Калинковичского и Октябрьского районов Гомельской области. Потенциально опас-

ными по бешенству являются Брагинский, Ветковский, Жлобинский, Речицкий, Светлогорский и Хойникский районы той же области (1,0–1,4 особей на 10 тыс. га общей площади). Относительно благополучными по бешенству остаются территории Лельчицкого, Мозырского, Березовского, Кобринского и Пинского районов, где число выявленных случаев бешенства диких животных не превышает 0,1. В Жабинковском районе бешенство среди животных за более чем тридцатилетний период зарегистрировано не было (рисунок 1).

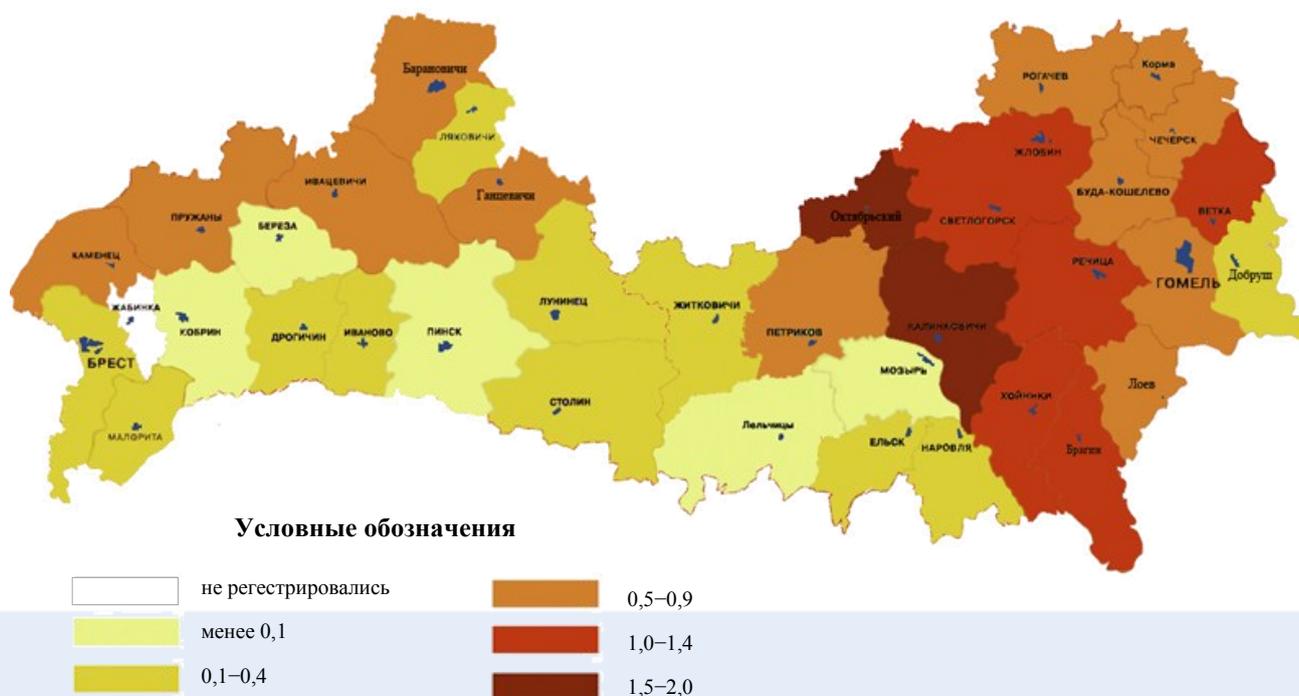


Рисунок 1. – Распределение числа выявленных больных бешенством диких животных на 10 тыс. общей площади района в разрезе Гомельской и Брестской областей (1969–1999 гг.)

С 2000 г. ситуация с распределением больных бешенством диких животных по административным районам меняется. Бешенство регистрируется на территории всех 37 административных районов. Суммарное число выявленных больных животных на 10 тыс. га общей площади районов Гомельской области увеличивается в 5,3 раза, Брестской – в 8 раз. Число зарегистрированных случаев бешенства диких животных по районам, где регистрировались заболевания, колеблется от 8 до 188

при среднем значении 73,5 случаев на район. Более 10,0 особей выявленных больных диких животных на 10 тыс. га общей площади района приходится на территорию Жабинковского, Добрушского и Лоевского районов. Относительно благополучными остаются территории Лельчицкого, Наровлянского, Ганцевичского и Ляховичского районов, где число выявленных бешенством диких животных на единицу площади не превышало 1,0 (рисунок 2).

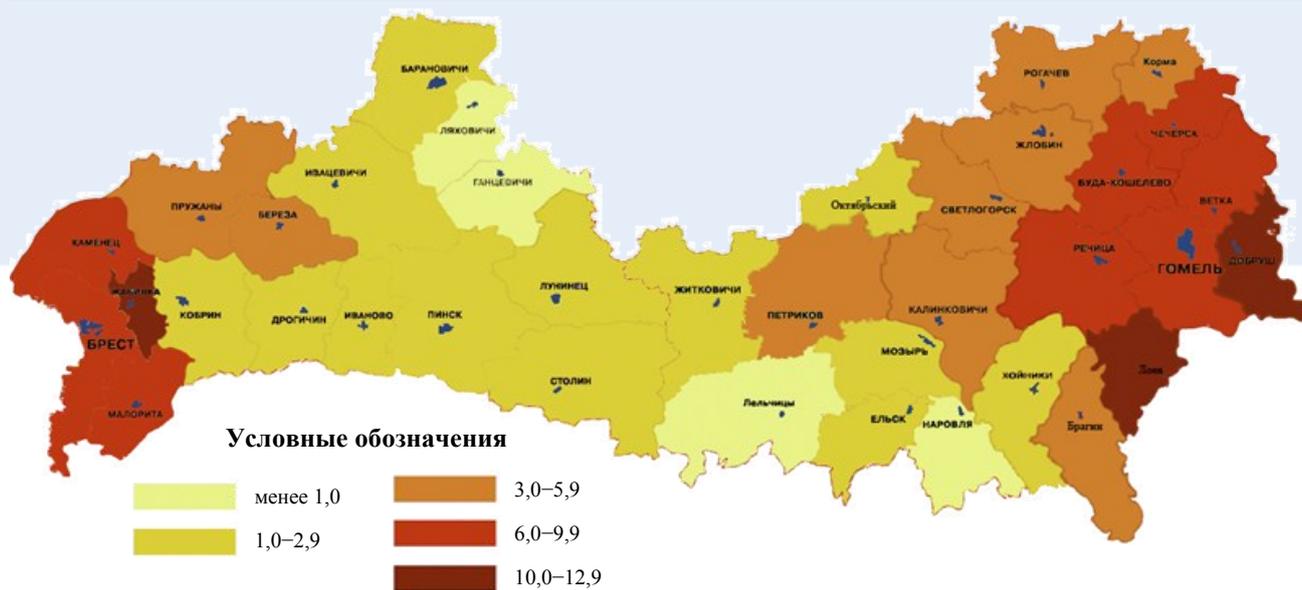


Рисунок 2. – Распределение числа выявленных больных бешенством диких животных на 10 тыс. общей площади района в разрезе Гомельской и Брестской областей (2000–2021 гг.)

Сказанное свидетельствует не только об общем увеличении эпизоотологического процесса, но и о явном изменении эпизоотической ситуации в сторону вовлечения в нее диких животных как источников инфекции. Дикие животные, главным образом лисицы и енотовидные собаки, служат резервуаром инфекции, откуда бешенство распространяется на безнадзорных собак и кошек, а затем и на других домашних и сельскохозяйственных животных.

В этих условиях актуальными остаются меры борьбы путем уменьшения плотности популяции лисиц как основного резервуара бешенства и других диких плотоядных и меры специфической профилактики, которые включают оральную иммунизацию диких животных путем раскладывания приманок с антирабической вакциной [5]. Примером успешной профилактики бешенства с помощью предложенной вакцины может служить Пинский район Брестской области, который являлся стационарно неблагополучным по бешенству. С 2002 г. по 2007 г. здесь было зарегистрировано 63 случая заболевания, из них 35 (55,6 %) – среди диких плотоядных, главным образом лисиц. В 2008 г. в районе была проведена вакцинация на площади 1070 км² (площадь района 3303 км²). В этом же году

на территории города и района не зарегистрировано ни одного случая бешенства среди животных. Обращения населения по поводу укусов животных в течение последующих двух лет по району снизились с 230 до 179 случаев.

Наряду с проведением мер по профилактике бешенства среди диких животных необходимо одновременно осуществлять мероприятия по иммунизации домашних (собаки, кошки) и сельскохозяйственных животных [7]. Решающее значение приобретает активная санитарно-просветительная работа о поведении больных животных, о необходимости избегать тесного контакта с незнакомыми домашними животными и любого контакта с дикими животными [5, 8], об экстренных мерах, которые необходимо предпринимать после укуса или ослонения бешеными или подозрительными на бешенство животным [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эпизоотическая ситуация по бешенству на территории белорусского Полесья имеет ярко выраженную тенденцию к росту, начиная с 2000 г. Так, в 1999 г. зарегистрировано 32 случая бешенства животных, в 2000 г. – 113 случаев, в 2001 г. – 185, в 2003 г. – 264, в 2006 г. – 323, в 2016 г. – 326 случаев.

В эпизоотический процесс вовлечены все районы белорусского Полесья. Образовались стойкие природные очаги в 11 районах Гомельской области (Брагинский, Буда-Кошелевский, Ветковский, Гомельский, Добрушский, Жлобинский, Калинковичский, Лоевский, Петриковский, Речицкий, Рогачевский) и 5 районах Брестской области (Брестский, Малоритский, Каменецкий, Пинский, Пружанский).

Экологический стереотип бешенства претерпел значительные преобразования и окончательно сформировался в виде природноочаговой инфекции с циркулирующей возбудителем в популяциях диких плотоядных. Основными резервуарами и источниками инфекции в этих условиях являются лисицы (82,6 %) и енотовидные собаки (8,1 %). Инцидентность бешенства с вовлечением волков в циркуляцию возбудителя остается на уровне 3,7 %. Случаи регистрации бешенства лесной куницы, лесного хорька, барсука, рыси увеличиваются, что свидетельствует о их возможном активном участии в циркуляции возбудителя в регионе.

Проблема оздоровления природных очагов бешенства в регионе бело-

русского Полесья требует пристального внимания. Неспецифическая и специфическая профилактика, мероприятия по иммунизации домашних (собаки, кошки) и сельскохозяйственных животных, активная санитарно-просветительная работа продолжают оставаться для региона белорусского Полесья актуальными.

Широкий круг млекопитающих различных экологических групп, в том числе домашних и содержащихся в неволе животных, зарегистрированных в качестве резервуара вируса, позволяет говорить о недостаточной изученности природной очаговости заболевания, необходимости поиска других участников либо способов циркуляции и сохранения вируса бешенства в природе. Уже сейчас очевидно, что проблема бешенства не может быть решена только вакцинацией домашних животных или регуляцией численности основных носителей вируса, например лисицы. Слишком широк круг вовлекаемых в эпизоотический процесс млекопитающих, многие из которых, особенно рукокрылые, представляют собой сложный объект для вирусологических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белов, С. И. *Медицинская география Белоруссии* / С. И. Белов, И. С. Ратобылский. – Минск : Беларусь, 1977. – 160 с.
2. Зибицкер, Д. Е. *К вопросу о роли диких животных в заболевании людей бешенством* / Д. Е. Зибицкер, Л. С. Змушко // *Сб. науч. трудов Бел ИЭМиГ, Т. IV.* – Минск : Изд. АН БССР, 1961. – С. 134–137.
3. Зибицкер, Д. Е. *Бешенство и его профилактика (по материалам Белоруссии)* / Д. Е. Зибицкер, Н. А. Ковалев. – Минск : Ураджай, 1966. – 200 с.
4. *Инструкция по антивирусной обработке ран, нанесенных бешеными или подозрительными на бешенство животными* / Н. П. Мишаева [и др.]: утв. Минздравом РБ 13 ноября 2000 г., № гос. рег. 125-9911.
5. Мишаева, Н. П. *Бешенство в Беларуси. Проблемы защиты населения* / Н. П. Мишаева, Л. С. Цвирко, С. П. Павлюченко. – Минск : БИТ «Хата», 2004. – 294 с.
6. *Пероральная вакцинация диких плотоядных животных против бешенства в Беларуси (обзор)* / Н. А. Ковалев и [и др.] // *Экология и животный мир.* – 2020. – № 2. – С. 42–51.
7. *Профилактика бешенства в Беларуси* / Н. А. Ковалев [и др.] // *Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария.* – 2013. – № 2. – С. 3–8.
8. *Рекомендации по предупреждению заболеваний населения бешенством* / Н. П. Мишаева [и др.]; под общ. ред. Н. П. Мишаевой. – Мозырь : УО МГПУ, 2004. – 28 с.
9. Савицкий, Б. П. *Природные очаги болезней человека в национальных парках Беларуси* / Б. П. Савицкий, Л. С. Цвирко, Н. П. Мишаева; науч. ред. Б. П. Савицкий. – Минск : БИТ «Хата», 2002. – 330 с.
10. Суджаев, Т. А. *Эпизоотологические и эпидемиологические данные о заболеваемости животных и людей зоонозами в Белоруссии до Великой Октябрьской революции. Сообщ. 1 Бешенство* // *Материалы Респ. науч.-практ. конф. по зоонозным болезням.* – Минск, 1974. – С. 10–14.
11. Таршис, М. Г. *Бешенство животных* / М. Г. Таршис, Н. А. Ковалев, П. П. Кузнецов. – Минск, 1990. – 175 с.

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹
Высоцкий А.Э., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Кучвальский М.В., аспирант²
Якобсон Е.И., магистрант²
Красникова Е.Л., научный сотрудник¹

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

²Белорусский государственный университет, г. Минск

ЛАТЕНТНАЯ ТУБЕРКУЛЕЗНАЯ ИНФЕКЦИЯ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Резюме

В молоке коров из условно благополучных по туберкулезу стад, не реагировавших и давших неопределенную реакцию на туберкулин, в 53,3 % и 66,7 % случаев обнаружен геном микобактерий туберкулеза (МБТ), в 40,7 % и 57,1 % – специфические антитела, в 25 % и 22,2 % проб – антигены МБТ, а из 92,3 % и 66,7 % исследованных проб молока, прогретых при температуре 98 °С, были выделены некислотоустойчивые формы МБТ. С учетом отсутствия признаков активного заболевания это свидетельствовало о латентной туберкулезной инфекции у части коров, не реагировавших на туберкулин, как и о том, что туберкулиновая проба не отражает реальной ситуации в стаде. Для элиминации туберкулезной инфекции необходимо использовать альтернативные тесты по определению прямых и косвенных маркеров туберкулезной инфекции, а также разработать новую систему противотуберкулезных мероприятий, учитывающих высокую вероятность передачи измененных форм МБТ трансплацентарно и с молоком.

Ключевые слова: латентный туберкулез, туберкулез крупного рогатого скота, туберкулин для млекопитающих.

Summary

The genome of mycobacterium tuberculosis (MBT) was detected in the milk of cows from conditionally tuberculosis-free herds that did not react and gave an uncertain reaction to tuberculin in 53.3 % 66.7 % of cases, specific antibodies in 40.7 % and 57.1 %, MBT antigens in 25 % and 22.2 % of samples, and non-acid-fast forms of MBT were detected from 92.3 % and 66.7 % of the studied milk samples heated at 98 °C. Taking into account the absence of signs of active disease, this indicated a latent tuberculosis infection in some cows that did not respond to tuberculin and that the tuberculin test did not reflect the real situation in the herd. To eliminate tuberculosis infection, it is necessary to use alternative methods for determining direct and indirect markers of tuberculosis infection and the development of a new system of anti-tuberculosis measures that take into account the high probability of transmission of modified forms of MBT through the placenta and with milk.

Keywords: latent tuberculosis, cattle tuberculosis, tuberculin mammalian.

Поступила в редакцию 27.12.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

К началу XX века туберкулез крупного рогатого скота был широко распространен в странах с развитым скотоводством [1, 2]. К этому времени уже стало понятно, что болезнь наносит не только ущерб скотоводству, но и представляет серьезную угрозу здоровью человека. В частности, в США от заражения микобактериями туберкулеза (МБТ) бычьего вида (*M. bovis*), преимущественно передававшимися

с молоком, ежегодно умирало до 50 000 человек [2, 3]. В связи с этим в ряде стран были приняты национальные программы борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота, в основе которых была внутрикожная проба с туберкулином и убой туберкулин-позитивных коров. Стада считались свободными от туберкулеза, если ранее реагировавшие животные были сданы на убой, а две последующие туберкулинизации с интервалом в 6 месяцев дали отрица-

тельные результаты [1, 2]. Для крупных коллективных хозяйств были предложены ускоренные схемы оздоровления с интервалами между исследованиями 30–45 дней [1]. И до сих пор отсутствие у коров клинических признаков туберкулеза, отрицательная реакция на туберкулин у всех животных при двукратной туберкулинизации с интервалом 6 месяцев являются основными критериями благополучия стада. Кроме того, стадо может быть признанным свободным от туберкулеза, если при ежегодном обследовании внутрикожной или симультанной пробой все животные дают отрицательные реакции или стадо сформировано из особей благополучных стад, не реагировавших на туберкулин через 60 дней после формирования [4]. Однако такие критерии благополучия даже по представлениям конца прошлого века не гарантируют отсутствия в стаде животных, инфицированных МБТ. Известно, что чувствительность туберкулиновой пробы редко достигает 100 % [1, 5], а 2–5 % зараженных животных вообще могут быть анергичны к туберкулину [6]. Кроме того, осуществление противотуберкулезных мероприятий приводит к тому, что в организм попадает меньше МБТ, что позволяет иммунной системе переводить их в dormantное состояние, в L-, CWD- (cell wall deficient – с дефектной клеточной стенкой) формы, предотвращая развитие макроскопических туберкулезных изменений и клиническое проявление болезни [7, 8, 9]. Такая латентная инфекция может скрыто протекать пожизненно, так L- (CWD) формы практически не индуцируют гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) к стандартному туберкулину [10, 11, 12], и инфицированные животные могут длительно оставаться невыявленными. Тем не менее, именно такие особи с большей вероятностью могут стать туберкулин-позитивными. Это происходит из-за того, что персистирующие CWD МБТ обладают не менее 30 % антигенов, общих с антигенами типичных и атипичных нетуберкулезных микобактерий (НТМБ) [13], которые, попадая в организм даже в незначительном количестве, могут вызвать вторичный иммун-

ный ответ и ГЗТ к туберкулину. Вероятно, с этим связано то, что, несмотря на почти 100-летнюю историю противотуберкулезных мероприятий, в оздоровленных стадах без заноса инфекции извне периодически появляются реагирующие на туберкулин особи [14].

Показателем того, что скрытая туберкулезная инфекция может быть в стадах стран, которые давно считаются свободными от туберкулеза крупного рогатого скота, может быть и факт обнаружения ДНК *M. bovis* в 5 % проб ультрапастеризованных молочных продуктов, из которых 89,9 % были произведены в Испании, 6,6 % – во Франции, 0,8 % – в Ирландии, 0,4 % – в Италии, 0,8 % – в Германии, 0,8 % – в Нидерландах, 0,8 % – в Швейцарии [15]. При этом рутинные тесты контроля статуса стада явно свидетельствовали о том, что они официально свободны от туберкулеза и их молоко может идти на экспорт.

Целью работы было выявление риска скрытой туберкулезной инфекции у туберкулинотрицательных коров условно благополучных стад путем исследования молока как возможного фактора передачи инфекции с использованием ПЦР и методов выявления измененных (CWD) форм МБТ, которые трудно обнаружить рутинными тестами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Внутрикожной туберкулиновой пробой обследовали более 4000 коров длительно благополучных стад, в которых более 28 лет не выявлялись животные с туберкулезными изменениями, но периодически обнаруживались единичные реагирующие на туберкулин коровы, из патологического материала которых при рутинном бактериологическом исследовании МБТ не выделяли.

Животных исследовали туберкулином для млекопитающих с активностью 18055–19000 IU/мл, установленной относительно 1st International standard PPD tuberculin *M. bovis*, который вводили внутрикожно по 0,2 мл в среднюю треть шеи. Ре-

акции учитывали через 72 ч, измеряя кожные складки.

У 30 нереагировавших коров, находившихся в соседних стойлах или в секциях с туберкулинпозитивными особями, а также у 9 коров, давших неопределенную реакцию на туберкулин (с утолщением кожной складки 2-3 мм), отобрали пробы молока.

Пробы молока исследовали в ПЦР на присутствие генома МБТ с праймерами («Праймтех») 16S RNA, МРВ 70, МРВ 64, Is 6110 (ПЦР-RT). ДНК выделяли из проб, прогретых в лизирующем буфере 5 мин при температуре 95 °С на колонках с сорбентом (ИБОХ НАНБ). Амплификацию проводили на С1000™ ThermoCycler (BioRad) и на CFX96™ Real-Time System (BioRad) по стандартным протоколам.

Пробы молока исследовали в ИФА набором для выявления антимиkobактериальных антител в молоке у крупного рогатого скота и определения их специфичности «ИФА-М МБТ-НТМБ», ТУ ВУ 600049853.065-2017, и набором для выявления в крови и в молоке антигенов микобактерий и их комплексов с антителами «ИФА-ТУБИК», ТУ ВУ 600049853.064-2017.

Для бактериологического посева пробы молока прогревали на твердотельном термостате «Biosan» 2 раза по 15 мин при температуре 99 °С с интервалом 20 ч, 3 пробы были прогреты 10 ч при температуре 98 °С. Прогретье пробы смешивали (1:2) со стимулятором роста ВКГ или MucCel DW, инкубировали 24 ч при температуре 37 °С и высевали на питательную среду MucCel DW [16]. Посевы культивировали при температуре 37 °С. Мазки изолятов окрашивали по Kinyoun, микроскопию проводили на Olimpus B51X (10×100).

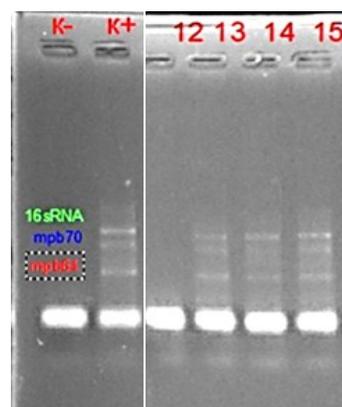
Для исключения возможного влияния введения туберкулина на появление у животных в крови и в молоке бактериологического маркера туберкулезной инфекции провели посев случайным образом отобранных сывороток крови 2 коров благополучного стада, в котором в последние 6 месяцев не проводилась туберкулинизация. Сыворотки фильтровали через стерилизую-

щий фильтр Millex® GP 0.22 μm, смешивали (1:2) со стимулятором роста ВКГ, инкубировали 24 ч при температуре 37 °С и высевали на питательную среду MucCel DW.

Для электрофореза в полиакриламидном геле (12 % ПААГ-ДСН, Laemmli, 1970) и иммуноблоттинга отмытую бактериальную массу изолятов суспендировали в буферном растворе для нанесения образцов (4х), прогревали 7 мин при температуре 98 °С, осаждали центрифугированием при 14 000 об/мин. Перенос осуществляли на Trans-blot SD. Иммунореактивные полипептиды выявляли с использованием бараньих антисывороток (1:60) к *M. tuberculosis* H₃₇Rv и CWD *M. bovis* 8, истощенных смесью антигенов *Staph. aureus*, *Strept. epidermidis*, *E. coli*, *Salm. dublin*, *Klebs. pneumonia*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ДНК из молока 53,3 % туберкулино-трицательных коров и 66,7 % особей с неопределенными реакциями на туберкулин дала положительную ПЦР с праймерами МРВ 64, МРВ 70, Is 6110, специфичными для комплекса *tuberculosis-bovis* (рисунок 1, таблица 1).



К- – отрицательный контроль;
К+ – положительный контроль;
12 – № 12п/388; 13 – № 13п/168;
14 – № 14п/628; 15 – № 15п/619
(сверху вниз амплификаты 16s RNA,
МРВ 70, МРВ 64)

Рисунок 1. – Электрофорез амплификатов ДНК из проб молока коров

Таблица 1. – Результаты исследования молока

№ коровы	ПЦР +	ИФА антитела	ИФА антигены МБТ и ИК ^X	Результат посева	ПЦР с ДНК изолятов
7/5	64, 6110	НИ	НИ	CWD МБТ	70, 64, 6110
9/7	64, 6110	НИ	НИ	CWD МБТ	64, 6110
2п Б/н	отр.	мбт+	-21 %+	CWD МБТ	16s, 70, 64, 6110
3п/787	16s, 70, 6110	мбт+	отр.	НИ	-
15п/619	16s, 70, 64	±	отр.	CWD МБТ	16s, 70, 64
16п/158	отр.	отр.	отр.	НИ	-
23п/707	отр.	отр.	отр.	НИ	-
18п/464	16s, 64, 6110	отр.	-21 %+	НИ	-
1п/806	16s, 70, 64	±	-18 %+	НИ	-
12п/388	16s, 70, 64 Is 6110	мбт+	отр.	CWD МБТ	16s, 70, 64, 6110
13п/168	16s, 70, 64	отр.	отр.	НИ	-
14п/628	16s, 70, 64	отр.	отр.	НИ	-
22п/502	70, 6110	отр.	отр.	CWD МБТ	16s, 70, 64, 6110
9п/п685	отр.	отр.	отр.	НИ	НИ
11п/947	16s, 70, 64, 6110	мбт+	-30%+	CWD МБТ	16s, 70, 64, 6110
12п/388	16s, 70, 64, 6110	мбт+	отр.	CWD МБТ	16s, 70, 64, 6110
20п/872	отр.	отр.	отр.	НИ	-
25п/097	отр.	отр.	отр.	CWD МБТ	16s, 70, 64
9п/п685	отр.	мбт+	отр.	НИ	-
11п/947	16s, 70, 64, 6110	мбт+	-30 %+	CWD МБТ	16s, 70, 64, 6110
20п/872	отр.	отр.	отр.	НИ	-
25п/097	отр.	отр.	отр.	CWD МБТ	16s, 70, 64
6/130кб	6110	отр.	-32 %+	отр.	-
7/696кб	6110	мбт+	отр.	CWD МБТ	6110
13/027кб	отр.	±	отр.	НИ	-
8/918 пм	отр.	отр.	отр.	НИ	-
10/782пм	отр.	мбт+	отр.	НИ	-
2/849пмр	отр.	мбт+	отр.	НИ	-
4/540пмр	отр.	мбт+	отр.	НИ	-
6/914	6110	±	-34 %+	НИ	-
Итого	Из 30-16+(53,3 %)	Из 27-11+(40,7 %)	Из 28-7+(25 %)	Из 13-12+(92,3 %)	

Примечания к таблицам 1 и 2: ^X – ИК иммунные комплексы и % снижения ОП в сравнении с контролем; НИ – не исследовали; жирным шрифтом выделены положительные результаты, красным цветом – пробы, прогретые 10 ч при температуре 98 °С

Повышенный уровень антител к антигенам МБТ выявлен у 40,7 % туберкулинотрицательных коров и 57,1 % животных с неопределенными реакциями на туберку-

лин. Антигены МБТ в молоке обнаружены, соответственно, в 25 % и 22,2 % случаев.

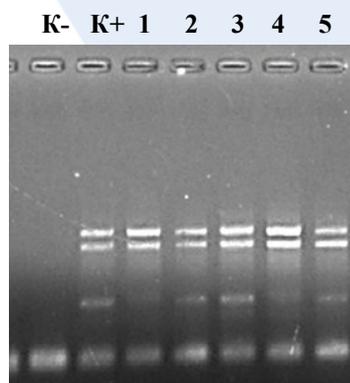
В ПЦР ДНК изолятов реагировала с праймерами комплекса *tuberculosis-bovis* –

MPV 70, MPV 64, Is 6110 (таблицы 1–3, рисунок 2), что указывало на то, что они являются CWD формами МБТ. Посевы прогретого молока, инкубированного в стимуляторах роста, в 92,3 % и 66,7 % слу-

чаев дали рост на среде МусСел DW некислоустойчивых (НКУ) полиморфных палочковидных форм с морфологией, характерной для CWD МБТ [17] (таблица 3).

Таблица 2. – Результаты исследования молока коров, давших неопределенные реакции на туберкулин

№ коровы	ПЦР +	ИФА антитела	ИФА антигены МБТ и ИК ^Х	Результат посева	ПЦР с ДНК изолятов
7п/Б/н	6110	мбт+	отр.	CWD МБТ	16s, 70, 64, 6110
17п/924	16s, 70, 64	НИ	отр.	НИ	-
24п/937	отр.	-	отр.	НИ	-
7п/Б/н	6110	мбт+	отр.	CWD МБТ	16s, 70, 64, 6110
17п/924	16s, 70, 64	НИ	отр.	НИ	-
24п/937	отр.	отр	отр.	НИ	-
14/422 кб	6110	мбт+	-24%+	НИ	-
1/360пм	отр,	отр.	±	отр.	-
3/764пм	6110	мбт+	-27%+	НИ	-
Итого	Из 9-6+(66,7 %)	Из 7-4+(57,1 %)	Из 9-2+(22,2 %)	Из 3-2+(66,7 %)	



К- – отрицательный контроль;
 К+ – положительный контроль;
 1 – № 7/5; 2 – № 2п б/н; 3 – № 11п/947;
 4 – № 12п/388; 5 – № 15п/619
 (сверху вниз амплификаты 16s RNA, MPV 70, MPV 64)

Рисунок 2. – Электрофорез амплификатов ДНК изолятов из молока коров

С данными ПЦР коррелировали результаты иммуноблоттинга с антисывороткой к *M. tuberculosis* H₃₇Rv, с которой реагировало до 18 полипептидов изолятов, а их спектр почти не отличался от спектра

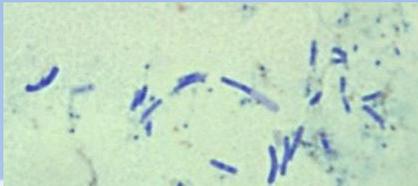
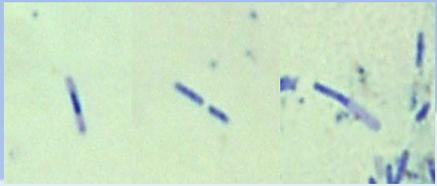
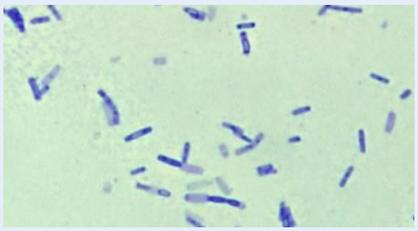
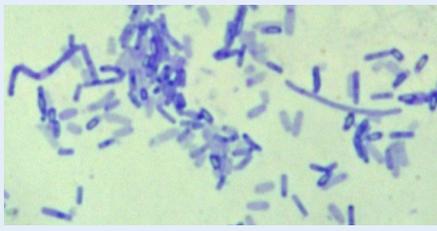
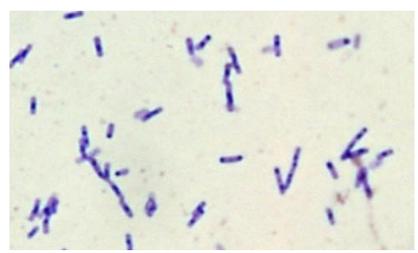
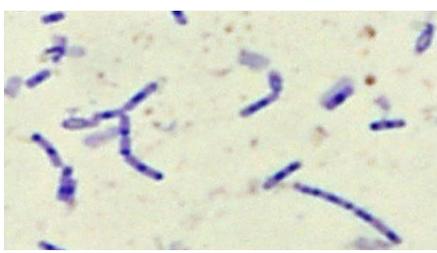
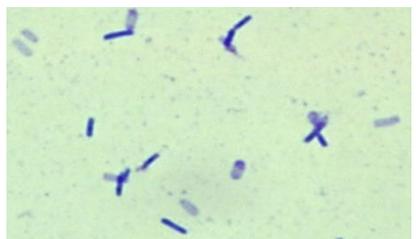
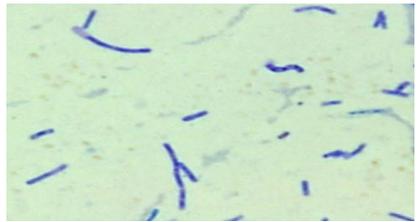
экспериментально полученного штамма CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv и изолята CWD *M. bovis* из лимфатического узла коровы с туберкулезными гранулемами (рисунок 3).



1 – CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv;
 2 – CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv;
 3 – изолят CWD МБТ из молока коровы 25п/097;
 4 – изолят CWD МБТ из лимфатического узла коровы с туберкулезными гранулемами

Рисунок 3. – Иммуноблоттинг. Электрофорез в 12%-ном ПААГ-ДСН, антисыворотка (барана) к *M. tuberculosis* H₃₇Rv, истощенная смесь бакмассы нетуберкулезной микрофлоры (1:60)

Таблица 3. – Изоляты из гретого молока туберкулинотрицательных коров

№ коровы, ПЦР+ с ДНК изолята	Морфология изолята	Характерные для CWD МБТ формы клеток у изолята
<p>2п Б/н 16s RNA, 70, 64, Is 6110</p>		
<p>11п/947 16s RNA, 70, 64, Is 6110</p>		
<p>12п/388 16s RNA, 70, 64, Is 6110</p>		
<p>15п/619 16s RNA, 70, 64</p>		
<p>22п/502 16s RNA, 70, 64, Is 6110</p>		
<p>25/097 16s RNA, 70, 64</p>		

При посеве сывороток крови коров, которым в последние 6 месяцев не вводили туберкулин, рост колоний на 5-е сутки дали обе пробы. Изоляты представляли собой НКУ палочковидные формы с типичной для CWD МБТ морфологией (таблица 4),

которые при продолжительном культивировании без пересева трансформировались в слабоокрашенные или «пустые» овальные формы иногда с КУ элементами красного цвета, а также в нитевидные зернистые формы. После пересева морфология

изолятов становилась одинаковой (таблица 5). Идентичность изолятов из крови 2 коров была подтверждена в электрофорезе в ПААГ-ДСН и иммуноблоттинге с антисывороткой к CWD *M. bovis* (рисунок 4).

При этом их полипептидный и антигенный спектр в основном совпадал со спектром CWD изолята из лимфатического узла коровы, больной туберкулезом.

Таблица 4. – Морфология изолятов из сывороток крови туберкулиноотрицательных коров № 3 и № 5, фильтрованных через Millex® GP 0.22 μm

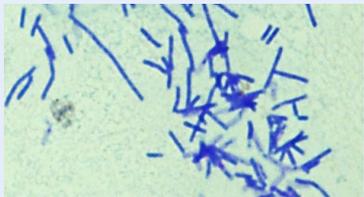
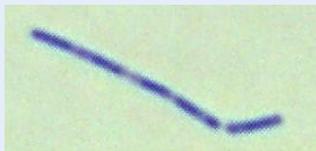
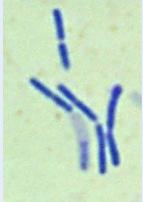
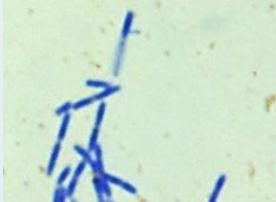
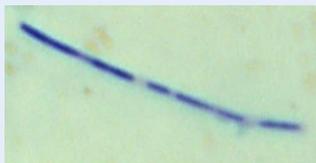
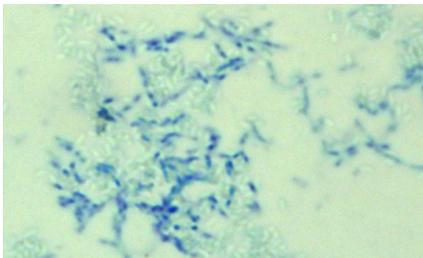
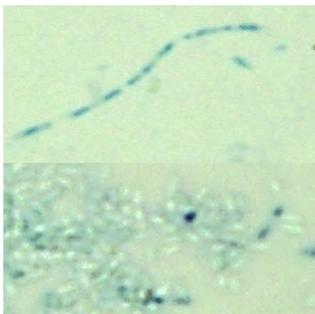
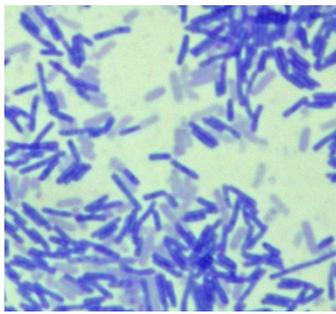
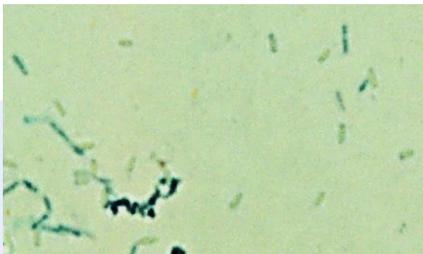
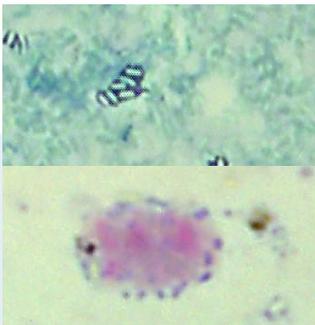
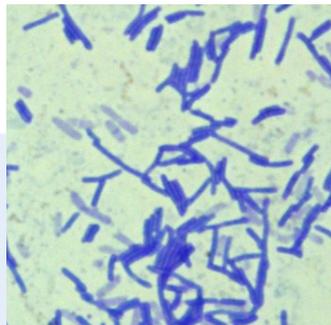
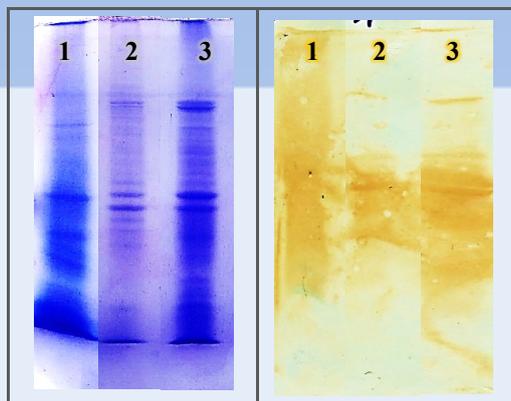
Морфология изолята	Характерные для CWD МБТ формы клеток		
			
			

Таблица 5. – Характерное изменение морфологии изолятов из сывороток крови на среде MycCel DW

Изолят после 2-месячной инкубации и обнаруженные характерные формы	Изолят через 24 ч после пересева	
Изолят из сыворотки № 3		
		
Изолят из сыворотки № 5		
		

Для выяснения статуса коров исследовали молоко, которое по информативности отражения процессов, происходящих в организме, почти не уступает крови, а его получение не требует значительных трудо-

затрат и травматизации животных. Кроме того, есть явная необходимость изучения биобезопасности молока как продукта, широко используемого в питании человека [15, 18].



- 1 – CWD *M. bovis* из лимфатического узла коровы, больной туберкулезом;
2, 3 – изоляты из сывороток крови коров № 3 и № 5 соответственно

Рисунок 4. – Электрофорез в 12%-ном ПААГ-ДСН и иммуноблоттинг с антисывороткой к CWD *M. bovis*, истощенной смесью антигенов нетуберкулезной микрофлоры

Известно, что в молоке коров, больных туберкулезом, как и у реагирующих на туберкулин особей без признаков активного заболевания, с помощью ПЦР можно обнаружить геном МБТ [18–20]. Но неожиданным оказалось получение ПЦР с праймерами *tuberculosis-bovis* и ДНК из 53,3 % проб молока туберкулинотрицательных и 66,7 % коров с неопределенной реакцией на туберкулин. Кроме того, в молоке 40,7 % и 57,1 % животных этих групп обнаружены антитела к антигенам МБТ, а в 25 % и 22,2 % проб – антигены МБТ. С учетом отсутствия признаков активного заболевания (отрицательные результаты аутопсии и бактериологического исследования по традиционным методикам) это свидетельствовало о скрытой латентной туберкулезной инфекции у части животных. Подтверждением этого было выделение некислотоустойчивых CWD-форм МБТ из 92,3 % и 66,7 % исследованных проб молока.

Выделение CWD МБТ из молока еще не означает, что МБТ персистировали в организме именно в этой форме. Пробы молока предварительно инкубировали в стимуляторах роста и высевали на специальную питательную среду, обеспечивающую рост преимущественно CWD-форм независимо от того, в какой форме МБТ присутствуют в пробах [16]. Поэтому изо-

ляты рассматривали как маркеры туберкулезной инфекции. Сейчас уже не вызывает сомнения, что МБТ в организме, помимо классической КУ палочки, могут находиться в дормантном состоянии (с пониженной вирулентностью и метаболизмом), в L-, CWD-, защитных и вирусоподобных формах [7, 11, 20–24]. Эта способность одинаковых по генотипу клеток создавать различные фенотипы считается эффективной формой адаптации для сохранения вида [21].

Выявление измененных форм МБТ рутинными методами почти невозможно из-за трудностей культивирования на традиционных питательных средах, потери КУ, снижения патогенности, изменения антигенного состава, появления других нетипичных свойств. Вместе с тем для прогноза возможного развития инфекционного процесса важно знать, в какой форме МБТ находятся в организме и в молоке. То, что животные не реагировали на туберкулин и в стадах не было признаков активной туберкулезной инфекции, указывает на то, что в организме исследованных особей не было типичных МБТ или они находились в дормантном состоянии. Скорее всего, МБТ персистировали в клетках в L- и CWD-формах, а также присутствовали в крови, в том числе в вирусоподобной фильтрующейся форме. Последнее было подтверждено выделением CWD МБТ из

сывороток крови, пропущенных через фильтр 0.22µm, как в настоящих, так и в ранее проведенных исследованиях [18]. Именно из крови вирусоподобные формы могли попадать в молоко. Вероятно, при этом даже происходит их концентрирование в продукте, так как для образования молока через вымя проходит большой объём крови.

Важным моментом было то, что для деконтаминации молока перед посевом, исходя из ранее установленной уникальной термостабильности МБТ [16, 18], использовали прогревание проб при температуре 98 °С 2 раза по 15 мин с интервалом 12 ч или однократно 10 ч. Большинство исследованных проб дали рост на среде МусСел DW, в том числе в 1 случае из 3 после 10 ч (!) прогревания. Эти результаты позволяют предположить, что в молоке туберкулиноотрицательных и коров с неопределенной реакцией на туберкулин находились термостабильные ультрамелкие «защитные» формы МБТ.

Известно, что при пастеризации молока типичные МБТ гибнут. Действительно, широкое использование термического обеззараживания молока резко снизило этиологическую роль *M. bovis* в заболеваемости человека [3]. Однако уже доказано, что при термическом стрессе МБТ могут образовывать термостабильные «защитные» формы [18, 23, 25, 26]. Опасность и роль таких форм МБТ практически не изучена. Интерес в первую очередь представляет возможность восстановления их жизнеспособности в организме. *In vitro* в этом процессе, видимо, основную роль играют стимуляторы роста (ВКГ, МусСел DW). Предполагается, что они стимулируют поступление в защитные формы водных растворов и активизируют Са-зависимые ферменты [27] и, возможно, синтез ростовых факторов, ускоряющих в субпикомолярных концентрациях рост МБТ [28]. Установлено, что жизнеспособность может восстанавливаться и *in vivo* с последующей персистенцией CWD МБТ [25].

Какие риски может обуславливать латентная туберкулезная инфекция и пер-

систенция CWD МБТ у коров? Наиболее заметным может быть эндогенное развитие активного туберкулеза. Маловероятно, что измененные формы МБТ способны быстро трансформироваться в типичные патогенные МБТ. Такая реверсия происходит редко даже при целенаправленных попытках ее индукции, [7, 11]. Способствующим моментом в этом процессе может быть развитие иммунодефицитов [7]. С другой стороны, персистенция живого измененного возбудителя, в частности у практически здоровых в отношении туберкулеза людей, рассматривается как фактор, создающий противотуберкулезную резистентность и вакцинный эффект [7].

Персистенция CWD МБТ, хотя они, как правило, практически не индуцируют чувствительность к классическому туберкулину [10, 12], может способствовать появлению аллергии к нему за счет значительного количества общих антигенов [13] и вторичного иммунного ответа при попадании в организм даже небольшого количества КУ клеток, в том числе нетуберкулезных микобактерий.

Важный момент – выделение с молоком измененных форм МБТ, которые способны выдерживать не только ультрапастеризацию, но и экстремально длительное воздействие высокой температуры. Безусловно, эффекты, которые могут быть связаны с потреблением такого молока и молочных продуктов, нуждаются в глубоком изучении, но уже сейчас известна определенная связь персистенции CWD МБТ с канцерогенезом [24, 29, 30].

В целом полученные результаты показали, что туберкулиновая проба как основной тест оценки статуса стад не отражает реальной ситуации и не позволяет добиться элиминации туберкулезной инфекции. В связи с этим необходимо использовать альтернативные тесты по определению прямых и косвенных маркеров туберкулезной инфекции и разработки новой системы противотуберкулезных мероприятий, в том числе учитывающих высокую вероятность трансплацентарной передачи [31].

ЛИТЕРАТУРА

1. Юсковец, М. К. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птиц / М. К. Юсковец. – Минск : Государственное издательство сельскохозяйственной литературы БССР, 1962. – 447 с.
2. Olmstead, A. L. *An Impossible Undertaking: The Eradication of Bovine Tuberculosis in the United States* / A. L. Olmstead, P. W. Rhode // *The Journal of Economic History*. – 2004. – Vol. 64, № 3. – P. 734–772.
3. Palmer, M. V. *Bovine Tuberculosis and the Establishment of an Eradication Program in the United States: Role of Veterinarians* / M. V. Palmer, W. R. Waters // *Veterinary Medicine International*. – 2011. – Vol. 2011. – P. 1–12.
4. Об утверждении санитарных и ветеринарно-санитарных правил по профилактике и ликвидации заболеваний, общих для человека и животных. Туберкулез: постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь и Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, 26 марта 2010 г., № 31/21 (в ред. постановления Минздрава, Минсельхозпрода от 15.12.2010 № 166/91) // *Эталон-Беларусь [Электронный ресурс]* / Нац. центр правовой информации Республики Беларусь. – Минск, 2010.
5. Лысенко, А. П. Чувствительность и специфичность внутрикожной туберкулиновой и симультанной пробы при туберкулезной инфекции в стаде / А. П. Лысенко // *Наше сельское хозяйство*. – 2016. – № 6. – С. 2–6.
6. Выявление больного туберкулёзом крупного рогатого скота в состоянии анергии к туберкулину / А. Х. Найманов [и др.] // *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. – 2019. – № 1. – С. 17–21.
7. Дорожкова, И. Р. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция / И. Р. Дорожкова, З. С. Земскова. – М. : Медицина, 1984. – 222 с.
8. Кузин, А. И. Латентная туберкулезная инфекция и ее значение в эпизоотологии туберкулеза крупного рогатого скота : автореф. дис. ... д-ра ветеринар. наук / А. И. Кузин. – М., 1977. – 30 с.
9. Рубцова, И. Н. Формы персистенции микобактерий в организме животных / И. Н. Рубцова, В. С. Федосеев, Н. Г. Кириленко // *Проблемы борьбы с болезнями жвачных животных в северных областях Казахстана : сб. науч. тр.* – Т. 68. – Целиноград, 1986. – С. 9–15.
10. Chandrasekhar, S. *Studies on cell-wall deficient non-acid fast variants of Mycobacterium tuberculosis* / S. Chandrasekhar, S. Ratnam // *Tubercle and Lung Disease*. – 1992. – Vol. 73, № 5. – P. 273–279.
11. Mattman, L. H. *Cell wall deficient forms: stealth pathogens* / L. H. Mattman. – 3rd ed. – Boca Raton : CRC Press, 2001. – 416 p.
12. Сырым, Н. С. Аллерген из Л-форм микобактерий бычьего вида для диагностики скрытой формы туберкулеза : автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук : 16.00.03 / Н. С. Сырым. – Алматы, 2004. – 19 с.
13. Особенности антигенного состава измененных форм микобактерий туберкулеза / А. П. Лысенко [и др.] // *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. – 2010. – № 10. – С. 54–58.
14. *The History of In Vivo Tuberculin Testing in Bovines: Tuberculosis, a One «Health» Issue* / M. Good [et al.] // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2018. – Vol. 5. – P. 59.
15. *Detection of Mycobacteria by Culture and DNA-Based Methods in Animal-Derived Food Products Purchased at Spanish Supermarkets* / I. A. Sevilla [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1030.
16. Феномен изменчивости микобактерий туберкулеза и его использование для обнаружения туберкулезной инфекции / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез – глобальная катастрофа человечества: материалы I Междунар. заочной науч.-практ. конф., 24 марта 2014 г.* / Ростов н/Д : РостГМУ, 2014. – С. 176–198.
17. Вирус бычьего лейкоза – вирусоподобная форма микобактерий туберкулеза? / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2019. – № 1. – С. 15–24.
18. Оценка эффективности термического обеззараживания молока туберкулинпозитивных коров с использованием методов детекции CWD форм микобактерий туберкулеза / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2017. – № 1. – С. 41–48.
19. Бактериологические маркеры микобактериальной инфекции и антитела в крови у животных после введения туберкулина / А. П. Лысенко [и др.] // *Мониторинг, прогнозування, хвороб тварин із використанням сучасних методів эпизоотології, молекулярної біології та біотехнології: міжвідомчий тематичний наук. зб. Міжнар. наук.-практ. конф. : Феодосія, 14–17 вересня 2009 р.* – С. 294–298.

20. *Diagnosis of mycobacteria in bovine milk: an overview* / C.A.D. Bolaños [et al.] // *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. – 2017. – Vol. 59. – P. 1–13.
21. *RNA-Seq Analysis of Mycobacterium avium Non-Coding Transcriptome* / D. Ignatov [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 9. – P. e74209.
22. *Slavchev, G. Stress-induced L-forms of Mycobacterium bovis: a challenge to survivability* / G. Slavchev, L. Michailova, N. Markova // *The New Microbiologica*. – 2013. – Vol. 36. – № 2. – P. 157–166.
23. *Sporulation in mycobacteria* / J. Ghosh [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 106. – № 26. – P. 10781–10786.
24. *Tian, Y. Detection of Mycobacterium tuberculosis L-forms and MPB64 gene in breast cancer tissues* / Y. Tian, X.K. Cui, T. Hao // *J. of Practical Medicine*. – 2013. – № 15. – P. 45–46.
25. *The tuberculin skin test: How safe is safe? – the tuberculin contains unknown forms capable of reverting to cell-wall-deficient mycobacteria* / A. P. Lysenko [et al.] // *Clinical and Experimental Medical Sciences*. – 2014. – Vol. 2. – P. 55–73.
26. *Микобактерии туберкулеза при термическом воздействии образуют защитные формы, проходящие через ультрафильтры и восстанавливающие жизнеспособность в виде CWD форм* / А. П. Лысенко [и др.] // *Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария*. – 2019. – № 1. – С. 33–45.
27. *Власенко, В. В. Туберкулез в фокусе проблем современности* / В. В. Власенко. – Винница : Наука, 1998. – 350 с.
28. *A family of autocrine growth factors in Mycobacterium tuberculosis* / G. V. Mukamolova [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2002. – Vol. 46, № 3. – P. 623–635.
29. *Clinical end-points associated with Mycobacterium tuberculosis and lung cancer: implications into host-pathogen interaction and coevolution* / Y. Tian [et al.] // *BioMed Research International*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–9.
30. *Broxmeyer, L. Cancer and the Science of Denial – with Breast Cancer/Long Island Breast Cancer* / L. Broxmeyer // *Journal of Tumor Medicine and Prevention*. – 2017. – Vol. 1, № 3. – P. 1–25.
31. *Трансплацентарная передача туберкулезной инфекции у коров, зараженных Mycobacterium bovis* / А. П. Лысенко [и др.] // *Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария*. – 2021. – № 2. – С. 18–25.

ПРЕПАРАТ ВЕТЕРИНАРНЫЙ

ХРОМАРЦИН



ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГИПОМИКРОЭЛЕМЕНТОЗОВ,
ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА МОЛОДНЯКА
И ЕГО СОХРАННОСТИ



наночастицы железа, цинка, марганца

- стимулируют синтез металлозависимых ферментов, которые улучшают работу сердечной мышцы;
- ускоряют ключевые биохимические процессы;
- повышают обмен веществ

УДК 619:616-078:637.12.05-619:616.5-002.525
<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-1-22-30>

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹
Кучвальский М.В., аспирант²
Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Высоцкий А.Э., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Якобсон Е.И., магистрант²
Красникова Е.Л., научный сотрудник¹

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск
²Белорусский государственный университет, г. Минск

УНИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА С ДЕФЕКТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКОЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ УЛЬТРАПАСТЕРИЗОВАННОГО МОЛОКА

Резюме

В молоке коров, не реагировавших на туберкулин, обнаружена ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ). После 10-часового прогревания при температуре 98 °С из 50 % проб такого молока выделены микобактерии туберкулеза с дефектной клеточной стенкой (cell wall deficient – CWD).

Штаммы CWD МБТ выдерживали пятичасовое прогревание при температуре 98 °С.

При нагревании закономерно изменялась морфология клеток, возрастала их кислотоустойчивость вплоть до появления полностью кислотоустойчивых клеток. Посев прогретых суспензий на специальную питательную среду во всех случаях дал рост CWD МБТ, не отличавшихся от исходных культур. Это подтверждает уникальную термическую устойчивость МБТ и указывает на то, что даже такое экстремальное термическое воздействие не решает проблему биобезопасности молока.

Ключевые слова: туберкулез крупного рогатого скота, скрытая туберкулезная инфекция, микобактерии туберкулеза с дефектной клеточной стенкой.

Summary

The DNA of *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) was found in the milk of cows that did not react to tuberculin. After 10 hours of warming up at 98 °C cell wall deficiency (CWD) mycobacterium tuberculosis was isolated from 50% of samples of such milk.

Strains of CWD MBT withstood 5 hour warming up at 98 °C.

The morphology of cells naturally changed during warming, their acid-fastness increased up to the appearance of completely acid-fast cells. Sowing of warmed suspensions on a special nutrient medium in all cases gave growth of CWD MBT which did not differ from the initial strains, which confirms the unique thermal stability of MBT and indicates that even such extreme thermal exposure does not solve the problem of biosafety of milk.

Keywords: bovine tuberculosis, latent tuberculosis, cell wall deficient tuberculosis mycobacteria.

Поступила в редакцию 12.03.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Уже более века известно, что микобактерии туберкулеза (МБТ) могут трансформироваться в полиморфные некислотоустойчивые (НКУ) формы (МБТ с дефектной клеточной стенкой – cell wall deficient – CWD) [1, 2]. Из-за трудностей их обнаружения, выделения, идентификации и ряда необычных свойств отношение к феномену часто граничит с недоверием

(это контаминация?!). Даже в Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [3] не упоминается о CWD МБТ. Проблема во многом связана с тем, что при трансформации меняется структура клеточной стенки, которая теряет способность удерживать фуксин при окраске по Цилю-Нильсену, из-за чего CWD МБТ не окрашиваются в характерный рубиново-красный цвет и оказываются «невидимыми»

для ортодоксального диагноста. Кроме того, у измененных НКУ МБТ резко снижается патогенность.

Подобные изменения заметно повышают возможности выживания МБТ. У НКУ МБТ в 20–30 раз ускоряется размножение, они приобретают способность к росту на простых средах и в диапазоне температур от 0 до 55 °С. Ультрамелкие формы МБТ проходят через стерилизующие фильтры и преодолевают плацентарный барьер [4–6]. С изменчивостью МБТ связана способность сохранять жизнеспособность после воздействия высокой температуры. Если типичные патогенные МБТ погибают при «мягких» режимах пастеризации молока, то измененные формы сохраняют жизнеспособность даже после ультрапастеризации [7].

Использование современных методов обнаружения генома и культивирования МБТ делает заметным то, что было невозможно обнаружить рутинными методами, и указывает на необходимость по-новому взглянуть на проблему биобезопасности. Так, ДНК *M. bovis* была обнаружена в 5 % проб ультрапастеризованных молочных продуктов, из которых 89,9 % были произведены в Испании, 6,6 % – во Франции, 0,8 % – в Ирландии, 0,4 % – в Италии, 0,8 % – в Германии, 0,8 % – в Нидерландах, 0,8 % – в Швейцарии [8]. Часть этих стран давно считаются свободными от туберкулеза крупного рогатого скота. Более того, из некоторых образцов ультрапастеризованного молока в коммерческих упаковках, произведенного в Швеции, Латвии, Украине, удалось выделить CWD МБТ [9].

Целью работы было исследование эффективности экстремального термического воздействия на жизнеспособность МБТ, способность их восстановления и изучение свойств МБТ, изолированных из молока.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали:

- 5 проб молока туберкулиноотрицательных коров из длительно благополучного по туберкулезу стада, в котором перио-

дически выявлялись животные, реагирующие на туберкулин;

- 2 изолята из коммерческого ультрапастеризованного молока производства Швеции («E3%Sw»), Латвии («La»);

- 1 изолят из сборного молока, фильтрованного через Millex GP 0.22 µm, коров неблагополучного по туберкулезу стада («Ne sb 0.22»);

- 1 изолят из прогретого 10 ч при температуре 98 °С молока туберкулиноотрицательной коровы («7/696кб»);

- 1 изолят из лимфатического узла коровы, зараженной *M. bovis* («Ne tbc»).

ПЦР. ДНК выделяли с помощью набора «РИБО-преп» (Амплисенс) и исследовали в ПЦР (условия амплификации приведены в таблице 1). Амплификацию проводили на C1000TM ThermoCycler (BioRad). Электрофорез полученных ампликонов проводили в 1,7%-ном агарозном геле (буфер ТАЕ) с использованием ДНК маркера молекулярного веса «M50BP» (Праймтех).

Для бактериологического посева Для бактериологического посева пробы молока прогревали на BioSan CH-100 10 ч при температуре 98 °С, смешивали (1:2) со стимулятором роста ВКГ, инкубировали 24 ч при температуре 37 °С и высевали на питательную среду МусСел DW [10].

Изоляты выращивали в среде Мус Сел DW 2 суток. Бактериальную массу суспендировали в стерильной дистиллированной воде (1,5–2 мг/мл). Пробирки Эппендорф с суспензиями прогревали 5 ч при температуре 98 °С на BioSan CH-100. Каждый час делали мазки (окраска по Кinyoun), через 3 и 5 ч гретые суспензии высевали (по 300 мкл) на среду МусСел DW. Посевы инкубировали при температуре 37 °С.

Для иммуноблоттинга отмытую бактериальную массу изолятов прогревали 7 мин при температуре 98 °С в загрузочном буферном растворе и подвергали электрофорезу в 10–12 % ПААГ-ДСН [11]. Перенос на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли на Trans-blot® SD (Biorad, США). В иммуноблоттинге использовали антисыворотки (1:60) к CWD *M. bovis* 8 и к

CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, истощенные антигенами *Staph. aureus*, *Strept. epidermidis*, *E. coli*, *Salm. dublin*, *Klebs. pneumoniae*.

Контролем служил экспериментально полученный штамм CWD *M. bovis* 8.

Таблица 1. – Условия амплификации

Локус		mtb-mpb64 mtb-5kst	16sRNA Mpb64 mpb70
Длина локусов, пар нуклеотидов		422 128	443 141 352
Последовательности праймеров (прямой и обратный, по локусам соответственно)		TCCGCTGCCAGTCGTCTTCC GTCCTCGCGAGTCTAGGCCA TTGCTGAACTTGACCTGCCCGTA GCGTCTCTGCCTTCTCCCGAT	GGTGGTTTGTTCGCGTTGTTC TGCACACAGGCCACAAGGGA TCCGCTGCCAGTCGTCTTCC GCAACTCCCCGGGTTGAAG GAACAATCCGGAGTTGACAA AGCACGCTGTCAATCATGTA
Температура (°C) и время (мин) этапа амплификации	первичная денатурация	94; 10:00	95; 4:00
	денатурация	94; 1:00	94; 1:00
	отжиг	60; 1:00	60; 1:00
	элонгация	72; 1:00	72; 1:30
	финальная элонгация	72; 5:00	72; 5:00
	количество циклов	40	35

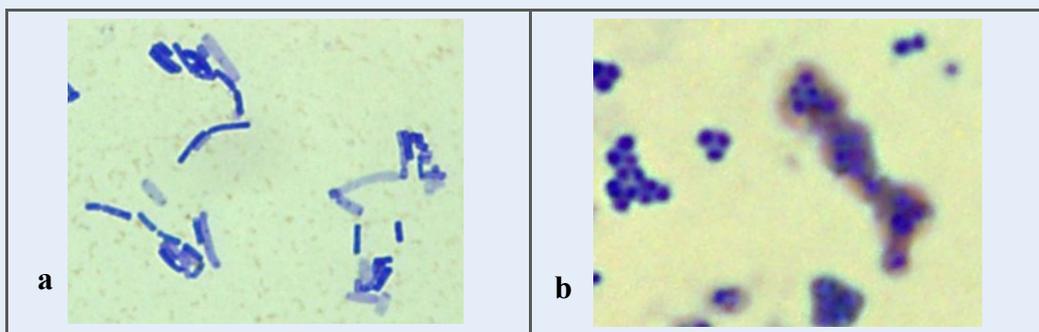
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В 4 из 5 исследованных проб (80 %) молока туберкулиноотрицательных коров обнаружен геном МБТ (таблица 2). После 10 ч прогревания при температуре 98 °C и инкубации в стимуляторе роста 2 пробы молока (40 % от исследованных и 50 % от

ПЦР-положительных соответственно) дали рост культур с характерной для CWD МБТ морфологией (палочковидные формы изолята «7/686кб» – рисунок 1а, таблица 2; коккоиды с частично кислотоустойчивыми (ЧКУ) элементами изолята «8/757кб» – рисунок 1б, таблица 2).

Таблица 2. – Результаты исследования молока туберкулиноотрицательных коров

№ коровы	ПЦР с ДНК из молока	Результат посева проб молока, гретых 10 ч при температуре 98 °C	ПЦР с ДНК изолята
6/130кб	Is 6110	роста нет	-
7/686кб	Is 6110	CWD МБТ	Is 6110
8/757кб	Is 6110	CWD МБТ	Is 6110
16/159кб	Is 6110	роста нет	-
1/360пм	отриц.	роста нет	-



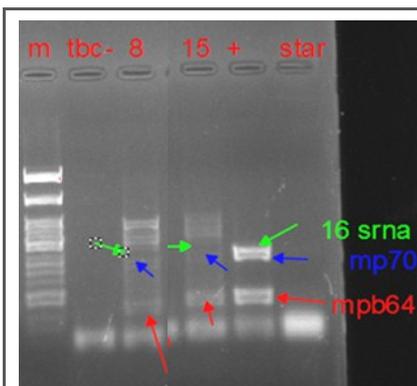
a – корова № 7/686кб; b – корова № 8/757кб

Рисунок 1. – Изоляты из молока коров, гремого 10 ч при температуре 98 °С

Результаты идентификации исследованных изолятов представлены в таблице 3 и на рисунке 2. С учетом НКУ, характерной морфологии и результатов ПЦР все они относились к CWD МБТ.

Таблица 3. – Результаты идентификации изолятов в ПЦР

Проба	ПЦР с ДНК изолята
«E3%Sw»	Is 6110 Cq 35.17
«La»	Is 6110 Cq 34.17
«Ne sb 0.22»	16sRNA+, MPB70+, MPB64+, Is 6110 Cq 34.11
«7/696кб»	Is 6110 Cq 34.10
«Ne tbc»	16sRNA+, MPB70+, MPB64+ Is 6110 Cq 33.15



m – маркер молекулярного веса; tbc- – отрицательный контроль; 8 – ДНК изолята «Ne tbc» из лимфатического узла коровы, зараженной *M. bovis*;
 15 – ДНК изолята из сборного молока «Ne sb 0.22» (16sRNA+, MPB70+, MPB64+);
 + – положительный контроль;
 star – «старая» ДНК
 (выделена более года до даты постановки реакции)

Рисунок 2. – Амплификаты ДНК полученных изолятов

В таблицах 4–7 суммированы результаты изучения изменения морфологии изолятов при прогреве при температуре 98 °С. Как видно, прослеживалась определенная закономерность. Под воздействием высокой температуры несколько увеличивался размер клеток, часть клеток окрашивалась сильнее метиленовым синим, а часть клеток теряла эту способность. После 2 ч прогревания в мазках увеличивалось количество «пустых» клеток. Вместе

с тем возрастало количество клеток с КУ и ЧКУ элементами, а в суспензии изолята «Ne sb 0.22» появились типичные КУ микобактерии (таблица 6). При продолжении прогревания в течение 3–5 ч у некоторых изолятов нарастало количество «пустых» и ЧКУ клеток (таблицы 4–7), причем у разных изолятов после 3–5 ч прогревания появлялись ЧКУ клетки идентичной морфологии (рисунок 3).

Таблица 4. – Изменение морфологии изолятов из молока и лимфатического узла коровы, зараженной *M. bovis* 8, при прогреве при температуре 98 °С

Изолят	Через 1 ч	Через 2 ч	Через 3 ч	Через 4 ч	Через 5 ч
«E3%Sw»	укрупнение и интенсивное окрашивание клеток	появление ЧКУ зернистости, снижение интенсивности окраски	появление длинных клеток	появление «пустых» и слабоокрашенных клеток	«пустые» и слабоокрашенные клетки
«La»	укрупнение и интенсивное окрашивание клеток	снижение интенсивности окраски	появление ЧКУ клеток	увеличение количества ЧКУ клеток	ЧКУ зернистость
«Ne sb 0.22»	укрупнение клеток	появление КУ клеток	преобладание НКУ клеток	появление ЧКУ клеток	появление ЧКУ зернистости
«7/696кб»	укрупнение и появление «пустых» клеток	появление ЧКУ клеток	появление пустых и слабоокрашенных клеток	появление длинных и ЧКУ клеток	ЧКУ клетки
«Ne tbc»	укрупнение и появление «пустых» клеток	появление ЧКУ зернистости, снижение интенсивности окраски	исчезновение ЧКУ клеток	появление ЧКУ и «пустых» клеток	преобладание НКУ клеток

Таблица 5. – Морфология изолята из молока «E3%Sw» при прогреве при температуре 98 °С и результаты посева после 3 и 5 ч нагревания (Kinyoun, 10×100)

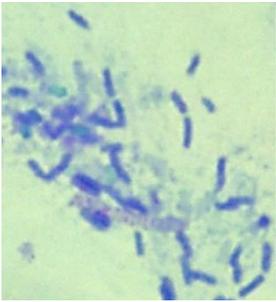
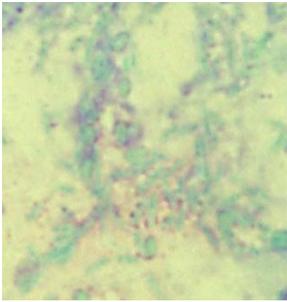
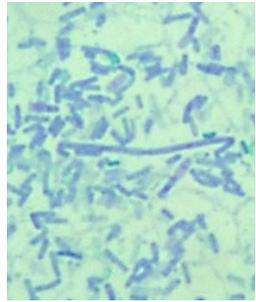
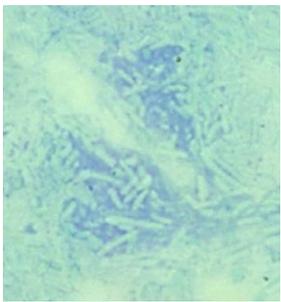
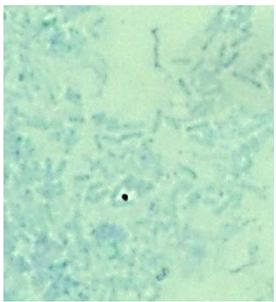
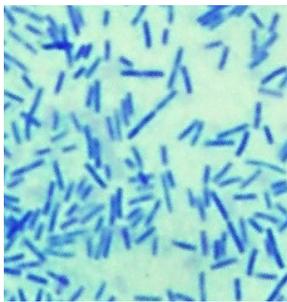
До прогревания	Через 1 ч	Через 2 ч	Через 3 ч
			
Через 4 ч	Через 5 ч	Рост после 3 ч прогрева	Рост после 5 ч прогрева
			

Таблица 6. – Морфология изолята из молока «La» при прогреве при температуре 98 °С и результаты посева после 3 и 5 ч нагревания (Kinyoun, 10×100)

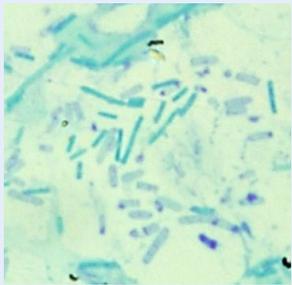
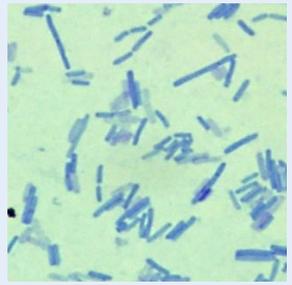
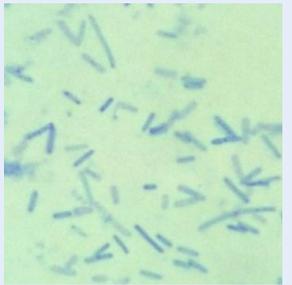
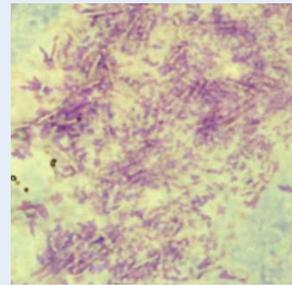
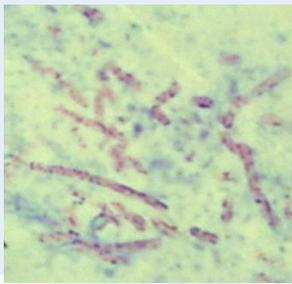
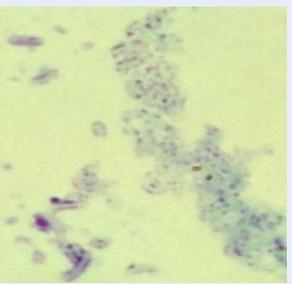
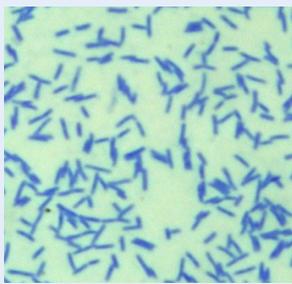
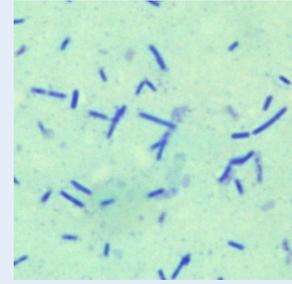
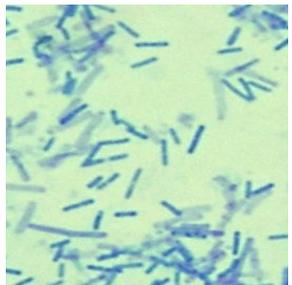
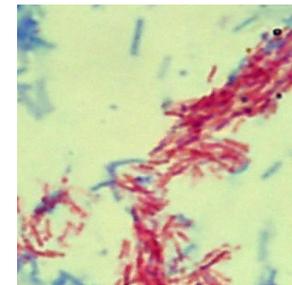
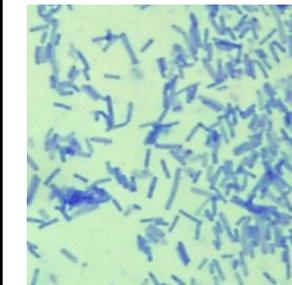
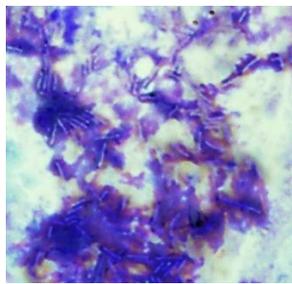
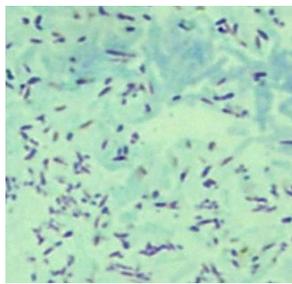
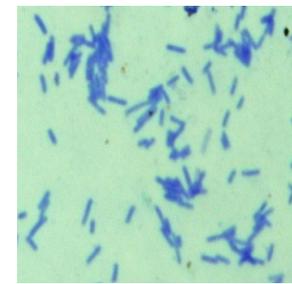
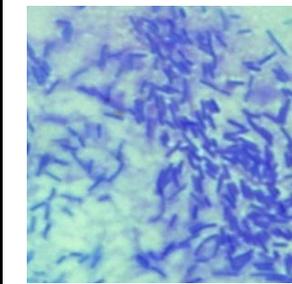
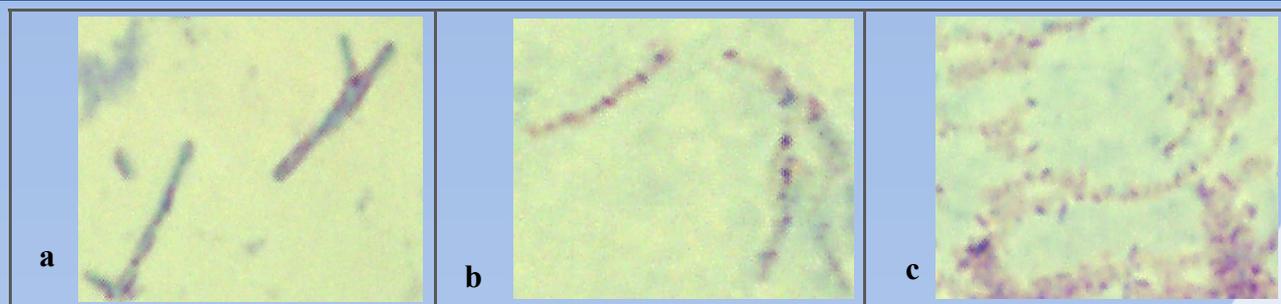
До прогрева	Через 1 ч	Через 2 ч	Через 3 ч
			
Через 4 ч	Через 5 ч	Рост после 3 ч прогрева	Рост после 5 ч прогрева
			

Таблица 7. – Морфология изолята из молока «Ne sb 0.22» при прогреве при температуре 98 °С и результаты посева после 3 и 5 ч нагревания (Kinyoun, 10×100)

До прогрева	Через 1 ч	Через 2 ч	Через 3 ч
			
Через 4 ч	Через 5 ч	Рост после 3 ч прогрева	Рост после 5 ч прогрева
			

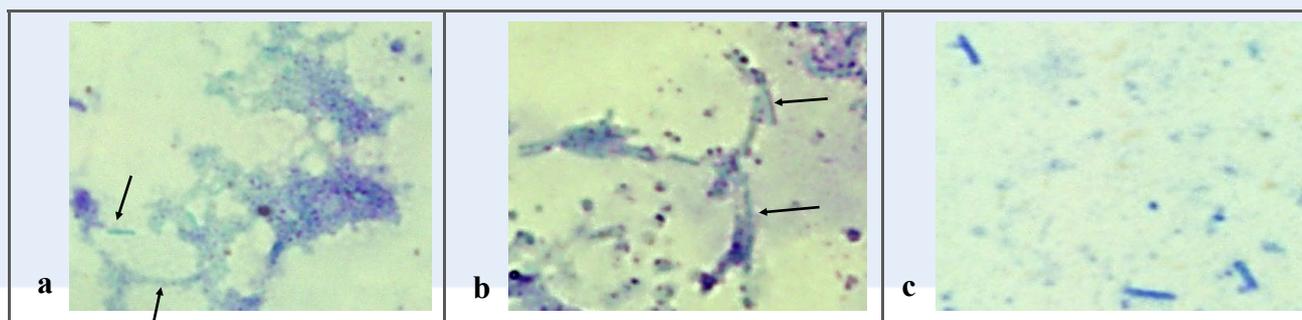
Посев проб на среду МусСел DW после 3 и 5 ч прогрева при температуре 98 °С во всех случаях дал рост микроорганизмов, не отличавшихся по морфологии от исходных изолятов до прогрева (таблицы 5–7). Более того, фильтрат суспензии, полученный фильтрацией через Millex GP 0.22 µm, изолята «Ne sb 0.22», выросшего

после 5 ч прогрева при температуре 98 °С, дал рост во II «слепо» пересеве, через 14 дней после исходного посева. Рост начался с появлением протопластов с КУ зернистостью (рисунок 4а, б), в которых формировались палочковидные формы (рисунок 4).



а – прогрев 2 ч изолята из молока 7/696кб; б – прогрев 5 ч изолята из молока 7/696кб;
 с – прогрев 4 ч изолята из лимфатического узла «Ne tbc»

Рисунок 3. – Появление ЧКУ клеток после прогревания при температуре 98 °С (Kinyoun, 10×100)

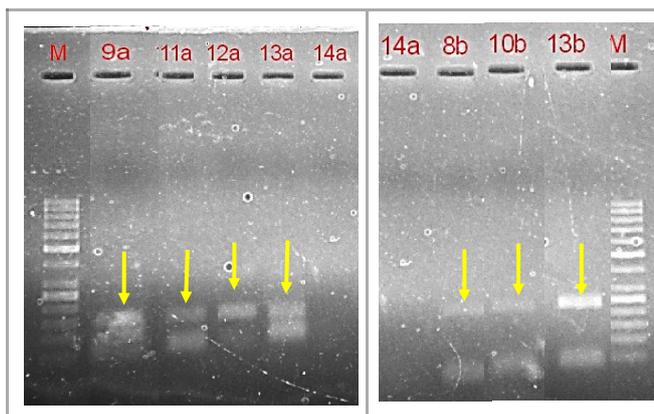


а, б – начало роста (стрелки – формирующиеся палочковидные формы);
 с – рост палочковидных форм

Рисунок 4. – Рост в посевах фильтрата (0.22 μm) суспензии изолята «Ne sb 0.22», выросшего после 5 ч прогревания при температуре 98 °С (Kinyoun, 10×100)

ДНК культур, выросших после 3 и 5 ч прогревания при температуре 98 °С, реагировала в ПЦР с праймерами *mtb-5kst* (локус «5 kb specific target», характерный для рода *Mycobacterium*) и *mtb-mpb64* (локус антигена MPB64, характерного для микобактерий туберкулеза) (рисунок 5), а их антигенный состав в иммуноблоттинге с антисывороткой к CWD *M. bovis* 8 не отличался как друг от друга, так и от экспериментально полученного штамма CWD *M. bovis* 8 (рисунок 6).

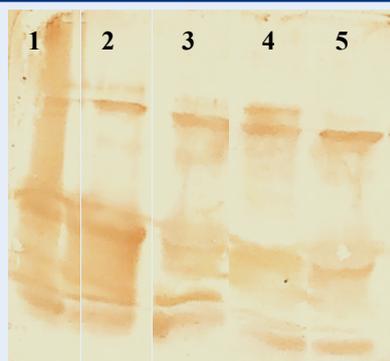
В 80 % исследованных проб молока туберкулиноотрицательных коров обнаружен геном МБТ. После 10 ч прогревания при температуре 98 °С из 50 % этих проб удалось выделить CWD МБТ. Это подтверждает уникальную термическую устойчивость МБТ [7, 8, 12] и указывает на то, что даже такое экстремальное воздействие не решает проблему биобезопасности молока.



ПЦР с праймерами *mtb-5kst*: М – маркер молекулярного веса; 9а – «Ne tbc» (5 ч); 11а – «Ne sb 0.22» (5 ч); 12а – «7/696кб» (3 ч); 13а – «7/696кб» (5 ч);

ПЦР с праймерами *mtb-mpb64*: 8b – «Ne tbc» (3 ч); 10b – «Ne sb 0.22» (3 ч); 13b – «7/696кб» (5 ч); 14а – К-

Рисунок 5. – Амплификаты ДНК культур, выросших после прогревания при температуре 98 °С



- 1 – CWD *M. bovis* 8; 2 – изолят из лимфатического узла коровы, больной туберкулезом «Ne tbc» (5 ч, 98 °С);
 3 – изолят из молока «E3%Sw» (3 ч, 98 °С);
 4 – изолят из молока «La» (5 ч, 98 °С);
 5 – изолят из молока «Ne sb 0.22» (5 ч, 98 °С)

Рисунок 6. – Иммуноблоттинг с антисывороткой к CWD *M. bovis* 8 (1:60). Иммуноблоттингу был подвержен гель 12 % ПААГ-ДСН после электрофореза

Возникает вопрос: находились ли типичные МБТ в молоке? Скорее всего, нет, так как коровы не реагировали на туберкулин, а в стаде более 30 лет не выявляли больных животных. Вероятно, МБТ персистировали в CWD (L-?) формах, которые не индуцируют гиперчувствительности к туберкулину, но образуют вирусоподобные формы, которые выделяются с молоком. Вероятно, такие формы дополнительно трансформируются при термическом стрессе в «защитные» формы [9, 13]. Пока не ясно, что происходит с такими «защитными» формами при хранении и употреблении молока. В наших исследованиях восстановление жизнеспособности в виде CWD МБТ достигалось путем инкубации прогретого молока в стимуляторе роста и посева на питательную среду, предназначенную для выделения CWD МБТ. Состав стимулятора роста подобран эмпирически, и точный механизм его действия не ясен [10]. Предполагается, что он активизирует поступление водных растворов в ультрамелкие защитные формы и стимулирует их развитие в CWD МБТ [10, 12]. Нельзя исключать, что подобный процесс может проходить и при хранении молока, причем даже при относительно низких температурах [14]. Поэтому интерес представляло изучение изолятов из ультрапастеризованного молока. Установлено, что при длительном воздействии высокой температуры происходило закономерное изменение их морфологии. Деструкции клеток замечено не было, а их кислотоустойчивость возрастала. Создавалось впечатление, что клетки все время оставались живыми. Более того, изолят из сборного молока неблагополучного стада «Ne sb 0.22» после 2 ч прогревания

при температуре 98 °С частично трансформировался в типичные КУ микобактерии. Необходимо отметить, что в исходном посева «Ne sb 0.22» такие КУ клетки отсутствовали, и при продолжении нагревания они также исчезали.

В конечном итоге 5-часовой прогрев изолятов из молока приводил к их превращению в слабо окрашивающиеся и ЧКУ клетки, а также в протопласты с ЧКУ зернистостью. Тем не менее после посева прогретых 3 и 5 ч суспензий на среду Мус Сел DW без предварительной инкубации в стимуляторе роста во всех случаях был получен рост CWD МБТ, не отличавшихся от исходных изолятов. Эти результаты свидетельствуют, что многократная термическая обработка молока при наличии в нем защитных форм и CWD МБТ не стерилизует продукт. Более того, проблема не решается стерилизующей фильтрацией, так как, в частности, фильтрат изолята «Ne sb 0.22» из сборного молока неблагополучного стада, полученный фильтрацией через Millex GP 0.22 µm, дал рост на среде МусСел DW.

Безусловно, проблема нуждается в дальнейшем изучении, так как формы МБТ, образующиеся при воздействии высокой температуры, способны восстанавливать жизнеспособность не только в специальных условиях, но и в организме [13]. Хотя они и не вызывают явного заболевания, но способны пожизненно персистировать в организме. Достаточно обоснованно такую персистенцию связывают с развитием опухолей [4, 15, 16]. В наших исследованиях по антигенному составу и полипептидному профилю изоляты из молока были практически идентичны экспериментально полученному CWD штамму CWD *M. tuber-*

culosis H₃₇Rv и изолятам из опухолей, в частности изоляту из крови человека «L-1» с аденокарциномой предстательной железы (рисунок 7).



- 1 – CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv;
 2 – изолят из ультрапастеризованного молока «E3%Sw»;
 3 – изолят из крови человека «L-1»
 с аденокарциномой предстательной железы

Рисунок 7. – Иммуноблоттинг с антисывороткой к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv (1:60). Иммуноблоттингу был подвержен гель 12 % ПААГ-ДСН после электрофореза

ЛИТЕРАТУРА

1. Ferran, J. *La nueva bacteriología de la tuberculosis : Congreso de la Tuberculosis / J. Ferran. – Valencia : Litografía de Jose Ortega, 1912. – 51 p.*
2. Кумбари, С. А. О новой форме роста туберкулезных бацилл в связи с иммунитетом при этом заболевании / С. А. Кумбари // *Гигиена и санитария. – 1910. – Т. 1. – С. 29.*
3. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 5: The Actinobacteria / B. W. Whitman [et al.]. – Baltimore : Williams & Wilkins, 2012. – 2083 p.*
4. *Morphological, biological, and immunological studies on isolates from tumors and leukemic bloods / F. B. Seibert [et al.] // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1970. – Vol. 174, № 2. – P. 690–728.*
5. Markova, N. *Unique biological properties of Mycobacterium tuberculosis L-form variants: impact for survival under stress / N. Markova, G. Slavchev, L. Michailova // International Microbiology : The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology. – 2012. – Vol. 15, № 2. – P. 61–68.*
6. Markova, N. *Cell Wall Deficiency in Mycobacteria: Latency and Persistence / N. Markova // Understanding Tuberculosis – Deciphering the Secret Life of the Bacilli / ed. P.-J. Cardona. – InTech, 2012. – Cell Wall Deficiency in Mycobacteria. – P. 193–216.*
7. Оценка эффективности термического обеззараживания молока туберкулинпозитивных коров с использованием методов детекции CWD форм микобактерий туберкулеза / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир. – 2017. – № 1. – С. 41–48.*
8. *Detection of Mycobacteria by Culture and DNA-Based Methods in Animal-Derived Food Products Purchased at Spanish Supermarkets / I. A. Sevilla [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. 1030.*
9. Обнаружение маркеров скрытой туберкулезной инфекции в ультрапастеризованном молоке, произведенном в разных странах / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир. – 2021. – № 2. – С. 13–25.*
10. Власенко, В. В. *Туберкулез в фокусе проблем современности / В. В. Власенко. – Винница : Наука, 1998. – 350 с.*
11. Laemmli, U. K. *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.*
12. Феномен изменчивости микобактерий туберкулеза и его использование для обнаружения туберкулезной инфекции / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез – глобальная катастрофа человечества : материалы I Междунар. заочной науч.-практ. конф., 24 марта 2014 г. / Ростов н/Д. : РостГМУ, 2014. – С. 176–198.*
13. *The tuberculin skin test: How safe is safe? – the tuberculin contains unknown forms capable of reverting to cell-wall-deficient mycobacteria / A. P. Lysenko [et al.] // Clinical and Experimental Medical Sciences. – 2014. – Vol. 2. – P. 55–73.*
14. *Dissociation of Mycobacterium bovis: Morphology, Biological Properties and Lipids / O. Tkachenko [et al.] // Advances in Animal and Veterinary Sciences. – 2020. – Vol. 8, № 3. – P. 312–326.*
15. Tian, Y. *Detection of Mycobacterium tuberculosis L-forms and MPB64 gene in breast cancer tissues / Y. Tian, X. K. Cui, T. Hao // J. of Practical Medicine. – 2013. – № 15. – P. 45–46.*
16. *Clinical end-points associated with Mycobacterium tuberculosis and lung cancer: implications into host-pathogen interaction and coevolution / Y. Tian [et al.] // BioMed Research International. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–9.*

УДК [619:616-097+619:615.33]:619:579.842.11
<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-1-31-36>

Якубовский С.М., научный сотрудник
Насонов И.В., доктор ветеринарных наук, профессор
Кныш Н.В., кандидат ветеринарных наук
Радюш И.С., кандидат ветеринарных наук, доцент

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

СИНТЕЗ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛО-АНТИБИОТИК ДЛЯ БОРЬБЫ С БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Резюме

Предложен способ получения конъюгатов антитело-антибиотик с доксициклином, иммунокомпетентных к *Escherichia coli*. Иммуноглобулины яичного желтка кур, иммунизированных кишечной палочкой, были конъюгированы с антибиотиком с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего реагента. За реакцией конъюгации следили спектрофотометрически и выявили образование отчетливых полос поглощения в ультрафиолетовых областях.

Кинетический анализ образования конъюгатов методом Гуггенгейма показал, что реакция конъюгации подчиняется кинетике реакций первого порядка. Константа скорости равнялась $0,77 \text{ мин}^{-1}$. Период полупревращения иммуноглобулинов при конъюгации с глутаровым альдегидом составил около 1 мин. Реакция протекала быстро в водном растворе при комнатной температуре. Молярное соотношение доксициклин : антитело в конъюгате составляло 2:1.

Ключевые слова: антитела, иммуноглобулины яичного желтка, антитело-антибиотик, конъюгаты, доксициклин.

Summary

Design of antibody-antibiotic conjugates with doxycycline immunocompetent to *Escherichia coli* is proposed. The egg yolk immunoglobulins from hens immunized with *Escherichia coli* have been conjugated with the antibiotic using the glutaraldehyde as the crosslinking reagent. The reaction of conjugation was followed spectrophotometrically and revealed the formation of distinct absorption bands in ultraviolet regions. The kinetic analysis of forming the conjugates by the Guggenheim method showed that the conjugation reaction obeyed the kinetics of the first-order reactions. The velocity constant equaled $0,77 \text{ min}^{-1}$. The half-conversion period of immunoglobulins during conjugation with glutaraldehyde was about 1 min. The reaction was rapid in aqueous solution at room temperature. The molar ratio of doxycycline : antibody in the conjugate was 2:1.

Keywords: antibodies, egg yolk immunoglobulins, antibody-antibiotic, conjugates, doxycycline.

Поступила в редакцию 22.04.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое использование антибиотиков для борьбы с бактериальными инфекциями, а также применение антибиотиков в качестве кормовых добавок с целью профилактических мероприятий в животноводстве привело к феномену глобальной резистентности бактерий к антибиотикам. Причем в этой борьбе бактерии одерживают победу, опережая разработчиков антибактериальных препаратов. Хотя скорость распространения резистентных бактерий по сравнению с пандемией бактериальных ин-

фекций значительно меньше, тем не менее, это явление приобретает характер мировой проблемы как в области здравоохранения, так и в животноводстве [6].

Одной из наиболее перспективных стратегий для преодоления резистентности является целенаправленная доставка антибиотика непосредственно в очаг инфекции. Использование конструкций конъюгатов антибиотиков с антителами, специфичными к определенным бактериям, является эффективным способом решения данной проблемы. Более того, сочетанное

действие составных компонентов этих конструкций на бактерии обеспечивает синергичное антибактериальное действие антител и антибиотиков [4, 9].

В настоящей работе в качестве антител использовали антиген-специфичные желточные иммуноглобулины кур (IgY) к *Escherichia coli*. Большинство штаммов *Escherichia coli* устойчивы ко многим маркетинговым антибиотикам для кур, включая цефрадин, тетрациклины, хлорамфеникол, аминогликозиды, бета-лактамы антибиотики и сульфаниламиды. Антибиотики выбираются на основе проявления клинических признаков заболевания и тестирования бактериального изолята на чувствительность к их бактерицидному действию.

Несмотря на то, что многие комменсальные кишечные палочки не являются патогенными, некоторые могут приобретать факторы вирулентности посредством трансдукции генов вирулентности, опосредованной плазмидами. Птичья патогенная кишечная палочка вызывает такое тяжелое заболевание, как колибациллез. Манифестация колибациллеза может иметь различные клинические формы: септицемия, кишечная, бронхолегочная или смешанная. Птицы с сопутствующими заболеваниями, такими как микоплазмоз, инфекционный бронхит, болезнь Ньюкасла, геморрагический энтерит, бордетеллез индейки, а также из-за неблагоприятных экологических факторов особенно подвержены заболеванию колибациллезом, что приобретает характер пандемии и наносит существенный экономический ущерб птицеводству во всем мире [5].

Использование птиц в качестве источника антител в форме яичных иммуноглобулинов к различным антигенам приобрело широкое распространение в силу филогенетических различий между птицами и млекопитающими. Яичные иммуноглобулины не взаимодействуют с системой комплемента млекопитающих, а также не вступают в перекрестные реакции с иммуноглобулинами IgG млекопитающих [2]. Таким образом, применение яичных иммуноглобулинов в качестве несущей платфор-

мы для фармакологических препаратов исключает развитие побочных иммуногенных реакций организма.

Для создания конъюгата в качестве антибиотика использовали доксициклин, эффективность которого доказана при экспериментальном колибациллезе цыплят-бройлеров [5].

В основе молекулярного механизма образования конъюгатов между белками, а также конъюгированных белков с молекулами других классов химических соединений лежит образование ковалентных связей между различными функциональными группами сшивающего агента и свободными химическими сульфгидридными, амино- и карбоксильными группами белков.

Образование конъюгатов зависит от природы сшивающего агента. Глутаровый альдегид представляет собой мягкий сшивающий агент, поскольку реакция конъюгации протекает в водном буферном растворе в условиях, близких к физиологическим значениям pH, ионной силе и температуре. Глутаровый альдегид образует амидные связи со свободными ξ -аминогруппами лизиновых остатков белков.

Яичные иммуноглобулины – это водорастворимые белки, которые локализуются в желтке куриных яиц. Как правило, поверхность белка, обращенная к водной среде, содержит множество остатков лизина из-за высокой полярности аминогруппы. Следовательно, с учетом водорастворимого характера яичных иммуноглобулинов эти антитела отличаются высоким содержанием аминокислот и легко могут вступать в реакции белковых сшивок с глутаровым альдегидом. Считается, что лизиновые остатки не влияют на биологическую активность белков, следовательно, можно ожидать, что не будут влиять на аффинные и эффекторные свойства антител.

Целью нашей работы явилось получение конъюгированных с антибиотиком антиген-специфичных желточных иммуноглобулинов к *Escherichia coli* для профилактики лечения колибактериозов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источником яичных иммуноглобулинов являлись куры яйценокских пород, гипериммунизированных инактивированной культурой клеток *Escherichia coli* [1]. Иммуноглобулины выделяли из желтков яиц с использованием системы органических растворителей [3]. Конъюгаты получали путем образования ковалентных сшивок между молекулами иммуноглобулинов и

доксициклином с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего агента [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Образование конъюгатов яичных иммуноглобулинов с глутаровым альдегидом регистрировали методом дифференциальной спектроскопии в ультрафиолетовом диапазоне длины волн.

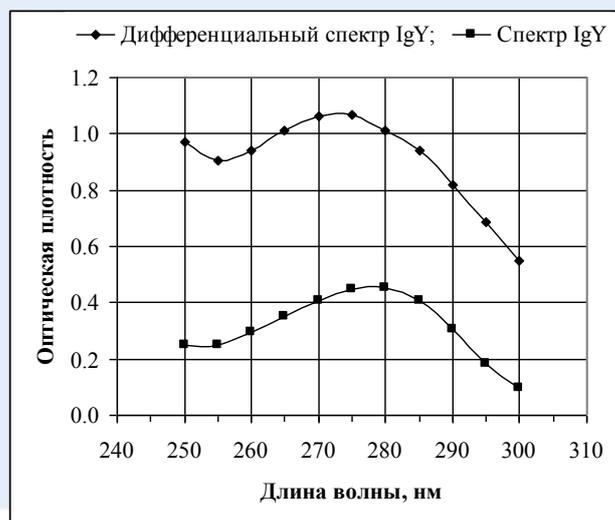


Рисунок 1. – Дифференциальный УФ-спектр конъюгата IgY с глутаровым альдегидом и УФ-спектр поглощения нативных IgY

Как видно из рисунка 1, после обработки иммуноглобулинов глутаровым альдегидом наблюдалось увеличение оптической плотности в диапазоне длины волн 250–300 нм. Оптическая плотность при характеристической длине волны для белков 280 нм значительно увеличивалась, и наблюдался сдвиг УФ-спектра поглощения на 5 нм в коротковолновую область. При этом максимум поглощения отмечался в диапазоне 260–275 нм. Можно заключить, что критерием образования конъюгата глутарового альдегида с белком является увеличение оптических плотностей УФ-спектров в исследуемом диапазоне длины волн и выраженный гипсохромный эффект (коротковолновый сдвиг) в спектре белка. Полученные результаты согласуются с аналогичными данными других исследователей, полученными при изучении взаимодействия глутарового альдегида с различными белками [8].

Обратимость реакции между глутаровым альдегидом и белками исследовали путем разбавления аликвот реакционных смесей, которым давали уравниваться в течение 24 ч, с последующим наблюдением за спектрами разбавленных растворов в течение следующих 24 ч при 270 нм. График зависимости оптической плотности комплекса глутаровый альдегид-иммуноглобулины через 24 ч после разбавления показан на рисунке 2 и имеет линейный характер. Если бы обратная реакция протекала в заметной степени, различные сдвиги положения равновесия (в направлении реагентов) происходили бы при различных разведениях, что приводило бы к систематическому искривлению графика. Такого эффекта не наблюдалось, и мы приходим к выводу, что в наших условиях скорость обратной реакции ничтожно мала.

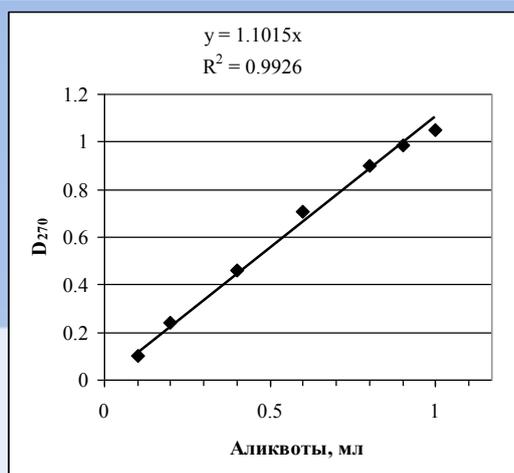


Рисунок 2. – Зависимость оптической плотности от разведения конъюгата IgY с глутаровым альдегидом через 24-часовой период выжидания после разведения конъюгата

Полученные данные указывают, что продукт реакции, формирующийся между глутаровым альдегидом и иммуноглобулинами, не диссоциирует при разбавлении реакционной смеси, поэтому можно заключить, что реакция носит необратимый характер. Необратимость реакции свидетельствует о формировании прочной ковалентной аминок-пептидной химической связи глутарового альдегида с иммуноглобулинами. Это свойство глутарового альдегида дает основание для его дальнейшего использования в качестве спейсерной молекулы для получения целевых конъюгатов иммуноглобулинов с антибиотиками.

Анализ константы скорости реакции методом Гуггенгейма [7] показал, что реакция конъюгации подчиняется реакциям первого порядка. На рисунке 3 представлены результаты измерения оптических плотностей при 265 нм, характерном максимуме конъюгатов глутарового альдегида с белками, через равные интервалы времени, в частности с интервалом 5 с. Рисунок 3 представляет графический анализ константы скорости по белку в координатах Гуггенгейма. Разницу оптических плотностей вычисляли для каждого интервала времени и рассчитывали натуральный логарифм разницы оптических плотностей.

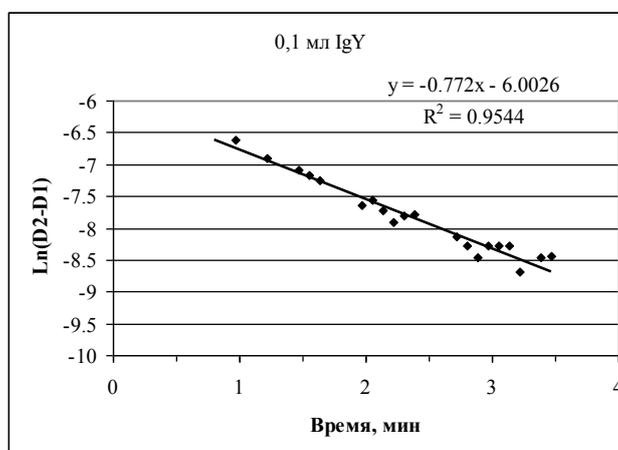


Рисунок 3. – График Гуггенгейма для реакции между яичным иммуноглобулином и глутаровым альдегидом

Графическая зависимость логарифма разницы оптических плотностей от времени реакции согласно Гуггенгейму описывается уравнением скорости реакции:

$$\ln(D_2 - D_1) = -kt + \text{const},$$

где D_2 – оптическая плотность, регистрируемая в момент времени реакции (t , мин);

D_1 – оптическая плотность соответствующая предыдущему интервалу времени регистрации реакции (t , мин);

\ln – натуральный логарифм разницы оптических плотностей;

k – константа скорости реакции (мин^{-1});

t – время реакции (мин);

const – постоянный член уравнения Гуггенгейма.

Путем аппроксимации данной зависимости с помощью линейной регрессии (рисунок 3) находим наклон линии регрессии, равный константе скорости ($k = \text{мин}^{-1}$) реакции взаимодействия глутарового альдегида с иммуноглобулинами. Константа скорости составила $0,77 \text{ мин}^{-1}$.

Поскольку представленная зависимость Гуггенгейма линейна, а реакция необратима, следует вывод, что константа скорости является константой скорости реакции первого порядка. Важным следствием из анализа Гуггенгейма является вывод о независимости периода полупревращения от начальной концентрации исходного вещества для реакций первого порядка. При этом период полупревращения обратно пропорционален константе скорости: $T_{1/2} = \ln 2/k$.

Из величины полученной константы скорости мы рассчитали период полупревращения иммуноглобулинов при конъюгации с глутаровым альдегидом. Величина этого периода составила около 1 мин.

Таким образом, для полноты протекания реакции требуется время реакции не менее 20 мин, что соответствует 20 периодам полупревращения.

На следующем этапе работы были синтезированы конъюгаты антител с антибиотиком доксициклином. Синтез конъюгатов осуществляли при молярном соотношении компонентов реакционной смеси имму-

ноглобулины : доксициклин : глутаровый альдегид, равном 1: 62 : 28571. Реакцию конъюгации проводили в фосфатном буфере (0,1 М, рН 7,2) в течение 24 ч при перемешивании на магнитной мешалке. Конечный продукт очищали от низкомолекулярных компонентов методом диализа с использованием целлюлозной полупроницаемой мембраны с молекулярной массой отсечения 14 кДа. Диализ проводили против фосфатного буфера того же состава в течение 24 ч с 4-кратной сменой раствора. Для оценки состава конъюгата использовали спектрометрический анализ спектров конъюгатов в ультрафиолетовой области при длине волн 200–400 нм, регистрируемых с шагом 5 нм.

Как видно из рисунка 4, регистрируемые спектры первичных компонентов и продукта реакции конъюгации иммуноглобулинов с доксициклином существенно различаются и характеризуются наличием специфических максимумов поглощения в спектрах поглощения. Оптические плотности конъюгатов антитело-антибиотик значительно увеличивались по сравнению с оптическими плотностями в спектре иммуноглобулинов. При реакции конъюгации иммуноглобулинов с глутаровым альдегидом наблюдается гипсохромный эффект: сдвиг спектра в синюю область. Как упоминалось выше, гипсохромный эффект является характерной чертой для конъюгации глутарового альдегида с различными белками. Эта реакция обусловлена наличием в структуре доксициклина свободной аминогруппы, которая взаимодействует с альдегидной группой глутарового альдегида. Согласно сравнительным данным спектров первичных компонентов и конъюгата молярное соотношение доксициклин : иммуноглобулины в конъюгате, рассчитанное из отношения величин оптической плотности при 280 нм, составило 2:1.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение активности синтезированных конъюгатов иммуноглобулинов с доксициклином по отношению к *Escherichia coli* методом ИФА.

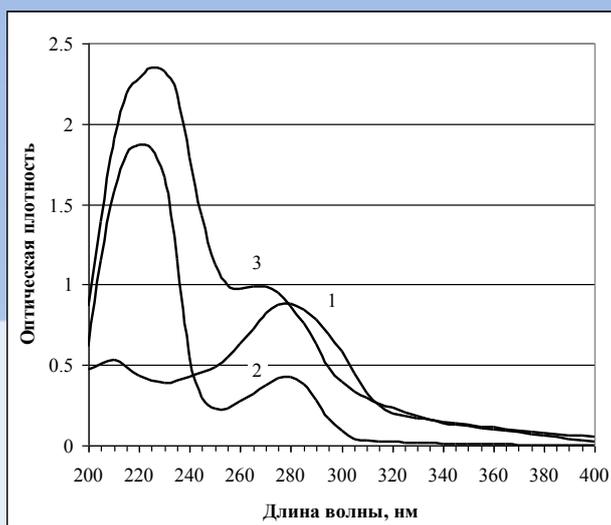


Рисунок 4. – УФ-спектры поглощения доксициклина с глутаровым альдегидом (1), иммуноглобулинов IgY (2), конъюгата иммуноглобулинов IgY с доксициклином (3)

ВЫВОДЫ

1. Глутаровый альдегид является оптимальным реагентом для синтеза конъюгатов доксициклина с яичными иммуноглобулинами кур.
2. Необратимый характер реакции

конъюгации свидетельствует об образовании прочной ковалентной связи между иммуноглобулинами и доксициклином.

3. Молярное соотношение доксициклин : яичные иммуноглобулины в составе конъюгата составило 2:1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гипериммунизация кур яйценоских пород для получения специфических к *Escherichia coli* желточных иммуноглобулинов / И. В. Насонов [и др.] // Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария. – 2021. – № 2. – С. 26–30.
2. Каплин, В. С. IgY-технологии в медицине. Лечение и профилактика неинфекционных заболеваний / В. С. Каплин, О. Н. Каплина // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. – 2018. – № 3. – С. 10–21.
3. Получение трансовариальных иммуноглобулинов при создании новых ветеринарных био-препаратов / Д. С. Борисовец [и др.] // Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария. – 2021. – № 2. – С. 31–39.
4. Cavaco, M. The Use of Antibody-Antibiotic Conjugates to Fight Bacterial Infections / M. Cavaco, M. A. R. B. Castanho, V. Neves // *Front. Microbiol.* – 2022. – 13:835677. – DOI: 10.3389/fmicb.2022.835677.
5. Comparative efficacy of doxycycline and flumequine against experimentally induced colibacillosis in broiler chicks / H. Akbar [et al.] // *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health.* – 2009. – Vol. 1 (2). – P. 17–22.
6. Christensen, H. New strategies to prevent and control avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) / H. Christensen, J. Bachmeier, M. Bisgaard // *Avian Pathology.* – 2020. – DOI:10.1080/03079457.2020.1845300.
7. Cleland, R. L. Guggenheim exponential method for unequal intervals / R. L. Cleland // *Analytical chemistry.* – 1970. – Vol. 42(6). – P. 675–676.
8. Hopwood, D. The reaction between glutaraldehyde and various proteins. An investigation of their kinetics / D. Hopwood // *Histochemical J.* – 1970. – № 2. – P. 137–150.
9. Mariathasan, S. Antibody-Antibiotic Conjugates : A Novel Therapeutic Platform against Bacterial Infections / S. Mariathasan, M.-W. Tan // *Trends in Molecular Medicine.* – 2017. – Vol. 23(2). – P. 135–149.

УДК 619:636.2:612.621

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-1-37-42>

Зайцева В.В., кандидат биологических наук, доцент

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ФОСФОЛИПИДОВ И ГУМИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ В СОСТАВЕ РАЗБАВИТЕЛЯ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМЫ БЫКА И ЧЕЛОВЕКА

Резюме

В ходе проведенной экспериментальной работы было установлено, что концентрация фосфолипидов и водного раствора активированного гумата калия оказывает влияние на жизнеспособность спермиев быка и человека.

Фосфолипиды, включенные в состав разбавителя до 10,0 и 20,0 мг, сохраняют через 5 ч инкубации при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ выживаемость спермиев быка и человека у $34,4\pm 0,86$ – $35,5\pm 0,86$ % и $36,2\pm 0,86$ – $32,4\pm 0,86$ % половых клеток соответственно.

Разбавители, содержащие 0,0025%-ный водный раствор активированного гумата калия и 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов, обеспечивают наиболее высокую выживаемость относительно исходного показателя у спермиев быка и человека – до 72,9–78,8 % и 73,4–76,2 % соответственно.

Ключевые слова: сперма, фосфолипиды, гуминовые препараты, биологические показатели, разбавитель, инкубация.

Summary

In the course of the experimental work, it was found that the concentration of phospholipids and an aqueous solution of activated potassium humic substances affects the viability of bovine and human sperm.

Phospholipids included in the composition of the diluent up to 10.0 and 20.0 mg, after 5 hours of incubation at a temperature of $(37\pm 1)^\circ\text{C}$, provide the survival rate of bull and human sperm at 34.4 ± 0.86 – 35.5 ± 0.86 % and 36.2 ± 0.86 – 32.4 ± 0.86 % germ cells, respectively.

Diluents containing 0.0025 % aqueous solution of activated potassium humate and 10.0 and 20.0 mg of phospholipids provide the highest survival rate relative to the baseline in bovine and human spermatozoa, respectively, up to 72.9–78.8% and 73.4–76.2 %.

Keywords: sperm, phospholipids, humic preparations, biological parameters, diluent, incubation.

Поступила в редакцию 03.02.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Липиды относятся к классу важнейших в биологическом отношении веществ. Огромный интерес к изучению липидов в организме связан с установлением их регуляторной, защитной и энергетической функции.

Фосфолипиды играют роль не только пластических соединений, но и являются функционально активными веществами. Они регулируют многие ферментные реакции (окислительное фосфорилирование), участвуют в транспортировке минеральных веществ и органических соединений через

биологические барьеры, играют определенную роль в возникновении процессов возбуждения и торможения и других физиологических явлений [6, 8, 9].

В состав фосфолипидов входят насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты и их альдегиды, фосфорная кислота, глицерин, инозит, сфингозин, холин, этаноламин и серин [1].

Главные составные части спермиев – белки и липиды. Согласно имеющимся данным лецитин является одним из основных компонентов биологических мембран клеток. Главное отличие спермиев от

других клеток – их способность к активному движению за счет энергии дыхания и гликолиза. Дыхание – основной биохимический процесс, обеспечивающий спермиев необходимой для движения энергией (около 90 % всей энергии) за счет окисления углеводов, липидов (фосфолипиды), простых сахаров и белков.

Фосфолипиды способствуют устранению нарушения клеточной мембраны с восстановлением функций у сперматозоидов (J. Graham, R. Foote, 1987). Также показано, что фосфолипиды требуются сперматозоидам для нормальной подвижности (G. Haidl с соавт., 1993). Нарушение фосфолипидного бислоя мембран спермиев может привести к изменению морфологии и жизнеспособности клеток.

Изучение биохимии липидов имеет практическую значимость, так как они могут быть использованы при разработке новых разбавителей для спермы и методов длительного хранения спермиев.

Развитие метода сохранения спермы животных связано главным образом с поиском более эффективных биологически активных веществ и защитных сред для сохранения гомеостаза и развития адаптивных процессов спермиев вне организма, что реализуется путем применения различных синтетических сред [4, 5, 7].

Так, ряд ученых изучали влияние гуминовых соединений торфа на живые клетки простейших и птицы [2, 3]. Они отмечали, что физиологически активные вещества торфа оказывают положительное мембранотропное действие на лимфоциты периферической крови цыплят, модулируя действие экзогенного интерферона.

Также в предварительных опытах нами было установлено позитивное влияние гуминовых соединений торфа в процессе разбавления спермы быка и человека на подвижность спермиев.

В соответствии с вышеприведенной информацией представляет научно-практический интерес оценка влияния разных концентраций гуминовых соединений и фосфолипидов на биологическую активность спермиев в составе разбавителя.

Цель работы – изучить влияние концентрации фосфолипидов в составе разбавителя, оптимизированного по гуминовым соединениям, на биологические свойства спермиев быка и человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали образцы спермы быка, представленные РПСУП «Витебское племпредприятие» кафедре акушерства, гинекологии и биотехнологии размножения УО ВГАВМ для проведения учебного процесса и научно-исследовательской работы. Также в отдельных опытах для сравнительного анализа использовали образцы спермы человека с целью дальнейшего использования полученных результатов.

В опыте использовали по 3 образца спермы быка и человека, однородных по подвижности (7,3–7,5 баллов, или 71–72 %). Оценку образцов спермы осуществляли по нижеописанным методикам и согласно ГОСТ 32277-2013.

Полученные эякуляты до проведения опытов хранили в течение 1 ч при температуре (18±2) °С. Критерии оценки опытных образцов в момент получения (за 1 ч до проведения опыта) следующие: сперма быка – цвет молочно-белый, консистенция сливообразная, объем эякулята 6,8–8,2 мл, концентрация спермиев 7,2–8,2 млрд/см³; сперма человека – цвет молочный, слегка опалесцирует, консистенция густая и вязкая, объем эякулята 2,5–2,8 мл, концентрация спермиев 0,015–0,018 млрд/см³.

Разбавители для спермы хранили не более 2 ч до момента использования. Температура разбавителей в момент разбавления спермы составила (37±1) °С. Образцы спермы с опытными разбавителями в соотношении 1:9 разливали во флаконы, подогревали смесь на водяной бане до температуры (37±1) °С и помещали в термостат на хранение при данном температурном параметре.

Подвижность спермиев определяли после получения спермы, а также через 1 ч после ее получения и хранения при темпе-

ратуре (18±2) °С до разведения разбавителями. Далее подвижность спермиев определяли через 5, 60, 120, 180, 240 и 300 мин после разведения образцов спермы быка и человека опытными разбавителями при температуре (37±1) °С.

Опытную работу проводили в лаборатории кафедры акушерства, гинекологии и биотехнологии размножения УО ВГАВМ и ООО «Мир Здоровья».

В работе использовали материалы и реактивы: глюкоза; натрий лимоннокислый трехзамещенный; вода очищенная; 5%-ный раствор фосфолипидов ненасыщенных; 5%-ный водный раствор активированного гумата натрия (АГН) из высокоминерализованного низинного торфа (опытный образец); 5%-ный водный раствор активированного гумата калия (АГК) из высокоминерализованного обогащенного низинного торфа (опытный образец); 1%-ный водный раствор активированного гумата аммония (АГА),

приготовленный из препарата «Оксидат торфа»; 1%-ный препарат БСТ (биологический стимулятор торфа); аммиак водный 25%-ный; натрия гидроксид; эфир петролейный марки 40–70; необходимое лабораторное оборудование.

В образцах спермы и их смесях с разбавителями проводили исследования по определению концентрации спермиев в счетной камере; определению подвижности спермиев; определению количества живых/мертвых спермиев, дифференцированных окрашиванием; определению выживаемости спермиев при температуре (37±1) °С в течение 0–5 ч.

Для исследования одного состава разбавителя использовали 0,35 см³ эякулята каждого образца спермы, разведенного 1:9.

В исследованиях использовали приготовленные нами опытные составы разбавителя спермы (таблица 1).

Таблица 1. – Опытные составы разбавителя спермы

Компоненты	Опытные составы														
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11	№ 12	№ 13	№ 14	№ 15
Глюкоза, %	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Натрий лимоннокислый трехзамещенный, %	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9
Фосфолипиды, мг	5,0	10,0	20,0	5,0	10,0	20,0	5,0	10,0	20,0	5,0	10,0	20,0	5,0	10,0	20,0
АГН, %	-	-	-	0,0025	0,0025	0,0025	-	-	-	-	-	-	-	-	-
АГК, %	-	-	-	-	-	-	0,0025	0,0025	0,0025	-	-	-	-	-	-
АГА, %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0025	0,0025	0,0025	-	-	-
БСТ, %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0025	0,0025	0,0025
Вода очищенная, %	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе проведенной экспериментальной работы было установлено, что кон-

центрация фосфолипидов оказывает влияние на жизнеспособность спермиев быка и человека (таблица 2).

Таблица 2. – Влияние концентрации фосфолипидов в составе разбавителя, оптимизированного по АГН, на биологические показатели образцов спермы быка

Биологические показатели спермиев быка	Состав разбавителя					
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
Подвижность спермиев (%) до разведения	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93
после разведения: через 5 мин	69,8±1,93	68,9±1,93	70,8±1,93	71,2±1,93	71,0±1,93	70,6±1,93
через 60 мин	59,4±1,29	62,5±1,5	61,5±1,5	63,2±1,5	62,8±1,5	63,4±1,7
через 120 мин	47,8±1,29	56,6±1,5	57,0±1,5	54,0±1,5	57,4±1,5	56,2±1,5
через 180 мин	36,3±0,86	48,7±1,1	49,4±1,1	46,0±1,1	50,2±1,1	51,6±1,1
через 240 мин	27,7±0,6	41,4±0,86	40,3±0,86	37,2±0,86	46,4±1,1	47,7±1,1
через 300 мин	21,4±0,6	35,5±0,86	34,4±0,86	31,4±0,86	42,2±0,86	40,4±0,86

Из таблицы 2 видно, что наиболее высокая выживаемость спермиев быка отмечается в разбавителях № 2 и № 3, содержащих 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов, составляет 35,5±0,86 и 34,4±0,86 % соответственно. Однако разбавители, содержащие 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов и 0,0025 % АГН, обеспечивали выживаемость спермиев после их инкубации в течение 5 ч при температуре (37±1) °С у 42,2±0,86 и 40,4±0,86 % соответственно, а относитель-

но исходного показателя – до 56,4–58,9 %.

Во втором опыте изучено влияние разных концентраций фосфолипидов, АГК и АГА в составе разбавителя на биологические показатели спермиев быка. Из таблицы 3 видно, что разбавители, содержащие в составе 0,0025 % АГК и 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов, сохраняли живучесть у 52,2±1,1 и 56,4±1,1 % образцов соответственно, а относительно исходного показателя – до 72,0–78,8 %.

Таблица 3. – Влияние концентрации фосфолипидов в составе разбавителя, оптимизированного по АГК и АГА, на биологические показатели образцов спермы быка

Биологические показатели спермиев быка	Состав разбавителя					
	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11	№ 12
Подвижность спермиев (%) до разведения	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93
после разведения: через 5 мин	69,2±1,93	69,8±1,93	69,6±1,93	67,8±1,5	69,2±1,93	69,0±1,93
через 60 мин	58,6±1,5	68,5±1,5	67,6±1,5	55,2±1,5	60,4±1,5	58,4±1,5
через 120 мин	52,2±1,5	66,6±1,29	64,2±1,5	43,0±0,86	46,4±1,29	48,0±1,1
через 180 мин	46,2±1,1	63,6±1,1	61,6±1,29	34,4±0,86	36,6±0,86	36,4±0,86
через 240 мин	40,0±0,86	60,3±1,1	58,4±1,29	26,6±0,6	27,4±0,6	26,4±0,6
через 300 мин	33,5±0,86	56,4±1,1	52,2±1,1	10,6±0,6	22,2±0,6	20,6±0,6

Также видно, что разбавители № 11 и № 12, содержащие 0,0025 % АГА и 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов, через 5 ч инкубации при температуре (37±1) °С сохраняли жизнеспособность у 22,2±0,6 и 20,6±0,6 % спермиев быка соответственно.

В третьем опыте изучено влияние разных концентраций фосфолипидов и пре-

парата БСТ на биологические показатели спермиев быка.

Из таблицы 4 видно, что препарат БСТ в концентрации 0,0025 % в присутствии 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов в составе разбавителя через 5 ч инкубации сохраняет жизнеспособность у 32,4±0,86 и 36,2±0,86 % образцов соответственно.

Таблица 4. – Влияние концентрации фосфолипидов в составе разбавителя, оптимизированного по препарату БСТ, на биологические показатели образцов спермы быка

Биологические показатели спермиев быка	Состав разбавителя					
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 13	№ 14	№ 15
Подвижность спермиев (%): до разведения	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93	71,6±1,93
после разведения: через 5 мин	69,8±1,93	68,9±1,93	70,8±1,93	71,2±1,93	70,6±1,93	71,0±1,93
через 60 мин	59,4±1,29	62,5±1,5	61,5±1,5	57,4±1,93	62,8±1,5	62,8±1,5
через 120 мин	47,8±1,29	56,6±1,5	57,0±1,5	48,2±1,29	55,4±1,5	58,0±1,5
через 180 мин	36,3±0,86	48,7±1,1	49,4±1,1	35,8±0,86	48,2±1,1	50,6±1,1
через 240 мин	27,7±0,6	41,4±0,86	40,4±0,86	26,6±0,6	42,3±0,86	41,6±0,86
через 300 мин	21,4±0,6	35,5±0,86	34,4±0,86	20,6±0,6	36,2±0,86	32,4±0,86

С учетом полученных результатов сперму человека инкубировали в разбавителях № 1–3 с фосфолипидом и в разбави-

телях № 7–9 с 0,0025 % АГК и 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов (таблица 5).

Таблица 5. – Влияние концентрации фосфолипидов в составе разбавителя, оптимизированного по АГК, на биологические показатели образцов спермы человека

Биологические показатели спермы человека	Состав разбавителя					
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 7	№ 8	№ 9
Подвижность спермиев (%): до разведения	70,8±1,93	70,8±1,93	70,8±1,93	70,8±1,93	70,8±1,93	70,8±1,93
после разведения: через 5 мин	68,8±1,5	69,4±1,93	70,0±1,93	70,2±1,93	70,6±1,93	68,8±1,93
через 60 мин	48,8±1,5	60,2±1,5	63,0±1,5	63,5±1,93	68,2±1,5	61,2±1,5
через 120 мин	46,4±1,29	56,4±1,5	54,2±1,5	54,4±1,5	66,0±1,29	65,0±1,5
через 180 мин	38,4±0,86	48,4±1,1	45,4±1,1	48,8±1,1	63,2±1,1	62,2±1,29
через 240 мин	28,2±0,6	42,2±0,86	38,8±0,86	40,4±0,86	58,5±1,1	58,0±1,29
через 300 мин	23,3±0,6	36,2±0,86	32,4±0,86	31,8±0,86	54,0±1,1	52,0±1,1

Из данных таблицы 5 следует, что разбавители, содержащие 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов, сохраняли живучесть у $36,2 \pm 0,86$ и $32,4 \pm 0,86$ % спермиев человека соответственно.

Включение в разбавитель № 8 и № 9 АГК в концентрации 0,0025 % и 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов способствовало существенному повышению жизнеспособности у $54,0 \pm 1,1$ и $52,0 \pm 1,1$ % спермиев человека соответственно, а относительно исходного показателя – до 73,4–76,2 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фосфолипиды, включенные в состав разбавителя до 10,0 и 20,0 мг, сохраняют через 5 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С выживаемость у $34,4 \pm 0,86$ и $35,5 \pm 0,86$ % спермиев быка и $36,2 \pm 0,86$ и $32,4 \pm 0,86$ % спермиев человека соответственно. Разбавители, содержащие 0,0025 % АГК и 10,0 и 20,0 мг фосфолипидов, обеспечивают наиболее высокую выживаемость относительно исходного показателя – до 72,9–78,8 % у спермиев быка и 73,4–76,2 % – у спермиев человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Корявкин. – М. : Медицина, 1998. – С. 188–203.
2. Зайцев, В. В. Влияние препаратов торфа на фагоцитоз *in vitro* / В. В. Зайцев, В. М. Козин // Вестник фармации. – Витебск, 1999. – С. 34–36.
3. Козин, В. М. Механизм фармакологического действия препарата биологически активного «Оксидат торфа» / В. М. Козин, В. В. Зайцев // Вестник фармации. – Витебск, 1999. – С. 37–40.
4. Коноплева, А. П. Разбавители спермы и их влияние на эффективность искусственного осеменения / А. П. Коноплева, А. А. Андреева, Т. Н. Трохолис // Тр. ВНИТИП. – Сергиев Посад, 2010. – Т. 85. – С. 25–29.
5. Осташко, Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей / Ф. И. Осташко. – 2-е изд., доп. и перераб. – Киев : Урожай, 1978. – 255 с.
6. Dörr, T. Editorial: bacterial cell wall structure and dynamics / T. Dörr, P. J. Moynihan, C. Mayer // Front. Microbiol. – 2019. – P. 2051–2052.
7. Vishwanath, R. Storage of bovine semen in liquid and frozen state / R. Vishwanath, P. Shannon // Anim. Reprod. Sci. – 2000. – V. 62. – P. 25–53.
8. Slavetinsky, C. Bacterial aminoacyl phospholipids – biosynthesis and role in basic cellular processes and pathogenicity / C. Slavetinsky, S. Kuhn, A. Peschel // Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids. – 2017. – P. 1310–1318.
9. Structural basis for maintenance of bacterial outer membrane lipid asymmetry / J. Abellón-Ruiz [et al] // Nat. Microbiol. – 2017. – P. 1616–1623.

ПРЕПАРАТ ВЕТЕРИНАРНЫЙ

ВИРОКОКЦИД

ПРИМЕНЯЮТ С ВОДОЙ ИЛИ КОРМОМ

ТЕЛЯТАМ, ЯГНЯТАМ, КОЗЛЯТАМ

► для профилактики и лечения ассоциативных болезней, вызванных эймериями, стронгилятами желудочно-кишечного тракта, трихоцефалами, стронгилоидами

► для стимуляции иммунных процессов при вторичных иммунодефицитах молодняка, вызванных ассоциативными паразитогами



УДК 576.8

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-1-43-48>

Сарока А.М., ассистент

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

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЯИЦ *HETERAKIS GALLINARUM* (GMELIN, 1790)**Резюме**

В статье представлены результаты исследований по изучению особенностей эмбрионального и морфометрического развития яиц, выделенных из гонад самок нематод *Heterakis gallinarum*, паразитирующих у индеек и кур, при различной степени интенсивности инвазии моно- и смешанных форм гельминтозов. Установлено, что яйца *H. gallinarum* при температуре 30 °С становились инвазионными в течение 7 дней, их выживаемость в лабораторных условиях составила 80,67±2,08 % (индейки) и 84±3 % (куры). На морфометрические параметры яиц, выделяемых половозрелыми самками *H. gallinarum*, объективно влияют такие факторы, как стадия биологического цикла, интенсивность инвазии, вид хозяина.

Ключевые слова: индейки, куры, яйца, нематоды, эмбриогенез, инвазия, *Heterakis*, *Ascaridia*.

Summary

The article presents the results of the research on the peculiarities of embryo and morphometric development of the eggs isolated from the gonads of female nematodes *Heterakis gallinarum* that parasitize turkeys and hens at different intensities of invasion in case of mono- and mixed forms of helminth infections. It was established that the eggs of *H. gallinarum* became invasive at 30 °C for 7 days, their survival rate in the laboratory conditions was: 80,67±2,08 % (turkeys), 84±3 % (chickens). The morphometric parameters of eggs excreted by mature *H. gallinarum* females are objectively influenced by such factors as the stage of biological cycle, the intensity of invasion, the type of host.

Keywords: turkeys, chickens, eggs, nematodes, embryogenesis, invasion, *Heterakis*, *Ascaridia*.

Поступила в редакцию 03.02.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Птицеводство в большинстве стран мира занимает ведущую позицию среди других отраслей сельскохозяйственного производства. В настоящее время наблюдается рост промышленного птицеводства в связи с необходимостью обеспечения населения белками животного происхождения, продуктами питания диетического назначения. Интенсивное развитие промышленного птицеводства стало возможным благодаря повышению роли науки в решении проблем разведения, кормления, содержания птицы, усовершенствованию диагностических лечебных и профилактических мероприятий [5].

Однако одной из причин, которые в определенной степени сдерживают развитие птицеводства, являются инвазионные болезни, в том числе гельминтозы. Анализ

литературы показывает, что при выгульном содержании птицы практически все поголовье оказывается зараженным различными видами гельминтов, преимущественно возбудителями желудочно-кишечных нематодозов, к которым относится и гетеракидоз. Нематоды рода *Heterakis* являются наиболее распространенными у различных видов птиц, оказывают выраженное негативное влияние не только на состояние отдельных органов (слепых кишок, печени), но и на организм в целом, а при высокой интенсивности инвазии приводят к летальному исходу.

Представители этого рода обнаружены у домашней (куры, индейки, цесарки, перепела, гуси и утки) и дикой птицы (тетерева, куропатки, фазаны, рябчики, глухари, соловьи, дрофы, стрепеты, кряквы, пеганки и т.д.) в различных странах.

По данным Н.В. Богача, нематоды рода *Heterakis* в Украине были обнаружены у кур, индеек и гусей с экстенсивностью инвазии 2,9–100,0 % [1, 3, 10].

Численность гельминтов *H. gallinarum* в популяциях птиц зависит от особенностей биологии паразитов и их максимальной адаптации к широкому кругу хозяев. Жизненный цикл этих нематод прямой. Нематоды рода *Heterakis*, как и другие паразитические организмы, постоянно эволюционируют, что связано с морфологическими и биологическими изменениями. Также на степень заражения птицы и размеры продуцируемых гельминтами яиц могут оказывать влияние экологические факторы, но не исключены и их межвидовые взаимоотношения.

В литературе имеются противоречивые сведения о размерах яиц *H. gallinarum*. Так, исследователи отмечают, что морфометрические параметры яиц находятся в пределах 50–70×30–39 мкм (А.А. Черепанов, 2001), 66–80×39–48 мкм (Ф.М. Орлов, 1971), 63–71×38–48 мкм (М.Н. Дубинина, 1971). Иностранные исследователи утверждают, что размеры яиц гетеракисов – 65–75×37–47 мкм (Б.У. Кэллек, 2003), 65–80×35–46 мкм (М. А. Taylor, 2015) [2, 3, 4, 6, 9].

Знание особенностей морфологии и сроков развития яиц гетеракисов является важным аспектом изучения данных гельминтов, так как это позволит повысить эффективность проведения мероприятий по профилактике и борьбе с этим заболеванием.

Цель работы – изучить особенности эмбрионального и морфометрического развития яиц, выделенных из гонад самок нематод *Heterakis*, паразитирующих у индеек и кур, при различной степени интенсивности инвазии моно- и смешанных форм гельминтозов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в 2019–2021 гг. в лаборатории кафедры паразитологии и инвазионных болезней УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медици-

ны». Материал для видовой идентификации, изучения численности и паразитологического анализа нематод рода *Heterakis* был собран при гельминтологическом исследовании в Витебской области Республики Беларусь кишечника домашних индеек и кур, содержащихся на выгульных площадках и внутри помещений. Эмбриогенез *H. gallinarum* в культуре изучали на яйцах, собранных из гонад самок нематод. Яйца культивировали до инвазионной стадии (появления подвижной личинки) в изотоническом растворе натрия хлорида в чашках Петри в течение 7 дней в термостате при 30 °С. Изучали эмбриональную стадию развития и морфологические характеристики. Определяли форму, структуру, длину, ширину яиц, толщину оболочки под микроскопом «OLIMPUS BX-41» при увеличении объектива ×10, ×40, ×100. Микрофотографии были сделаны с помощью цифровой камеры «XC30 OLIMPUS».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты наших исследований показывают, что зараженность индеек нематодами пищеварительного тракта в республике довольно высокая. Наиболее распространенными гельминтами индеек по результатам копроскопии являются гетеракисы – 76,8 % (по результатам вскрытия – 91,8%). Нематоды сем. *Capillariidae* у установлены у 68,7 % обследованных индеек, рода *Ascaridia sp.* – у 23,7 % [8].

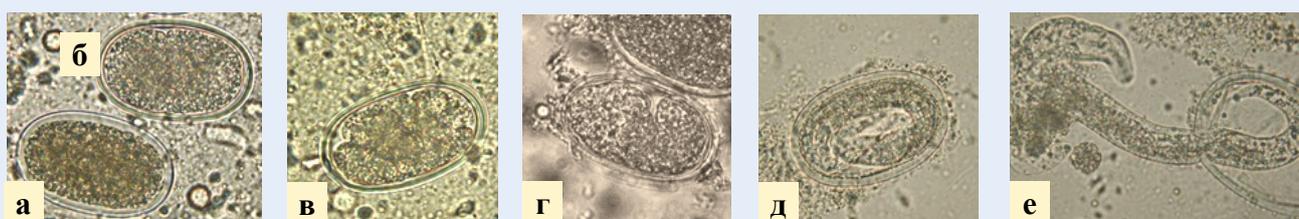
Установлено, что яйца *H. gallinarum* в лабораторных условиях при постоянной температуре 30 °С достигали инвазионной стадии за 6–7 дней и проходили 5 стадий эмбриогенеза: зиготы, образования бластомеров, зародыша, личинки, подвижной личинки (инвазионного яйца) (рисунок 1).

В начале опыта все яйца гетеракисов, полученные из гонад самок, были на стадии зиготы – яйцо с однородным содержанием (рисунок 1а). Через 14 часов после помещения в термостат (температура 30 °С) эмбриогенез характеризовался переходом первой стадии во вторую – активным образованием и дроблением бласто-

меров в яйце (рисунок 1б, в). В результате дальнейшего дробления количество бластомеров значительно увеличивается одновременно с уменьшением их размеров и, наконец, на 2-е сутки границы между ними становятся трудноразличимыми. Эту стадию развития легко принять за яйцо, еще не приступившее к дроблению. На 3-и сутки зародыш слегка подвижный и принимает изогнутую цилиндрическую форму с нечеткими границами (рисунок 1г). На 4-5-е сутки формируется личинка, сложенная вдвое, с признаками самостоятельного движения, на 6-7-е – личинка, свернутая в

два оборота, подвижная, четко структурированная, с зернистым внутренним содержимым (рисунок 1д). Яйцо становится инвазионным. При сохранении температуры 30 °С и влажности не менее 90 % происходит освобождение личинок от скорлупы в течение суток (рисунок 1е). При выходе из яйца личинка высовывает передний конец через отверстие оболочки и рывками выдвигается наружу, опираясь хвостовым концом в стенку скорлупы.

Морфометрическими исследованиями установлено, что размеры яиц в процессе их эмбриогенеза изменялись (таблица 1).



а – зигота; б – стадия двух бластомеров; в – дробление бластомеров; г – зародыш; д – личинка; е – личинка на выходе из яйца

Рисунок 1. – Стадии развития яиц *H. gallinarum*, микрофото, ×400

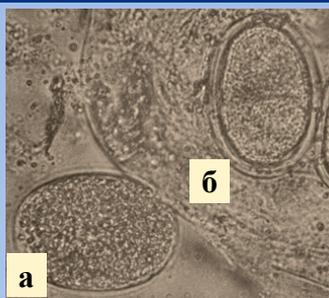
Таблица 1. – Морфометрические параметры развивающихся яиц *Heterakis gallinarum* (n=20)

Характеристика яиц	Индейки			Куры	
	яйца <i>H. gallinarum</i>			яйца <i>H. gallinarum</i>	
	в стадии зиготы	в стадии личинки (инваз.)	неоплодотворенные	в стадии зиготы	в стадии личинки (инваз.)
Длина, мкм	74,44±2,24	71,51±2,13 *	67,27±3,76	68,73±1,77	68,56±1,13
Ширина, мкм	46,03±2,25	49,78±3,94 *	45,83±2,28	40,43±1,42	40,49±0,71 **
Толщина оболочки, мкм	3,22±0,65	2,39±0,42 **	1,57±0,39	2,89±0,44	2,14±0,36 ***

Примечание – *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Визуально яйца *H. gallinarum* от кур и индеек были очень похожи, однако их размеры статистически различались. Все изученные параметры яиц нематод *H. gallinarum* от кур были ниже по сравнению с таковыми от индеек. Яйца из гонад самок *H. gallinarum* от кур были короче (на 4,13–7,67 %) и уже (на 12,17–18,66 %), а их скорлупа тоньше (на 10,25–10,46 %). Нео-

плодотворенные яйца также имели свои особенности: длина 67,27±3,76 мкм, ширина 45,83±2,28 мкм, толщина скорлупы 1,57±0,39 мкм. На рисунке 2 хорошо заметна разница в толщине скорлупы неоплодотворенного яйца *H. gallinarum* и яйца на стадии 2 бластомеров: разница составляет 51,24 %.



а – неоплодотворенное;
б – на стадии двух бластомеров
Рисунок 2. – Яйца *H. gallinarum*, микрофото, ×400

Эмбриогенез яиц *H. gallinarum* сопровождался большими изменениями. Так, яйца гетеракисов от индеек стали короче (на 3,94 %, $P < 0,05$) и шире (на 7,53 %, $P < 0,05$), а скорлупа – тоньше (на 25,78 %, $P < 0,01$). У кур изменения яиц гетеракисов, выращенных от стадии зиготы до инвазионной личинки, незначительные: уменьшение длины на 0,25 %, увеличение ширины на 0,15 % ($P < 0,01$), а вот скорлупа яиц потеряла 25,95 % ($P < 0,001$) своей толщины. Такие изменения связаны, возможно, с

особенностями жизнеспособности гельминтов и их способностью адаптироваться к различным хозяевам (таблица 1).

По данным [9] скорлупа яиц гетеракисов состоит из 6 оболочек и вначале дробления более устойчива к действию растворов химических веществ, чем скорлупа инвазионных яиц. Для развития и поддержания жизни зародышу требуется кислород и вода, поступление которых внутрь яйца возрастает по мере организации зародыша, соответственно, волокнистая оболочка становится менее плотной, увеличивается ее пористость. Отмечалось также слабое развитие скорлупы неоплодотворенных яиц по сравнению со скорлупой оплодотворенных [7].

Выживаемость яиц *H. gallinarum* от индеек во время эмбриогенеза составила $80,67 \pm 2,08$ %, от кур – 84 ± 3 % (таблицы 2, 3). Причем часть яиц останавливалась в развитии и в последующем погибала, что проявлялось разрушением оболочки, деформацией и вакуолизацией зародышей: от индеек – $17,67 \pm 3,05$ %, от кур – 16 ± 3 %.

Таблица 2. – Показатели эмбрионального развития яиц, выделенных из гонад самок *H. gallinarum* от индеек, при культивировании, $M \pm m$ ($n = 100$)

День культивирования	Стадии развития, %				Остановка развития
	зигота	бластомеры	зародыш	личинка	
1	100	-	-	-	-
2	$27,33 \pm 4,51$	$72,67 \pm 4,51$	-	-	-
3	$17,67 \pm 3,05$	30 ± 113	$52,33 \pm 10,97$	-	-
4	-	$21,67 \pm 4,04$	$56 \pm 6,08$	$4,67 \pm 3,51$	$17,67 \pm 3,05$
5	-	$1,33 \pm 1,15$	$32 \pm 8,19$	49 ± 5	$17,67 \pm 3,05$
6	-	-	$1,67 \pm 2,89$	$80,67 \pm 2,08$	$17,67 \pm 3,05$
7	-	-	-	$82,33 \pm 3,06$	$17,67 \pm 3,05$

Таблица 3. – Показатели эмбрионального развития яиц, выделенных из гонад самок *H. gallinarum* от кур, при культивировании, $M \pm m$ ($n = 100$)

День культивирования	Стадии развития, %				Остановка развития
	зигота	бластомеры	зародыш	личинка	
1	100	-	-	-	-
2	$25,67 \pm 8,33$	$74,33 \pm 8,33$	-	-	-
3	16 ± 3	$33,33 \pm 9,29$	$57,33 \pm 14,5$	-	-
4	-	$22,67 \pm 9,07$	$60 \pm 8,71$	$1,33 \pm 0,58$	16 ± 3
5	-	1	$36,67 \pm 8,5$	$46,33 \pm 5,51$	16 ± 3
6	-	-	-	84 ± 3	16 ± 3
7	-	-	-	84 ± 3	16 ± 3

Таблица 4. – Морфометрические показатели яиц *H. gallinarum* при моно- и полиинвазии у индеек

Разновидность гельминтов	ЭЭ, %	Размер яиц с разной интенсивностью инвазии, мкм					
		низкая		средняя		высокая	
		длина	ширина	длина	ширина	длина	ширина
Моноинвазия	7,9	75,23±1,45	46,35±1,95	73,67±1,19	43,53±3,08	72,19±1,37***	41,59±2,05***
H+C	15,04	74,78±1,2	44,41±3,05	74,53±1,83	43,64±2,4	74,68±3,28	44,3±2,5
H+A	9,76	73,00±1,74	43,23±1,46	71,04±0,95**	40,07±2,06***	70,25±1,28***	39,79±2,52***
H+A+C	7,7	75,23±1,45	45,65±2,98	74,71±0,99**	42,88±1,25*	72,73±1,34*	43,68±2,77

Примечание: H – *Heterakis*, A – *Ascaridia*, C – *Capillaria*; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

В результате проведенных морфометрических исследований установили, что размеры яиц гетеракисов при моноинвазии составляют 75,23×46,35 мкм при низкой интенсивности инвазии (ИИ) и 72,19×41,59 мкм – при высокой. С увеличением интенсивности инвазии достоверно уменьшается и размер яиц: длина – в 1,04 раза, ширина – в 1,11 раза (P<0,001).

При смешанной инвазии (гетеракисы+капиллярии) морфометрические показатели яиц гетеракисов отличались незначительно при одинаковой интенсивности гетеракидозной инвазии. При смешанной гетеракисо-аскаридозной инвазии регистрировали достоверное уменьшение длины и ширины яиц гетеракисов в 1,04 и 1,09 раза соответственно (P<0,001). Уменьшение размеров яиц гетеракисов наблюдали и при смешанной инвазии (*Heterakis*+*Ascaridia*+*Capillaria*): длины в 1,03, ширины в 1,05 раза при одинаковой интенсивности гетеракидозной инвазии. Это свидетельствует о влиянии *Ascaridi adissimilis* на *H. gallinarum*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Яйца *H. gallinarum*, выделенные из гонад самок гельминтов, при температуре 30 °С становятся инвазионными в течение 7 дней, их выживаемость в лаборатор-

ных условиях составила 80,67±2,08 % (от индеек) и 84±3 % (от кур).

2. Эмбриональное развитие яиц *H. gallinarum* проходит в 5 стадий: зиготы, образования бластомеров, зародыша, личинки и подвижной личинки.

3. На морфометрические параметры яиц, выделяемых половозрелыми самками *H. gallinarum*, объективно влияют такие факторы, как стадия биологического цикла, интенсивность инвазии, вид хозяина.

Все изученные параметры яиц нематод *H. gallinarum* от кур были ниже по сравнению с таковыми от индеек.

В процессе эмбриогенеза яйца гетеракисов от индеек становятся на 3,94 % короче и на 7,53 % шире, а скорлупа – на 25,78 % тоньше.

Высокая интенсивность инвазии способствует выделению в окружающую среду половозрелыми самками *H. gallinarum* яиц меньших размеров. Яйца становятся короче на 4,04 % и уже на 10,27 % по сравнению с таковыми при низкой интенсивности инвазии.

Отмечено также, что смешанная гетеракисо-капилляриозная инвазия не оказывает влияния на размеры яиц *H. gallinarum*, а наличие в организме птицы *Ascaridia dissimilis* приводит к достоверному уменьшению размеров яиц гетеракисов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богач, Н. В. Кишечные инвазии индюков : автореф. дис. ... д-ра ветеринар. наук : 16.00.11 / Н. В. Богач; НИЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины». – Харьков, 2008. – 42 с.
2. Болезни птиц / Ф. М. Орлов [и др.]. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – М. : Колос, 1971. – 462 с.
3. Гельминты домашних куриных птиц и вызываемые ими заболевания : Нематоды и акантоцефалы домашних куриных птиц и заболевания, вызываемые нематодами / А. Н. Черткова, А. М. Петров. – М., 1961. – Т. 2. – 340 с.
4. Дифференциальная диагностика гельминтозов по морфологической структуре яиц и личинок возбудителей: атлас / А. А. Черепанов [и др.]. – М. : Колос, 2001. – 76 с.
5. Дубинина, М. Н. Паразитологическое исследование птиц / М. Н. Дубинина. – Л. : Наука, Ленингр. отд., 1971. – 139 с.
6. Патоморфологические изменения у индеек под влиянием паразитоценоза гетеракисов и гистомонад / А. И. Жуков [и др.] // Ученые записки УО ВГАВМ. – 2021. – Т. 57. – № 1. – С. 28–34.
7. Кудрявец, Н. И. Птицеводство. Курс лекций : учеб.-метод. пособие / Н. И. Кудрявец, Е. Э. Епимахова. – Горки : БГСХА, 2020. – 143 с.
8. Кэлнек, Б. У. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц / Б. У. Кэлнек ; пер. с англ. И. Григорьева, С. Дорош, И. Хрущева, И. Суровцев, Ю. Суровцев. – М. : АКВАРИУМ БУК, 2003. – 1232 с.
9. Симонов, А. П. Разработка методов дезинвазии птичников при аскаридиозе и гетеракидозе кур : автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук / А. П. Симонов. – Боровск-М., 1964. – 24 с.
10. Ятусевич, А. И. Гельминты и гельминтозы индеек в северо-восточном регионе Республики Беларусь / А. И. Ятусевич, А. М. Сарока // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2020. – № 2 (37). – С. 48–52.
11. Ятусевич, А. И. Эндопаразитозы птиц в зоопарках Республики Беларусь / А. И. Ятусевич, В. М. Мироненко, И. Ю. Воробьева // Ученые записки УО ВГАВМ. – 2011. – Т. 47. – № 2-1. – С. 234–236.
12. Taylor, M. A. (Mike A.) *Veterinary parasitology* / M. A. Taylor, R. L. Coop, R. L. Wall. – 4 th edition. – 2015. – 1032 p.

ТАЛПАН

ПРЕПАРАТ ВЕТЕРИНАРНЫЙ

оказывает акарицидное контактное действие против взрослых форм клещей *Varroa destructor*, паразитирующих на пчелах

лечение пчел при варроатозе весной и в летне-осенний период после откачки товарного меда при температуре воздуха от плюс 10 °С до плюс 25 °С

содержит муравьиную и щавелевую кислоту

WWW.BIEVM.BY

УДК 619:616-003.93

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-1-49-55>

Костюк Н.И., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Николаевич Л.Н., кандидат биологических наук, доцент¹
Барсукова М.В., младший научный сотрудник¹
Руколь В.М., доктор ветеринарных наук, профессор²
Слепцов Ю.В., ассистент кафедры общей и частной хирургии²
Борисик Р.Н., ассистент кафедры клинической диагностики²
Андреева Е.Г., студентка 5 курса²

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

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

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ ЖИВОТНЫХ

Резюме

В статье описаны методы выделения фибробластов из кожно-мышечной ткани эмбриона коровы с целью практического применения в ветеринарной медицине в рамках применения новых медицинских технологий. Изучена морфологическая характеристика и функциональная активность, оценена жизнеспособность кожно-мышечных фибробластов.

Ключевые слова: эмбрион, кожно-мышечная ткань, фибробласты, морфология, жизнеспособность, эффективность клонирования, пролиферация.

Summary

The article describes the methods of isolation of fibroblasts from the musculoskeletal tissue of a cow embryo for practical use in veterinary medicine as part of the application of new medical technologies. The morphological characteristics and functional activity were studied the viability of musculocutaneous fibroblasts was assessed.

Keywords: embryo, musculoskeletal tissue, fibroblasts, morphology, viability, cloning efficiency, proliferation.

Поступила в редакцию 03.02.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Клеточная терапия является новым подходом к стимулированию регенерации кожи при заживлении ран, которая включает восстановление структуры и функций поврежденных тканей, путем трансплантации клеток, выращенных в условиях *in vitro*. Успехи клеточной терапии показали возможность лечения ряда ранее неизлечимых заболеваний с помощью клеточной технологий [2, 6, 8].

Основным достижением современной биологии, иммунологии и медицины является создание оптимальных условий культивирования клеток различного происхождения в условиях *in vitro*, открытием стволовых и прогениторных клеток, а также перспектива их применения в регенера-

тивной медицине. [3, 7, 9]. Существуют многочисленные способы выделения популяций фибробластов из различных тканей организма, которые применяются в основном в научных исследованиях [4, 7].

После того, как было установлено, что дермальные фибробласты в культуре сохраняют диплоидный кариотип, имеют ограниченную продолжительность жизни, низкую экспрессию антигенов гистосовместимости и не проявляют онкогенных и туморогенных свойств, их широко начали использовать в терапевтических целях. Показано, что фибробласты при нанесении на поврежденные участки кожи оказывают стимулирующее воздействие на заживление и эпителизацию ран [3, 6]. Многими авторами предлагаются различные спосо-

бы регенерации тканей человека и животных с использованием фибробластов или фибробластоподобных клеток, выделенных из различных источников организма. Однако при разработке биотехнологических способов восстановления дефектных тканей не существует оптимального метода выделения и размножения клеток и адекватного носителя с целью их доставки в область повреждения и адаптации в дефектной области [4, 5].

Цель исследования – оптимизация условий культивирования кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы для применения в ветеринарной медицине.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена в отделе культур клеток и питательных сред РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Материалом для выделения фибробластов служила кожно-мышечная ткань эмбриона коровы. В стерильных условиях из эмбриона коровы извлекали кожно-мышечную ткань и помещали в стерильные чашки Петри, измельчали на кусочки размером около 3 мм³, которые двукратно отмывали стерильным раствором Хенкса с антибиотиками. Подготовленные образцы переносили в стерильную колбу с 2,5%-ным раствором трипсина (Gibco, Великобритания) в соотношении 1:3. Помещали в шейкер-инкубатор (Environmental Shaker-Incubator ES-20 (BioSan, Латвия) и перемешивали на скорости 100 об/мин при температуре (37±1) °С в течение 30–40 минут. После инкубации супернатант переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 15–20 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, а конечный осадок ресуспендировали в небольшом количестве питательной среды 199, содержащей 30 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Жизнеспособность клеток оценивали тестом, основанным на нарушении мембранной целостности, измеряемой по проникновению красителя трипанового синего. Окрашенные и неокрашенные клетки подсчитывали в ка-

мере Горяева по общепринятой методике [1]. Суспензию клеток рассеивали в культуральные флаконы с посевной концентрацией 600 тыс. клеток/мл ростовой среды 199. Клетки культивировали в термостате (SHELLAB, США) при температуре (37±1) °С. Замену ростовой питательной среды осуществляли спустя 2–4 суток в зависимости от изменения pH среды. Фибробласты культивировали до монослоя с конfluenceностью 95–100 % в течение 7–9 суток. Проводили ежедневный контроль под инвертированным микроскопом при увеличении ×100 (Nikon TS 100, Япония).

Суспензию клеток исследовали на микробиологическую стерильность методом посевов на селективные питательные среды (тиогликолевая среда, среда Сабуро).

Анализ динамики роста первичной культуры кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы проводили на 2 пассаже культивирования. Суспензию клеток в концентрации 100 000 клеток/мл вносили в пенициллиновые флаконы. Прирост клеток в популяции подсчитывали в камере Горяева после обработки монослоя 0,25%-ным раствором трипсина на всех стадиях роста культуры. Для определения концентрации клеток и подсчета живых клеток использовали метод окраски трипановым синим. Для этого 0,5 мл клеточной суспензии разводили в 5 раз 0,2%-ным раствором трипанового синего и инкубировали при 37 °С в течение 3–5 мин. Суспензию тщательно перемешивали и вносили в камеру Горяева. Рассчитывали показатели, характеризующие популяцию клеток:

1) Общее количество клеток (X) [5]:

$$X \text{ кл/мл} = N \times S \times 10\,000,$$

где X – количество клеток в 1 мл суспензии, N – количество клеток в 25 больших квадратах камеры Горяева, S – кратность разведения суспензии красителем, 10 000 – величина постоянная.

2) Процентное содержание живых клеток (неокрашенных трипановым синим) (ЖК, %) [5]:

ЖК = общее количество клеток – количество мертвых клеток/общее количество клеток × 100 %.

Содержание живых клеток в суспензии не должно быть меньше 60 %.

3) Индекс пролиферации клеток (ИП, отн. ед.):

$\text{ИП} = \text{число клеток окончательного роста} / \text{число посеянных клеток} \times 100 \%$.

4) Апоптотический индекс (АИ, %):

$\text{АИ} = \text{количество мертвых клеток} / \text{число посеянных клеток} \times 100 \%$.

5) Эффективность клонирования (ЭК, %):

$\text{ЭК, \%} = \text{количество клонов} / \text{количество посеянных клеток} \times 100 \%$.

Эффективность клонирования оценивали по способности клеток образовывать индивидуальные клеточные клоны. Суспензию единичных клеток получали методом серийных разведений исходной суспензии клеток. В чашки Петри диаметром 35 мм вносили суспензию единичных клеток (300 клеток в мл) для получения индивидуальных клонов. Для клонирования использовали среду F10 с 30 % эмбриональной сыворотки телят. Чашки Петри с клетками инкубировали в условиях CO₂ инкубатора при температуре (37±1) °С. Витальный анализ клонов проводили под инвертированным микроскопом (Nikon TS 100, Япония). Эффективность клонирования фибробластов оценивали спустя 6 суток после посева единичных клеток.

Колонии были зафиксированы 70%-ным этиловым спиртом и окрашены по Романовскому-Гимзе. Количественный анализ клонов проводили под микроскопом МБС-10, при увеличении ×32. Для кожного-мышечных фибробластов эмбриона коровы колонии определяли как изолированную группу, состоящую из дочерних клеток одной материнской клетки. Учитывали многоклеточные и малоклеточные колонии. Анализировали морфологию клеток в клонах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для проведения экспериментов использовали клетки 2–5-го пассажей культивирования. Выделенные кожно-мышечные фибробласты обладали способностью адгезироваться к поверхности культурального

флаксона, демонстрировали типичную фибробластоподобную форму (рисунок 1).

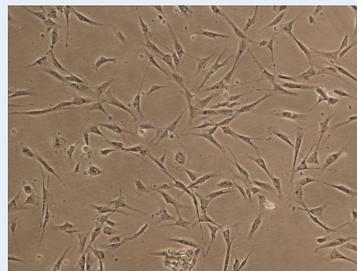


Рисунок 1. – Морфология фибробластов эмбриона коровы в первичной культуре. Фазовый контраст ×10

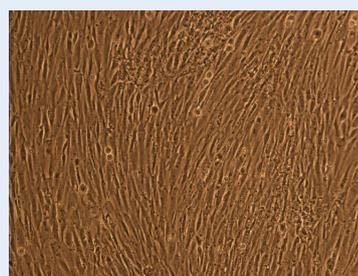


Рисунок 2. – Морфология фибробластов эмбриона коровы с конфлюэнтным монослоем. Фазовый контраст ×10

Среди свежеизолированных клеток наблюдали низкий уровень клеточной гибели. Фибробласты обладали высоким потенциалом пролиферации, стабильностью и формировали высококонфлюэнтный клеточный монослой (95–100 %) на 5–7-е сутки культивирования. Доля жизнеспособных клеток составила 97 %.

Клетки имели веретенообразную мультиполярную форму, на 2–4-е сутки хорошо распластаны на поверхности субстрата. По мере культивирования в конфлюэнтном слое клетки биполярны и менее распластаны (7–9-е сутки), образовывали характерные параллельные решетки и завитки. Ядро фибробластов овальной формы с содержанием 2-3 ядрышек. Грануляция и вакуолизация вокруг ядра отсутствуют. В культуральной среде единичные клетки во взвешенном состоянии имели шаровидную форму.

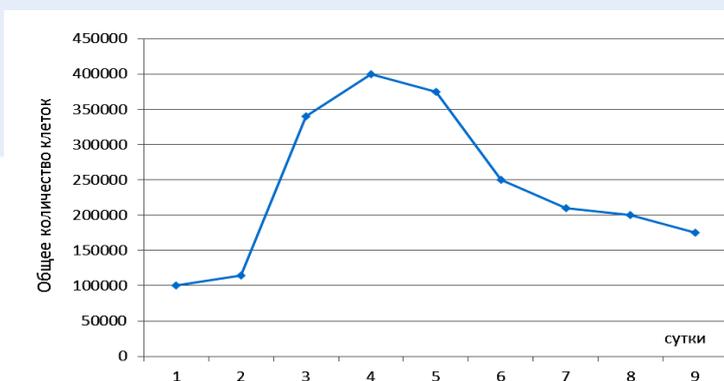
Результаты исследований по определению стерильности выделенных фиб-

робластов показали, что в течение 14 суток в пробирках с посевами на бактериологических питательных средах рост бактерий и грибов отсутствовал, изменений (цвета, наличия осадка и т.д.) не выявлено.

Изучена динамика роста фибробластов эмбриона коровы. Результаты исследований показали, что после посева клеток во флакон в концентрации 100 000 клеток/мл они входят в лаг-период продолжительностью 24–48 ч, сменяющийся на 3–4-е сутки периодом экспоненциального роста (логарифмическая фаза). В конце этого периода клетки достигают полного монослоя и к 6-м суткам входят в период замедленного роста или покоя (стационарная фаза),

за которым следует фаза снижения количества клеток и их гибель (рисунок 3).

Обычно после короткого периода экспоненциального роста тот или иной фактор становится лимитирующим. Это может происходить в результате истощения какого-либо фактора среды или в результате того, что культивируемые клетки полностью покроют поверхность, на которой растут. Скорость роста замедляется, и количество клеток в культуре достигает насыщения (конечная плотность клеток). Когда дальнейшие деления клеток прекращаются, наступает стационарная фаза роста культуры.



1–2-е сутки – лаг-фаза; 2–3-и сутки – фаза логарифмического роста; 3–5-е сутки – стационарная фаза; 6–9-е сутки – фаза снижения количества клеток и их гибели

Рисунок 3. – Фазы роста культуры кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы

Кроме того, на различных фазах роста фибробластов изучена жизнеспособность, пролиферация и гибель клеток при длительном культивировании в динамике. На ранних этапах роста культуры (1–3-и сутки) наблюдается высокая доля живых клеток (89–95 %) в популяции фибробластов, а начиная с 4-х суток резко снижается до 20–25 % (рисунок 4).

Выявлена закономерность в изменении пролиферации клеток и их гибели в

условиях длительного роста культуры фибробластов *in vitro*. По мере культивирования наблюдается снижение пролиферации клеток в отдельный период (рисунок 5).

Снижение пролиферации клеток обусловлено высоким уровнем их гибели. Начиная со стационарной фазы роста (3–5-е сутки), апоптотический индекс составил 80 % (рисунок 6).

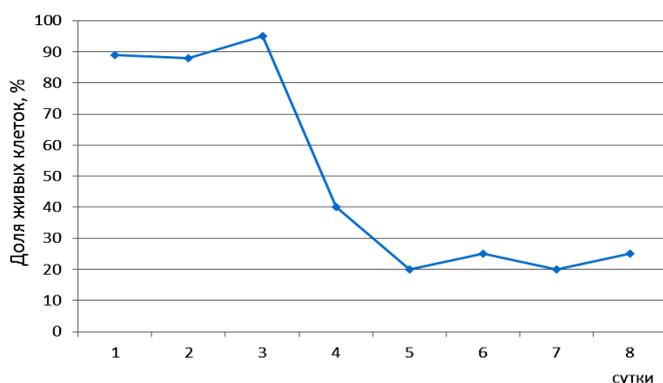


Рисунок 4. – Изменение доли живых клеток на фазах роста кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы на 2-м пассаже культивирования *in vitro*

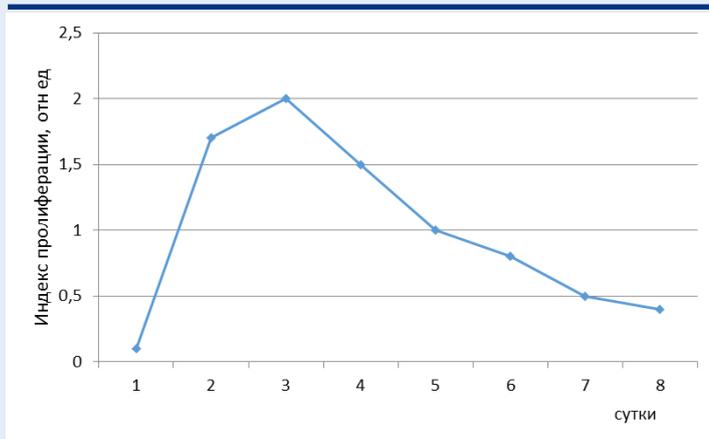


Рисунок 5. – Изменение индекса пролиферации в популяции кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы

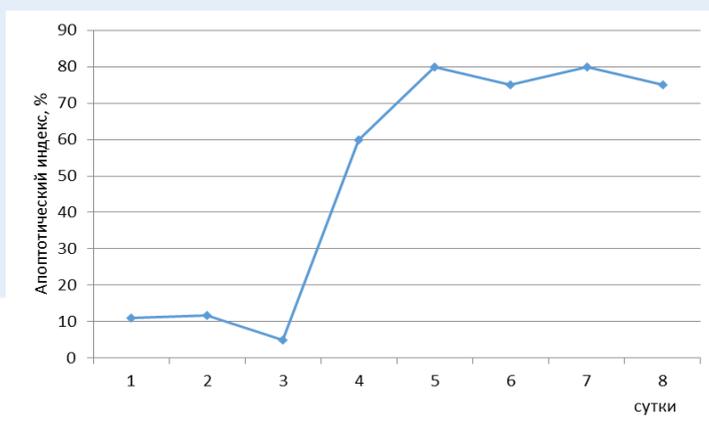


Рисунок 6. – Изменение апoptотического индекса в культуре кожно-мышечных фибробластов в зависимости от времени культивирования *in vitro*

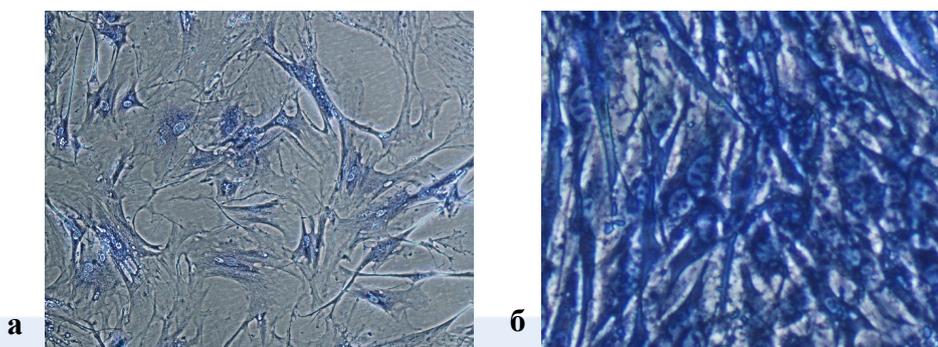
В условиях субкультивирования первичной культуры эмбриональных фибробластов, выделенных из кожно-мышечной ткани эмбриона коровы, показано, что на 2-м пассаже они характеризуются ярко выраженной гетерогенностью (рисунки 7, 8).

Методом клонирования популяция эмбриональных фибробластов коровы была разделена на две субпопуляции клеток, различающихся пролиферативным потен-

циалом и эффективностью клонирования (рисунок 8).

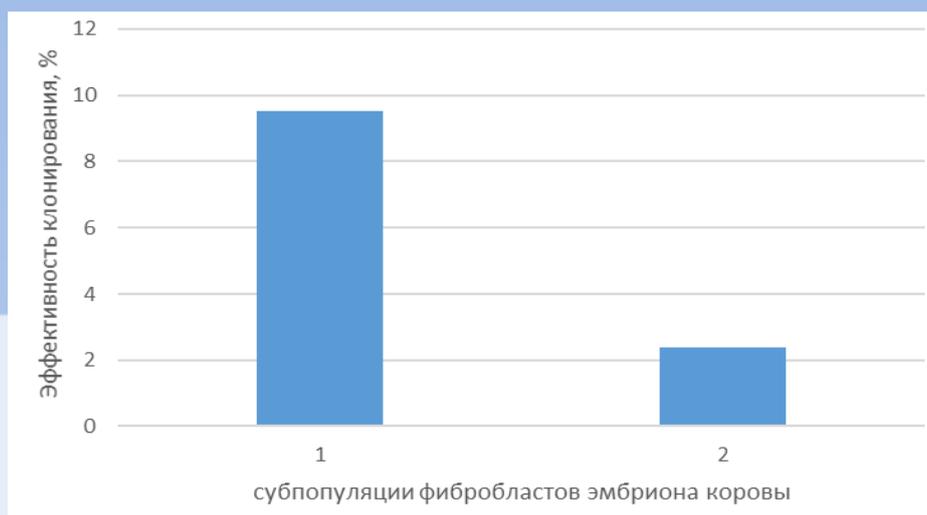
Фибробласты с высоким потенциалом пролиферации формировали многоклеточные клоны, состоящие из различных морфотипов клеток (рисунок 9).

Фибробласты с низким потенциалом пролиферации формировали малоклеточные клоны, состоящие из фиброцитов (рисунок 10).



а – фаза логарифмического роста субкультуры фибробластов на 3-и сутки культивирования, ув. $\times 100$; **б** – фаза стационарного роста субкультуры фибробластов на 5-е сутки культивирования, ув. $\times 100$

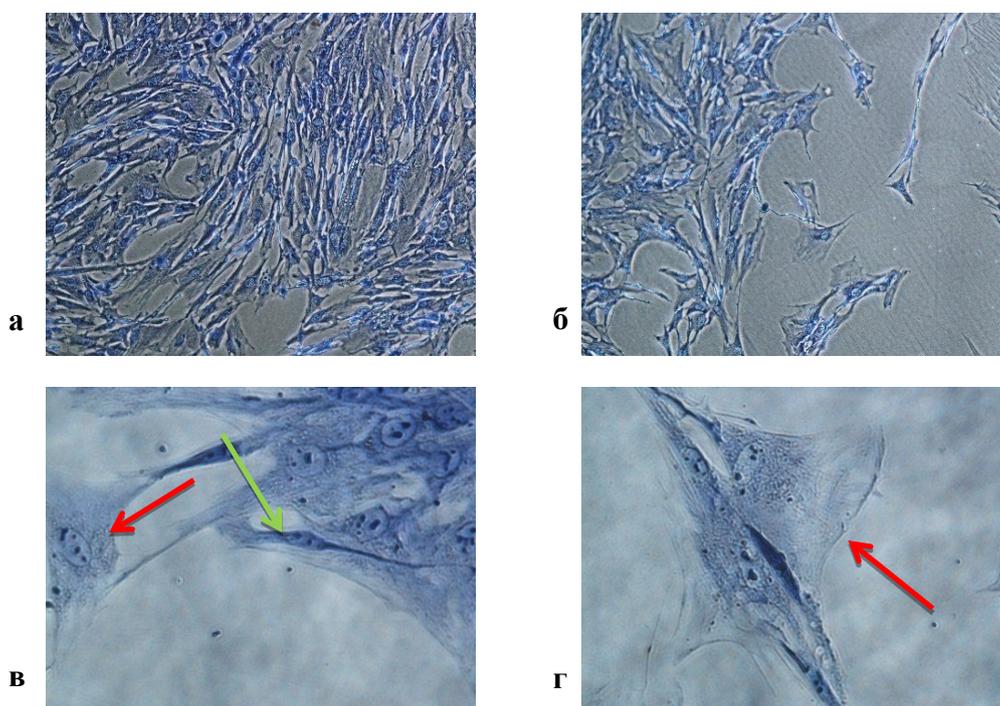
Рисунок 7. – Гетерогенная популяция кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы



1 – эффективность клонирования субпопуляции фибробластов с высоким потенциалом пролиферации;

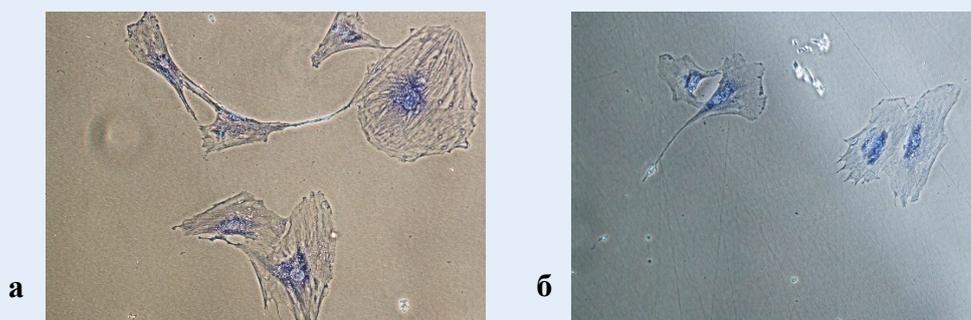
2 – эффективность клонирования субпопуляции фибробластов с низким потенциалом пролиферации

Рисунок 8. – Эффективность клонирования субпопуляций кожно-мышечных фибробластов эмбриона коровы (2 пассаж)



а – центральная часть многоклеточного клона, ув. $\times 100$; б – периферия многоклеточного клона, ув. $\times 100$; в – морфология клеток в многоклеточном клоне (красная стрелка – фибробласт; зеленая стрелка – фиброцит), ув. $\times 400$; г – поделившийся в клоне фиброцит, ув. $\times 400$

Рисунок 9. – Характеристика субпопуляции эмбриональных фибробластов с высоким потенциалом деления, формирующих многоклеточные клоны



а – малоклеточный клон фибробластов с низким потенциалом пролиферации, ув. $\times 100$;
б – двухклеточные клоны клеток с низким потенциалом пролиферации, ув. $\times 100$

Рисунок 10. – Характеристика субпопуляции фибробластов, состоящей из слабопролиферирующих клеток с низкой эффективностью клонирования

Таким образом, предложенная технология позволяет выделить многоклеточную фракцию эмбриональных фибробластов коровы, которая является гетерогенной популяцией и состоит из активно пролиферирующих клеток, что имеет существенное значение для применения их в регенеративной медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы из биоматериала была получена жизнеспособ-

ная популяция эмбриональных фибробластов коровы с высокой адгезивной способностью, образующая конфлюэнтный монослой, обладающая высокой пролиферативной активностью и клоногенностью.

Научные исследования, направленные на совершенствование методов выделения и технологий производства клеточного субстрата из культуры эмбриональных фибробластов, являются актуальными и перспективными для применения в ветеринарной медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дьяконов, Л. П. Животная клетка в культуре (*Методы и применение в биотехнологии*) / Л. П. Дьяконов. – М. : Спутник⁺, 2009. – 656 с.
2. Культуры клеток в заместительной терапии / Е. М. Петручук [и др.] // *БИО препараты. Профилактика, диагностика, лечение.* – 2017. – Т. 17, № 4. – С. 197–206.
3. Левченко, В. М. Сравнительная оценка морфофункциональных свойств фибробластов сельскохозяйственных животных : дисс. ... канд. биол. наук : 06.02.01 / В. М. Левченко. – Ставрополь, 2017. – 116 л.
4. Получение аттестованных фибробластов человека, пригодных для научных и медицинских исследований / Т. Д. Колокольцева [и др.] // *Биотехнология.* – 2007. – С. 58–64.
5. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы / В. П. Божкова [и др.]. – 2-е изд. – М. : Наука, 1988. – 318 с.
6. Способ выделения фибробластов, способ создания биотрансплантата на их основе (варианты) и способ регенерации тканей человека (варианты) : Патент РФ 2567004 / Г. В. Козлов. – Оpubл. 27.10.2015.
7. Freshney, R. Ian. *Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Technique, Fifth Edition* / R. Ian Freshney. – John Wiley & Sons, Inc., 2005. – 580 p.
8. Hayflick, L. The serial cultivation of human diploid cell strains / L. Hayflick, P. S. Moorhead // *Exp. Cell. Res.* – 1961. – Vol. 25. – P. 585–621.
9. «Neutral allografts» – lack of allogeneic stimulation by cultured human cell expressing MHC class I and class II antigens / V. A. Theobald [et al.] // *Transplant.* – 1993. – Vol. 55, № 1. – P. 128–133.

Красникова Е.Л., научный сотрудник

Мистейко М.М., кандидат ветеринарных наук, доцент

Мальчик О.В., научный сотрудник

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор

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

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРЕХ СИСТЕМ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ PRDC-КОМПЛЕКСА

Резюме

В статье приведены данные по качественной и количественной оценке ДНК/РНК, полученных при использовании трех разных наборов для выделения. Представлены сравнительные результаты ПЦР с праймерами к трем бактериальным и двум вирусным инфекциям. Проведена сравнительная оценка.

Ключевые слова: свиньи, респираторная патология, ПЦР, PRDC-комплекс, диагностика.

Summary

The article presents data on the qualitative and quantitative assessment of DNA/RNA obtained using three different isolation kits. Comparative results of PCR with primers for three bacterial and two viral infections are presented. A comparative assessment was carried out.

Keywords: pigs, respiratory pathology, PCR, PRDC complex, diagnostics.

Поступила в редакцию 17.05.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Под PRDC-комплексом подразумевают возбудителей, вызывающих респираторную патологию у свиней разного возраста. В зависимости от географического расположения и благополучия местности наиболее часто к таким возбудителям относят следующие виды бактерий: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Pasteurella multocida* и *Streptococcus suis*, из вирусных возбудителей – цирковир свиней 2-го типа, вирусы репродуктивного и респираторного синдрома свиней, вирус гриппа, вирус болезни Ауески, цитомегаловирус, рота- и коронавирусы [1, 2, 3].

Эффективная система выделения нуклеиновых кислот позволяет грамотно и корректно проводить лабораторно-диагностические исследования. В рамках современных реалий (интенсификации любого производства, замкнутых циклов и длительного использования помещений с быстрой сменой поголовья) наша задача –

определить систему выделения, которую мы сможем использовать для комплексной ПЦР-диагностики [4, 5].

На сегодняшний день существуют системы, которые эффективны в выделении ДНК и выделении РНК, а также системы, позволяющие выделять и ДНК, и РНК согласно инструкциям по применению.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были выбраны три системы, базирующиеся на жидкофазном выделении:

- набор для выделения ДНК/РНК («Ветфактор», Россия);
- набор для выделения ДНК/РНК «Рибосорб» («Амплиценс», Россия);
- набор для выделения РНК («АртБиоТех», Беларусь), взят для работы в качестве экспериментального образца, так как в инструкции прописана возможность выделения ДНК.

Выделение проводили согласно инструкциям к наборам. Выделенные пробы хранили при температуре -20°C .

Исследовали патологический материал от поросят разного возраста из хозяйства Гродненской области (абортплод, мертворожденный, трупы поросят 5, 30, 56 и 150 дней). Согласно проведенным ранее мониторинговым исследованиям в данном хозяйстве из патологического материала выделяется РНК РРСС, ДНК возбудителей гемофиллеза, парвовируса и цирковируса 2-го типа.

В качестве диагностических систем использовали системы, разработанные и разрабатываемые в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Согласно проведенным нами исследованиям из проб патологического материала от поросят с респираторной патологией наиболее часто выделяют следующих возбудителей: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, цирковир свиней 2-го типа, вирусы репродуктивного и респираторного синдрома свиней, реже – *Mycoplasma hyopneumoniae* и *Pasteurella multocida*, вирус болезни Ауески. Нами использованы диагностические системы на наиболее часто встречаемые инфекции: 3 бактериальные (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*) и 2 вирусные (цирковир свиней 2-го типа – ДНК-вирус, вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней – РНК-вирус). Все исследования проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием TagMan-зондов.

Для РНК-мишеней для одноэтапной RT-PCR смешивали 7,5 мкл буфера ОТ-ПЦР (2×), 0,12 мкл каждого праймера (50 мкМ), 0,18 мкл зонда (10 мкМ), 10 мМ дНТФ, 0,6 мкл смеси ферментов ОТ-ПЦР (25×), 3 мкл РНК и не содержащую нуклеазы воду. Условия термоциклирования: 45 °С в течение 30 мин, 95 °С в течение 10 мин, затем 35 циклов при 95 °С в течение 15 с и 55 °С в течение 30 с. Сигнал флуоресценции регистрировали на шаге 55 °С в зеленом канале (470–510 нм).

Для ДНК-мишеней для RT-PCR смешивали 2,5 мкл буфера ПЦР (10×), 0,12 мкл

каждого праймера (50 мкМ), 0,18 мкл зонда (10 мкМ), 10 мМ дНТФ, 1Ед Tag-полимеразы, 2 мкл ДНК и не содержащую нуклеазы воду. Условия термоциклирования: 95 °С в течение 5 мин, затем 35 циклов при 95 °С в течение 15 с и 55 °С (бактериальные патогены) и 60 °С (вирусные патогены) в течение 30 с. Сигнал флуоресценции регистрировали на шаге 55 °С в зеленом канале (470–510 нм).

Концентрацию ДНК/РНК выделенных из проб измеряли на приборе Nanodrop. Наличие белковых и химических примесей определяли по соотношению длины волн 280/260 и 260/230.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Согласно проведенным нами исследованиям более высокая концентрация суммарной ДНК выделялась набором фирмы «АртБиоТех», наименьшая концентрация суммарной ДНК наблюдалась при выделении ДНК из патологического материала набором «Рибосорб», соотношение белковых примесей и нуклеиновых кислот во всех случаях было больше 1,8, что говорит о достаточной для корректной постановки ПЦР степени очистки нуклеиновой кислоты от белковых примесей (таблица 1).

Однако визуально при выделении проб с наличием гемоглобина получали раствор выделенной ДНК/РНК соломенного цвета, дополнительная двукратная отмывка отмывочным буфером снижала интенсивность цвета, но при этом незначительно влияла на постановку ПЦР.

Соответственно, выбранные нами наборы позволяют выделять чистую суммарную ДНК для проведения ПЦР-исследований.

Наибольшее количество суммарной РНК выделялось набором фирмы «АртБиоТех», наименьшая концентрация наблюдалась при выделении РНК из патологического материала набором «Рибосорб», среднее соотношение белковых примесей и нуклеиновых кислот во всех случаях было больше 1,8.

Таблица 1. – Количество выделенной ДНК из патологического материала различными системами выделения

Наименование биологического материала	Количество ДНК, нг/мкл		
	Ветфактор	АртБиоТех	Амплисенс
Абортплод	17,0	925,0	77,5
Мертворожденный	477,0	500,0	62,5
5 дней	144,0	Н.и.	279,0
30 дней	68,5	760,0	164,0
56 дней	791,0	1292,0	82,0
150 дней	728,0	1453,0	397,0
Среднее	370,0	986,0	177,0
Соотношение 280/260	2,0298	2,06	1,972

Таблица 2. – Количество выделенной РНК из патологического материала различными системами выделения

Наименование биологического материала	Количество РНК, нг/мкл		
	Ветфактор	АртБиоТех	Амплисенс
Абортплод	18,0	488,0	184,0
Мертворожденный	398,0	809,0	170,0
5 дней	115,0	–	186,0
30 дней	63,2	620,0	57,2
56 дней	671,0	936,0	104,0
150 дней	692,0	928,0	350,0
Среднее	326,2	756,2	175,2
Соотношение 260/280	2,07	1,919	1,859

С помощью детальной оценки показателей каждой пробы установлено, что при измерении выделенной РНК количество белковых примесей несколько выше – до 30 % белка. Однако, скорее всего, это связано с несколькими циклами размораживания-оттаивания, что привело к частичной деградации РНК. При сравнении сохранности нуклеиновых кислот в растворах для элюции наиболее высокие показатели после нескольких циклов заморажива-

ния и оттаивания сохранил набор фирмы «Ветфактор» (2,0298 и 2,07 соответственно). При постановке ПЦР в режиме реального времени с праймерами к одной бактериальной и 2 вирусным инфекциям получены следующие результаты (рисунки 1–3).

Результаты ПЦР указывают на получение корректных результатов с ДНК/РНК всех трех систем выделения, при этом результаты коррелируют друг с другом (таблица 3).

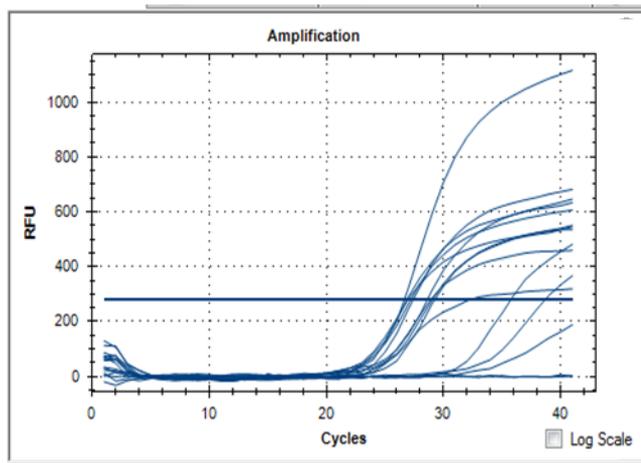


Рисунок 1. – Диаграмма результатов ПЦР в режиме реального времени с использованием набора для обнаружения цирковируса 2-го типа

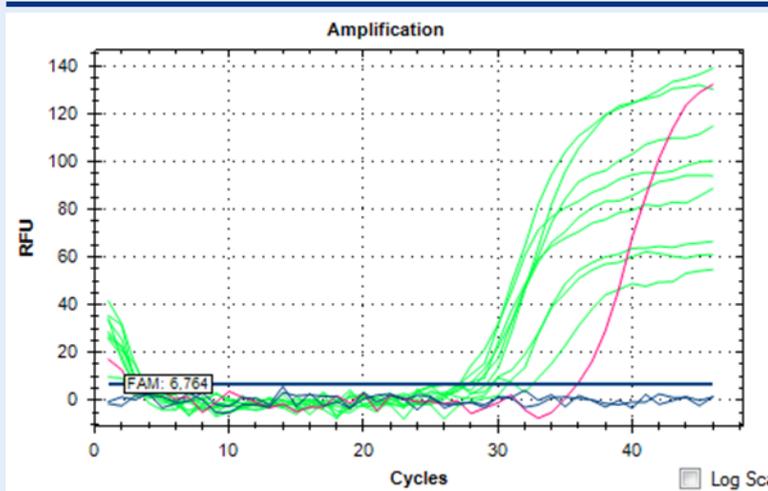


Рисунок 2. – Диаграмма результатов ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров к участку РНК ORF7 генома вируса РРСС

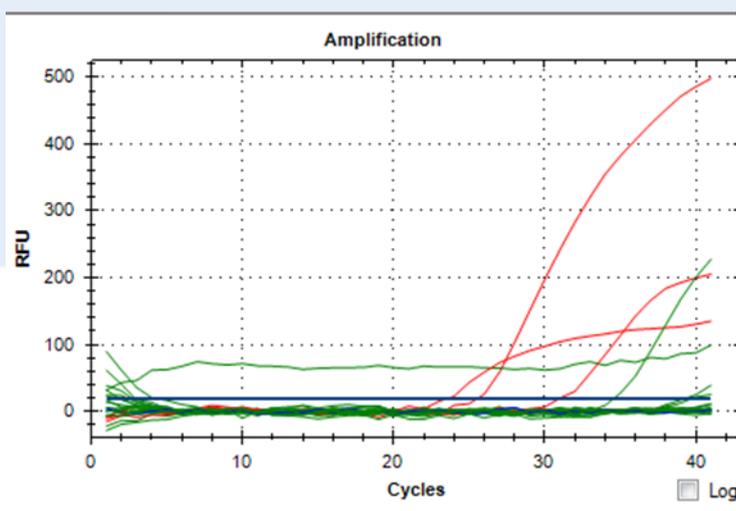


Рисунок 3. – Диаграмма результатов ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров к участкам ДНК *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*

Таблица 3. – Результаты ПЦР в режиме реального времени (значение Ct) по исследуемым видам инфекций

Наименование биологического материала	Цирковирус 2-го типа			РРСС			<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (A), <i>Bordetella bronchiseptica</i> (B), <i>Haemophilus parasuis</i> (H)		
	Вет-фактор	Арт-Био-Тех	Ампли-сенс	Вет-фактор	Арт-Био-Тех	Ампли-сенс	Вет-фактор	Арт-Био-Тех	Ампли-сенс
Абортплод	отриц.	32,71	отриц.	33,70	34,49	39,47	отриц.	отриц.	отриц.
Мертворожденный	отриц.	32,55	30,59	35,15	34,26	29,73	отриц.	отриц.	отриц.
5 дней	34,68	33,60	31,67	28,34	28,67	29,25	отриц.	отриц.	отриц.
30 дней	26,55	27,02	29,54	31,80	31,99	30,93	отриц.	отриц.	отриц.
56 дней	32,96	28,59	отриц.	30,44	30,23	31,13	Н (34,12)	Н (37,12)	Н (37,06)
150 дней	32,47	26,10	32,23	34,39	34,57	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
Положительный контроль	24,7	23,5	24,7	26,77	25,96	25,8	полож.	полож.	полож.
Отрицательный контроль	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.

Как видно из таблицы 3, результаты незначительно отличаются друг от друга. Это может свидетельствовать о том, что количество целевой ДНК/РНК в выделенных пробах отличается незначительно и не влияет на выявление геномов возбудителей. Так, значение C_t при выявлении генома цирковируса из патологического материала от 30-дневных поросят составило 26,55 в пробах ДНК, выделенных набором фирмы «Ветфактор» (Россия); 27,02 – набором фирмы «АртБиоТех» (Беларусь), 29,54 – набором «Рибосорб» фирмы «Амплисенс» (Россия). Все пробы положительные и указывают на содержание количества генома в среднем 10^6 (двумя первыми наборами) и 10^5 (третьим набором), что, согласно литературным данным, говорит о наличии в хозяйстве животных с клинической и патологоанатомической картиной цирковиральной инфекции.

Постановка РТ ПЦР с выделенной из патологического материала РНК дало похожие результаты. Так, значение C_t в пробах с РНК, выделенной набором фирмы «Ветфактор», – 28,34, набором фирмы «АртБиоТех» – 28,67, набором «Рибосорб» фирмы «Амплисенс» – 29,25.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Используемые в нашей работе системы позволяют выделить значительное количество тотальной ДНК/РНК, очищенной от белковых и химических примесей, содержащей достаточно целевой ДНК для обнаружения генома возбудителей PRDC-комплекса. Все три системы пригодны для выделения тотальной ДНК/РНК из патологического и биоматериала, которую в дальнейшем можно использовать для комплексной диагностики респираторной патологии свиней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Конструирование тест-системы для обнаружения серовариантов A, B, D *Pasteurella multocida* в полимеразной цепной реакции / А. С. Андрусевич [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2019. – № 1. – С. 43–48.
2. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark / M. S. Hansen [et al.] // *Comp Pathol*. – 2010, Aug-Oct. – P. 120–131.
3. Etiology of acute respiratory disease in fattening pigs in Finland / M. Haimi-Nakala [et al.] // *Porcine Health Manag*. – 2017. Published online 2017 Aug 23.
4. Лубенникова, М. В. Выделение ДНК – важный этап молекулярно-генетического исследования / М. В. Лубенникова, В. А. Афанасьев, К. А. Афанасьев // *Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ*. – 2020. – № 2 (21) апрель–июнь. – URL <http://e-journal.omgau.ru/images/issues/2020/2/00828>.
5. Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Состояние проблемы на современном этапе / Н. Е. Аукенов, М. Р. Масабаева, У. У. Хасанова // *Наука и здравоохранение*. – Семей : Государственный медицинский университет г. Семей. – 2014. – № 1. – С. 51–53.

наша продукция



УДК 619:616-076(619:616.98:578.831.31)

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-1-61-67>

Мистейко М.М., кандидат ветеринарных наук, доцент

Красникова Е.Л., научный сотрудник

Мальчик О.В., научный сотрудник

Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент

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

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* И *HAEMOPHILUS PARASUIS*

Резюме

Сконструированы отечественные ПЦР-системы для обнаружения геномов возбудителей актинобациллярной плевропневмонии и гемофильного полисерозита, проведен скрининг нуклеотидных последовательностей, подобраны специфические праймеры, указаны параметры проведения ПЦР. Приведены данные чувствительности, специфичности ПЦР и повторяемости результатов.

Ключевые слова: ПЦР, свиньи, диагностика, гемофильный полисерозит, актинобациллярная плевропневмония, респираторная инфекция, респираторная патология.

Summary

Domestic PCR systems have been designed to detect the genomes of the pathogens of actinobacillary pleuropneumonia and hemophilic polyserositis, screening of nucleotide sequences has been carried out, specific primers have been selected, and PCR parameters have been worked out. Sensitivity, specificity and repeatability results are given.

Keywords: PCR, pigs, diagnostics, hemophilic polyserositis, actinobacillary pleuropneumonia, respiratory infection, respiratory pathology.

Поступила в редакцию 17.05.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Возбудители актинобациллярной плевропневмонии (АПП) и гемофильного полисерозита входят в состав так называемого комплекса респираторной патологии свиней [1, 2, 3].

Интенсификация производства свинины привела к тому, что возбудители АПП и гемофильного полисерозита стали выделяться из пораженных легких свиней на всех этапах их выращивания [2].

Эти заболевания чаще регистрируются в крупных свиноводческих хозяйствах, в стадах с иммунодефицитом и характеризуются при остром течении геморрагическим воспалением лёгких и фибринозным плевритом, а при подостром и хроническом – развитием очагово-гноной некротической плевропневмонии и фибринозным плевритом [3].

Возникновение в стаде этих инфекций ведет к снижению прибыли за счет увеличения смертности (20–40 %), заболеваемости (до 90 %), дополнительных затрат на корма и антибиотики, снижения привесов, а в итоге приводит к значительному экономическому ущербу. Взрослые животные являются носителями этих инфекций и поддерживают стационарность [4, 5, 6].

Для АПП и гемофильного полисерозита характерны сезонность (осенне-зимний и весенний период), а также цикличность (смена периода спада заболеваемости фазой резкого ухудшения эпизоотической ситуации, при которой удельный вес АПП на вскрытии достигает 69 %) с интервалом 2,5–3 года.

При первичном заносе возбудителей в хозяйство заболеваемость доходит до

90 %, в том числе у подсвинков на откорме, что значительно увеличивает экономический ущерб.

Диагностика методом полимеразой цепной реакции (ПЦР) *Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Haemophilus parasuis* позволяет за короткий промежуток времени оценить эпизоотическую ситуацию в хозяйстве и скорректировать методы лечения и профилактики.

Цель работы – изучить чувствительность и специфичность сконструированных наборов реагентов для ПЦР-диагностики *Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Haemophilus parasuis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для подбора праймеров использовали данные Национального центра биотехнологической информации GenBank (NCBI), программы Vector NTI и Primer 3 Plus.

Выделение ДНК осуществляли на мини-колонках набором ДНК-ВК, ИБОХ (Минск), в соответствии с прилагаемой к набору инструкцией. Наличие в субнатанте ДНК и ее чистоту (наличие белковых и химических примесей) проверяли на спектрофотометре Nanodrop (Германия). В качестве положительных контрольных микроорганизмов использовали *Actinobacillus pleuropneumoniae* (АТСС 270088) и *Haemophilus parasuis* (КМИЭВ-170).

Выявление геномов возбудителей АПП и гемофилезного полисерозита проводили методом ПЦР, праймеры подбирали на область генома, консервативную для каждого возбудителя. Для проведения ПЦР с 2 мкл ДНК формировали смеси (объем 25,0 мкл): 2,5 мкл буфера ПЦР (10×) смешивали с 0,12 мкл каждого праймера (50 мкМ), 0,18 мкл зонда (10 мкМ), 10 мМ дНТП, 1Ед Tag-полимеразы и не содержащей нуклеазы водой.

Условия термоциклирования: 95 °С в течение 5 мин, затем 30 циклов при 95 °С в течение 60 с и 55 °С (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), 60 °С (*Haemophilus parasuis*) в течение 30 с, 72 °С – 7 мин.

Электрофорез проводили при напряжении 150 В в течение 30 мин в 1,6–2%-

ном агарозном геле, после осуществляли регистрацию продуктов амплификации на приборе Gel Doc XR с ImageLab Software, BIO-RAD (США).

Чувствительность ПЦР определяли путем 10-кратных разведений бактериальной массы *Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Haemophilus parasuis* (КМИЭВ-170) 0,85%-ным физиологическим раствором.

Для определения специфичности ПЦР в качестве исследуемых образцов использовали депонированные в музее РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» бактерии и вирусы, вызывающие респираторную патологию у свиней: *Bordetella bronchiseptica* (КМИЭВ-В120), *Streptococcus suis* (КМИЭВ-В184), *Salmonella spp.* (КМИЭВ-В131), *Parvovirus suis* (КМИЭВ-14В), *Pseudorabies virus* (КМИЭВ-В106), а также подтвержденные в ПЦР ранее выделенные ДНК *Circovirus type 2*.

В качестве исследуемых образцов использовали 130 проб легких от свиней разного возраста с патологическими изменениями, характерными для пневмонии. Посев патологического материала проводили на сердечно-мозговой агар с добавлением НАД и сыворотки крови. Выращенные колонии микроорганизмов, имеющих характерные морфологические и микроскопические признаки *Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Haemophilus parasuis*, параллельно исследовали в ПЦР и на приборе Vitek.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Белок OmlA является важным фактором вирулентности *Actinobacillus pleuropneumoniae*, участвует в соединении белка с внешней мембраной и функционирует в качестве сигнального пептида [6]. Для выравнивания участка, кодирующего ген белка OmlA, использовали следующие нуклеотидные последовательности, размещенные в NCBI: NZ_CP030753.1; NZ_CP022715.1; NZ_LS483358.1; NZ_LR134515.1; NZ_CP029003.1; NC_010278.1; NC_009053.1; NC_010939.1; NZ_LN908249.

Подбор пары праймеров проводили к участку 960 п.н. в программе Vector NTI.

AGCG	GAGCAGCCAA	AAAAAGAGGA	AGTCCACAA	GCGGATAATT	CGAAAGCGGA	AGAACCARAA	GAGATGGCTC	CGCAAGTAGA	TAGCCCGAAA
TCGC	CTCGTCGGTT	TTTTCTCCT	TCAAGGTGTT	CGCCTATTA	GCTTTCGCCT	TCTTGGTTTT	CTCTACCGAG	CGCTTCATCT	ATCGGGCTTT
GAAC	CAAAAATAT	GGCTCCACAA	ATGGSTAATC	CAAACTAAA	TGACCCACAA	GTAATGGCTC	CGAAAATGGA	TAATCCGCAA	AAAGATGCCC
CTTG	GTITTTTATA	CCGAGGTGTT	TACCCATTAG	GTTTTGATTT	ACTGGGTGTT	CATTACCGAG	GCTTTTACCT	ATTAGGCGTT	TTTCTACGGG
GAGA	AGAACTAAGT	AAGGATAAAA	GTAATGCGGA	AATTCTTAAG	GAATTAGGGG	TTAAGGATAT	TAATTCAGGT	ATCATTAAATA	ATGCTGATGT
CTCT	TCITGATCA	TCCTATTTT	CATTACGCCT	TTAAGAAATC	CTTAATCCCC	AATTCCTATA	ATTAAGTCCA	TAGTAATTAI	TACGACTACA
GAAT	TTAAAATAG	ATGAAAAGA	TCAGATTAAA	ATTGTATTAG	ATAAGAGTGA	AATAAATCGT	GACAGCTTGA	AAGTAACGAA	TGCAATTCOA
CTTA	AATTTTATC	TACTTTTTCT	AGTCTAATTT	TAACATAATC	TATTCICACT	TTATTTAGCA	CTGTGGAECT	TTCAITGGCT	ACGTTAAGGT
GATA	TTAAAACCTT	AAAAGATTCT	TCAGGTAAT	TATTAGGTTA	TTATGGATAT	ATGCAACTTA	GTCAAAGTAA	ACAAGATGAG	TCITTATAGTA
CTAT	AATTTTGAA	TTTTCTAAGA	AGTCCATTTA	ATAATCCAAT	AATACCTATA	TACGTTGAAT	CAGTTCATTC	TGTTCTACTC	AGAATATCAT
GTCT	AAATCTTCT	AATTACTATC	TATTATCAAT	GAATGAACAA	GAAAAACCTC	GTCCGTCTAA	ATCACATAAG	TATAAAGGGA	CAATGATTTA
CAGA	TTTAGAAGA	TTAATGATAG	ATAATAGTTA	CTTACTTGT	CTTTTTTGAG	CAGGCAGATT	TAGTGATTGC	ATATTTCCCT	GTTACTAAAT
TTCG	AGTGTAGCAA	ATAATAAAT	AGAAGCGGAA	GTTAAGGCGC	AATATGACCA	TTCTAGTAAA	AAACTATCTA	TGCAAGTTTT	CGGACAAGAT
AAGC	TCACATCGTT	TATTATTTAA	TCITTCGCTT	CAATTCGCG	TTATACTGGT	AAGATCATT	TTTGTAGAT	ACGTTCAAAA	GCCTGTCTA
CATT	GGAGATTAGC	AGAGGCATCA	GGAATAAATA	ATGTTAAACT	ACCAGCAAGC	AAATTACGTG	ACGTTATAGT	TTCTGATAAA	GGAGATATAA
GTA	CCTCTAATCG	TCCTCGTAGT	CCTTATTTAT	TACAATTTGA	TGGTCTTTCG	TTAATGACAC	TGCAATATCA	AAGACTATTT	CCTCTATATT
TATT	ATATTTAGAA	GATAGTACGC	CATCAAAAT	TACTCCAAAC	GCAAACTTCT	CGGTGGTTTT	TTTTGGTAAA	AACGGTGAAG	TACTGGCAGG
ATAA	TATAAATCTT	CTATCATGCG	GTAGTTTTAA	ATGAGGTTTG	CGTTTTGAAGA	GGCCACCAA	AAAACCATTT	TGCCACTTC	ATGACCCGTC
GGAA	AGCATTAAAG	GAGAATGGCA	AGGCGTAATC	GGTGCTACGG	CAACACAAA	AGAAGATAAA	AAATAAACGC	TTTGCTTACC	AAACTAAAAG
CCTT	TCGTAATTC	CTCTTACCGT	TCGCGATTAG	CCACGATGCC	GTTGTTGTTT	TCTTCTATTT	TTTATTTGCG	AAACGAATGG	TTGATTTTC
TTCC	GGATAGCTTT	TTTATTTGTT	AATCAGTCT	AA					
AAGC	CCTATCGAAA	AAATAACAA	TTAGTCAGGA	TT					

Рисунок 1. – Фрагмент участка мишени гена белка OmlA с выбранной парой праймеров

Теоретические характеристики выбранных пар праймеров оценивали с использованием программного обеспечения Primer 3. Специфичность праймеров прове-

рили по всем последовательностям в GenBank с использованием программного обеспечения BLAST в NCBI.

Таблица 1. – Теоретические характеристики и специфичность выбранных пар праймеров к участку ДНК *Actinobacillus pleuropneumoniae*

<p>Последовательность: CACCGATTACGCCTTGCCA</p> <p>Длина: 19 п.н.</p> <p>Tm: 65,3 °C</p> <p>GC: 57,9%</p>	<p>Последовательность: AAGGTTGATATGTCGCACT</p> <p>Длина: 20 б.п.</p> <p>Tm: 59,8 °C</p> <p>GC: 50,0%</p>
<p>Описание</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Штамм <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> NCTC10976, геномная сборка, хромосома: 1 <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> штамм S4074 хромосома, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> серовар 1 ул. 4074 хромосома, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> штамм KL 16, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>, штамм MV279, внешний мембранный ген липопротеина A (omlA), час: <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> серовар 7 ул. AP76, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> клон SC-A ген липопротеина внешней мембраны (omlA), полный cds <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> L20 серотипа 5b полный геном 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Штамм <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> NCTC11384, геномная сборка, хромосома: 1 <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> серовар 1 ул. 4074 хромосома, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> штамм KL 16, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> серовар 8, геномная сборка MIDG2331, хромосома: 1 <input type="checkbox"/> Ген <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> omlA для липопротеина внешней мембраны, полный cds, штамм: 3906 <input type="checkbox"/> Ген <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> omlA для липопротеина внешней мембраны, полный cds, штамм: N-282 <input type="checkbox"/> Ген <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> omlA для липопротеина внешней мембраны, полный cds, штамм: N-273 <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>, штамм 3606, ген липопротеина A, долобный внешней мемbrane (omlA), полная <input type="checkbox"/> Штамм <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>, штамм MV512, внешняя мембрана, липопротеин A (omlA), полный cds <input type="checkbox"/> Ген <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> штамма HS143 с липопротеином A, долобным наружной мемbrane (omlA) <input type="checkbox"/> Штамм <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>, штамм MV235, внешняя мембрана, липопротеин A (omlA), частичный. <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>, штамм MV279, внешний мембранный ген липопротеина A (omlA), частичная г <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>, штамм MV5237, ген липопротеина A, долобный внешней мемbrane (omlA), ча <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>, штамм MV5651, ген наружной мембраны, липопротеин A (omlA), частичный, с <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> серовар 7 ул. AP76, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> серовар 3 ул. JL03, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> клон SC-A ген липопротеина внешней мембраны (omlA), полный cds <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> L20 серотипа 5b полный геном

С целью выявления большинства серовариантов *Haemophilus parasuis* нами был выбран участок ДНК, кодирующий последовательность гена малой субъедини-

цы рибосомальной РНК 16S. Из литературных источников [7] подобраны праймеры, ограничивающие участок ДНК длиной 821 п.н. (таблица 2).

Таблица 2. – Теоретические характеристики и специфичность выбранных пар праймеров к участку ДНК *Haemophilus parasuis*

5* agcgggcaacc cttaatcct3*	5* tcgtcacccctctgtatgcac3*
<p>описание</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Штамм Glaesserella parasuis XH01 16S ген рибосомальной РНК, частичная последовательность <input type="checkbox"/> Grimontia sp. ген рибосомальной РНК штамма TNAF87 16S, частичная последовательность <input type="checkbox"/> Enterobacter sp. штамм Unkn789 16S ген рибосомальной РНК, частичная последовательность <input type="checkbox"/> Pyricularia oryzae изолят MZ5-1-6 хромосома 1, полная последовательность 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Glaesserella parasuis strain XH01 16S ribosomal RNA gene, parti <input type="checkbox"/> Glaesserella parasuis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence <input type="checkbox"/> Glaesserella parasuis D74 chromosome, complete genome <input type="checkbox"/> Glaesserella parasuis strain LYC2 16S ribosomal RNA gene, parti <input type="checkbox"/> Glaesserella parasuis strain LYW1 16S ribosomal RNA gene, parti <input type="checkbox"/> Glaesserella parasuis strain LY02 16S ribosomal RNA gene, parti <input type="checkbox"/> Glaesserella parasuis strain LYH5 16S ribosomal RNA gene, parti <input type="checkbox"/> Glaesserella parasuis strain LYD1 16S ribosomal RNA gene, parti <input type="checkbox"/> [Haemophilus] parasuis strain CL120103, complete genome <input type="checkbox"/> [Haemophilus] parasuis strain SC1401, complete genome

В стандартной ПЦР нами проверены подобранные и синтезированные фирмой «Праймтех» (Минск) праймеры к участку генома *Actinobacillus pleuropneumoniae*, в качестве положительного контрольного образца использовался штамм ATCC 270088. Амплификацию проводили в амплификато-

ре С 1000 Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Положительные пробы видны в ультрафиолетовом свете при длине волны, равной 254 нм или 310 нм, в виде полосы, соответствующей маркеру на уровне 960 п.н. красно-оранжевого цвета. Результаты представлены на рисунке 2.

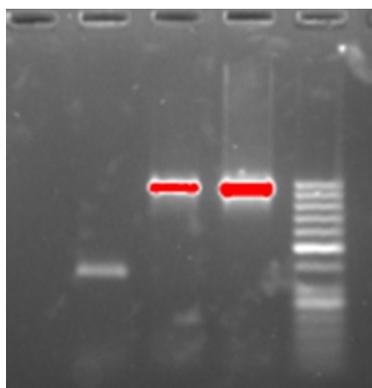


Рисунок 2. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации с праймерами к участку ДНК *Actinobacillus pleuropneumoniae* длиной 960 п.н., слева направо: отрицательный контроль; патологический материал; штамм *Actinobacillus pleuropneumoniae*; положительный контроль; маркер молекулярного веса

Далее нами определялась чувствительность ПЦР путем 10-кратных разведений лиофильно высушенной культуры *Actinobacillus pleuropneumoniae* (10^{-1} – 10^{-6}), количество клеток в исходном образце из-

мерялось по МакФарланду и составило 500 тыс. клеток/мл, при измерении количество ДНК составило 0,7 нг/мкл. Результаты представлены на рисунке 3.

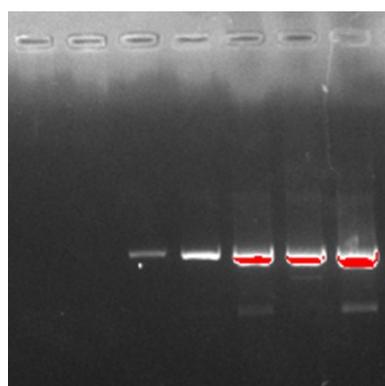


Рисунок 3. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации генома *Actinobacillus pleuropneumoniae* в ПЦР в 10-кратных разведениях, слева направо: 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} ; 10^{-1} ; 500 тыс. микробных тел/мл

Согласно полученным результатам ДНК *Actinobacillus pleuropneumoniae* выделяется методом ПЦР в разведении до 10^{-4} (500 микробных клеток).

Кроме того, нами проведены исследования специфичности ПЦР с ДНК выде-

ляемых при респираторной патологии свиней возбудителей. Согласно полученным результатам (рисунок 4) ПЦР с выбранными праймерами специфична для ДНК *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

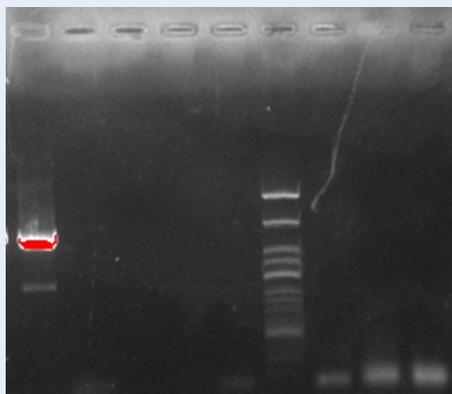


Рисунок 4. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации в ПЦР амплификационных смесей, содержащих праймеры к участку генома *Actinobacillus pleuropneumoniae* с ДНК возбудителей респираторной патологии свиней, слева направо: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Haemophilus parasuis*; *Bordetella bronchiseptica*; *Streptococcus suis*; *Circovirus type 2*; маркер молекулярного веса; *Salmonella spp.*; *Parvovirus suis*; *Pseudorabies virus*

Далее в ПЦР нами проверены подобранные и синтезированные фирмой «Праймтех» (Минск) праймеры к участку генома *Haemophilus parasuis*. В качестве положительного контроля использовался

штамм *Haemophilus parasuis* (КМИЭВ-170). Результаты, представленные на рисунке 5, указывают на то, что смеси пригодны для выявления генома *Haemophilus parasuis*.

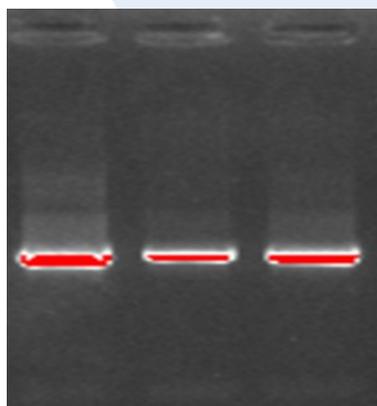


Рисунок 5. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации с праймерами к участку ДНК *Haemophilus parasuis* длиной 821 п.н.

Далее нами определялась чувствительность ПЦР путем 10-кратных разведений лиофильно высушенной культуры *Haemophilus parasuis*. Согласно полученным результатам (рисунок 6) ДНК *Haemo-*

philus parasuis выделяется методом ПЦР в разведении до 10^{-3} (5000 микробных клеток). Количество клеток в исходном образце составило 500 тыс. клеток/мл, при измерении количества ДНК составило 1,5 нг/мкл.

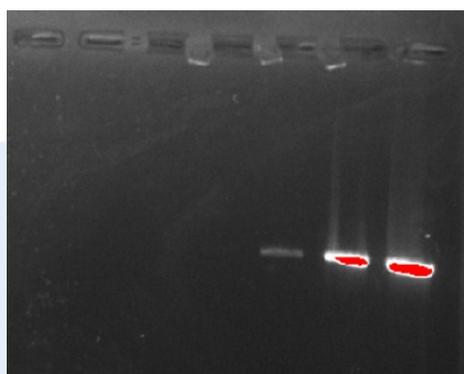


Рисунок 6. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации генома *Haemophilus parasuis* в ПЦР в 10-кратных разведениях, слева направо: 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} ; 10^{-1} ; 500 тыс. микробных тел/мл

Кроме того, нами проведены исследования специфичности ПЦР с ДНК часто встречающихся при респираторной патологии свиней возбудителей. Согласно полу-

ченным результатам (рисунок 7) ПЦР с используемыми праймерами специфична для ДНК *Haemophilus parasuis*.

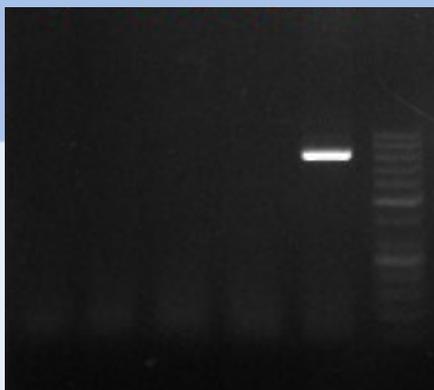


Рисунок 7. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации в ПЦР амплификационных смесей, содержащих праймеры к участку генома *Haemophilus parasuis* с ДНК возбудителей респираторной патологии свиней, слева направо: *Bordetella bronchiseptica*; *Actinobacillus Pleuropneumoniae*; *Streptococcus suis*; *Salmonella spp.*; *Haemophilus parasuis* (положительный контроль); маркер молекулярного веса

Все исследования с выделенной ДНК *Haemophilus parasuis* и *Actinobacillus pleuropneumoniae* проводились при одинаковых условиях амплификации трижды с целью учета повторяемости результатов. Согласно проведенным исследованиям идентичность результатов по чувствительности и специфичности составила 100 %.

Кроме того, проведена корреляция выделяемости возбудителей методом посева на питательных средах с последующей идентификацией изолятов в Vitek и ПЦР. Выросшие на сердечно-мозговом агаре культуры, сходные по морфологическим и культуральным признакам, смывали физраствором, ДНК выделяли по вышеописанной методике и проводили исследования ПЦР. Параллельно проводили пересев отдельных колоний с целью получения чистой культуры для дальнейшей идентификации полученных изолятов при помощи прибора Vitek.

Согласно полученным результатам, из всех изолятов (70 проб), выросших на сердечно-мозговом агаре и идентифицированных в Vitek как *Actinobacillus pleuropneumoniae*, методом ПЦР выделен геном *Actinobacillus pleuropneumoniae*. В 10 % изолятов, имеющих морфологические и культуральные свойства, близкие *Actinobacillus*, в ПЦР геном *Actinobacillus pleuropneumoniae* не обнаружен. Из 30 проб патологического материала первоначально выделен геном *Actinobacillus pleuropneumoniae*, морфологически схожие колонии на сердечно-мозговом агаре не выросли.

Возбудитель гемофильного полисерозита выделен только в 20 из 130 проб патологического материала, и в 100 % случаев результаты Vitek и ПЦР совпадали.

Результаты обнаружения генома *Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Haemophilus parasuis* в изолятах, выросших на сердечно-мозговом агаре одной из экспертиз, представлены на рисунке 8.

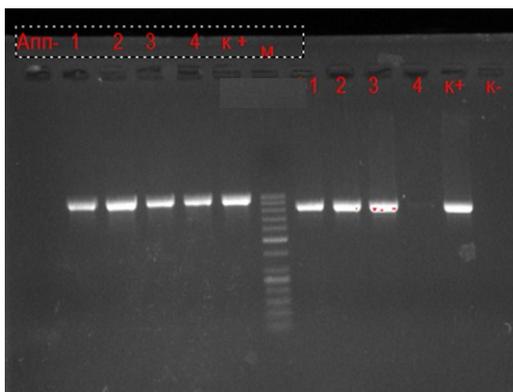


Рисунок 8. – Результаты амплификации ДНК изолятов бактериальных культур с характерными морфологическими и культуральными свойствами *Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Haemophilus parasuis*, слева направо: App- – отрицательный контроль; 1–4 изоляты из культур *Actinobacillus pleuropneumoniae*; k+ – положительный контроль *Actinobacillus pleuropneumoniae*; m – маркер молекулярного веса 50 п.н.; 1–4 – изоляты из культур *Haemophilus parasuis*; k+ – положительный контроль *Haemophilus parasuis*; k- – отрицательный контроль

ВЫВОДЫ

1. Выбранные и синтезированные праймеры к участку ДНК *Actinobacillus pleuropneumoniae* (белок OmlA) и *Haemophilus parasuis* (участок малой субъединицы рибосомальной РНК 16S) позволяют проводить специфичную для этих возбудителей ПЦР.

2. Сконструированные наборы реагентов для обнаружения возбудителей АПП и гемофилезного полисерозита позволяют выявлять возбудителя в разведениях микробных клеток 10^{-3} *Haemophilus parasuis* и 10^{-4} *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

В ПЦР геном *Actinobacillus pleuropneumoniae* детектируется на 30 % случаев чаще, чем при проведении бактериологических исследований. Из патологического материала геном *Actinobacillus pleuropneumoniae* выделяется в 52 % от всех исследованных образцов предоставленного биоматериала, что составило 100 % образцов, выросших на питательных средах и определенных прибором Vitek как *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Возбудитель гемофилезного полисерозита выделен только в 15 % проб патологического материала, и в 100 % случаев результаты Vitek и ПЦР совпадали.

ЛИТЕРАТУРА

1. Выделение и серотипизация возбудителя актинобациллярной плевропневмонии от поросят с респираторной патологией / А. С. Андрусевич [и др.] // Экология и животный мир. – 2020. – № 1. – С. 79–83.
2. Красникова, Е. Л. Комплекс респираторных патологий свиней в хозяйствах Беларуси / Е. Л. Красникова, А. С. Андрусевич, О. В. Мальчик // Экология и животный мир. – 2020. – № 2. – С. 37–41.
3. Пейсак, З. Болезни свиней / З. Пейсак ; пер. с польск. – Брест : Брестская типография, 2008. – 406 с.
4. Lung, O. Multiplex PCR and Microarray for Detection of Swine Respiratory Pathogens / O. Lung, S. Ohene-Adjei, C. Buchanan // Transbound Emerg Dis. – 2017. – Jun; 64(3). – S. 834–848.
5. Opriessnig, T. Polymicrobial respiratory disease in pigs / T. Opriessnig, L. G. Gimenez-Lirola, P. G. Halbur // Anim Health Res Rev. – 2011; 12. – S. 133–148.
6. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 19, and reformulation of previous multiplex PCRs for capsule-specific typing of all known serovars / O. W. Stringer [et al.] // Proposal of Veterinary Microbiolog. – 2021. – Vol. 255.
7. Oliveira, S. *Haemophilus parasuis* diagnostics / S. Oliveira // Journal of Swine Health and Production. – 2007. – Vol. 15, № 2. – P. 99–103.


САПОФОР



- ▶ ИММУНОСТИМУЛЯТОР;
- ▶ ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ КОРОВ, БОЛЬНЫХ СУБКЛИНИЧЕСКИМ МАСТИТОМ;
- ▶ КОМПЛЕКСНАЯ ТЕРАПИЯ И ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ТЕЛЯТ И ПОРОСЯТ



www.VIEVM.BY

УДК 619.615.9-07.615.2

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-1-68-74>

Кучинский М.П., доктор ветеринарных наук, профессор

Савчук Т.М., научный сотрудник

Кучинская Г.М., научный сотрудник

Баянков А.С., магистрант

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

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ АНТИПРОТОЗОЙНОГО ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНОГО ХИНАЗОЛИНОНА

Резюме

В статье приводятся результаты токсикологических исследований нового ветеринарного препарата, предназначенного в качестве лечебно-профилактического средства при криптоспориidioзе телят. Установлено, что испытуемый образец относится к 4-му классу опасности (вещества малоопасные).

Ключевые слова: токсичность, крысы, кролики, морские свинки, препараты, производное хиначолинона, криптоспориidioз.

Summary

The article presents the results of toxicological studies of a new veterinary drug intended as a therapeutic and prophylactic agent for cryptosporidiosis of calves. It is established that the test sample belongs to hazard class 4 (low-hazard substances).

Keywords: animals, toxicity, rats, rabbits, guinea pigs, drugs, quinazolinon, cryptosporidiosis.

Поступила в редакцию 29.04.2022 г.

Зооантропонозные заболевания являются актуальной проблемой как ветеринарной, так и гуманной медицины. Одним из них является криптоспориidioз, вызываемый паразитированием простейших из рода *Cryptosporidium* [8]. Болезнь протекает с признаками угнетения, снижения аппетита, нарушения обмена веществ и иммунитета, а также поражения пищеварительного тракта [2, 6]. Естественным резервуаром криптоспориидий чаще являются животные. У некоторых из них (крысы, мыши, кролики, собаки, кошки, птицы, рептилии и др.) криптоспориidioзная инвазия протекает без клинических проявлений, а у других (телята, козлята, ягнята, поросята, олени, обезьяны) – с многообразными и выразительными клиническими симптомами. Факторы передачи возбудителя – корм, вода, вымя коров, загрязнённые ооцистами, возможно внутриутробное заражение [2, 7].

Исследования показывают, что криптоспориидии в организме животных часто обнаруживаются в комплексе с эшерихиями, кластридиями, сальмонеллами, что значительно отягощает течение болезни и может приводить к их гибели [2].

Криптоспориidioз животных имеет широкое распространение. В Республике Беларусь возбудитель криптоспориidioза диагностируется у крупного рогатого скота, овец и свиней, причем более интенсивно поражается крупный рогатый скот, особенно телята до 20-дневного возраста. Источником инвазии для телят является взрослый крупный рогатый скот, другие виды животных, а также обслуживающий персонал. Ооцистами, которые выделяют больные телята, могут инфицироваться другие животные, а также люди [2, 4, 6].

В настоящее время криптоспориidioз молодняка крупного рогатого скота до-

статочно широко распространен и диагностируется во все сезоны года, но пик инвазии все же приходится на конец зимы и весну, когда новорожденные телята находятся в состоянии иммунодефицита и влажная погода этого периода способствует высокой выживаемости ооцист криптоспоридий [2, 6].

Ущерб, причиняемый простейшими вида *Cryptosporidium parvum*, очень высок и складывается из убытков, причиняемых падежом молодняка, отставанием в росте и развитии переболевших животных, а также из расходов, связанных с организацией профилактических и лечебных мероприятий [3, 7].

В течение длительного времени в практике ветеринарной медицины для борьбы с криптоспориозом используются фармакологические препараты различных групп, однако практически все они имеют определенные недостатки, в том числе высокую токсичность и недостаточную эффективность [2, 5, 7].

В последние годы эффективная защита животных от эндо- и эктопаразитов базируется на применении современных высокоэффективных противопаразитарных средств. Их разработка является процессом трудоёмким и длительным, в котором важная роль отводится токсикологической оценке. Она является первым и обязательным этапом доклинических исследований новых ветеринарных препаратов. Именно доклиническое исследование на лабораторных животных определяет их дальнейшую судьбу.

Из литературных данных известно, что выраженной антипротозойной активностью обладают производные хинозалинона, относящиеся к группе азотсодержащих полигетероциклических соединений [3, 7].

С учетом вышеизложенного был создан экспериментальный образец препарата с рабочим названием «Ветгалофугинон», который содержит в 1,0 мл в качестве действующего вещества 0,5 мг галофугинона лактата, а также вспомогательные вещества. По внешнему виду он пред-

ставляет собой прозрачную жидкость желтого цвета.

Ветгалофугинон планируется применять в практике ветеринарной медицины как лечебно-профилактическое средство при криптоспориозе телят.

Цель работы – проведение токсикологических исследований экспериментального образца инъекционного препарата на основе производного хинозалинона – галофугинона лактата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение острой токсичности экспериментального образца ветеринарного препарата проведено на белых крысах массой тела 180–200 г в условиях вивария РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Исследования выполнены согласно нормативному документу [1].

Среднесмертельную дозу (ЛД₅₀) рассчитывали по методу Кёрбера. Класс опасности определяли по ГОСТ 12.1.007-76 (Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности).

Ориентировочная среднесмертельная доза была определена в предварительном эксперименте на 8 крысах, на основании результатов которого был поставлен развернутый опыт.

В развернутом опыте было испытано 5 доз препарата: 27500, 25000, 22500, 20000 и 17500 мг/кг массы тела, что составляет соответственно 5,2; 4,7; 4,3; 3,8 и 3,3 мл на крысу, или 13,75; 12,50; 11,25; 10,0 и 8,75 мг/кг по действующему веществу. На каждую дозу было взято по 6 животных. Для контроля было отобрано 6 крыс, которым внутривентриально вводили по 5,0 мл дистиллированной воды. За опытными и контрольными животными в течение 14 дней вели постоянные клинические наблюдения с регистрацией общего состояния, реакций на корм, воду и внешние раздражители.

Хроническую токсичность препарата определяли на белых крысах массой 170–220 г. При этом руководствовались резуль-

татами, полученными при изучении острой токсичности. Изучена 1/10, 1/20 и 1/50 от ЛД₅₀, что составляет 2250 мг/кг (1-я группа), 1125 мг/кг (2-я группа) и 450 мг/кг (3-я группа) массы тела. Перед испытанием препарат разводили дистиллированной водой 1:10 и вводили с учетом динамики живой массы 4,4–5,8; 2,1–2,6 и 0,8–1,0 мл на крысу соответственно ежедневно внутрижелудочно в течение 30 дней. На каждую дозу препарата брали по 10 крыс. Животным контрольной группы (4-я группа) в количестве 10 голов вводили по 5,0 мл дистиллированной воды.

В течение всего эксперимента за крысами вели наблюдение, учитывая потребление корма и воды, состояние шерстного покрова, поведение, прирост живой массы. В конце опыта крыс убивали, брали кровь для биохимического исследования, производили патологоанатомическое вскрытие для установления характера повреждающего действия препарата и взвешивали внутренние органы.

Для оценки местно-раздражающего действия экспериментального образца препарата на кожу и слизистые оболочки глаз было использовано 4 взрослых кролика массой тела 2,6–2,8 кг. На кожный покров кроликов после выстригания шерсти в области спины размером 7×8 см наносили препарат в нативном виде в дозе 20,0 мг/см², или 0,02 мл/см². Экспозиция составляла 4 ч. За клиническим состоянием и возможным проявлением интоксикации наблюдали в течение 2 недель. При этом регистрировали функциональные изменения на коже, характеризующиеся проявлением различной степени выраженности эритемы и отека.

Аллергизирующее действие ветгалофугинона изучали в условиях вивария института на 10 морских свинок массой 250–300 г методом накожных аппликаций. Сенсибилизацию проводили путем ежедневных аппликаций в количестве 0,1 мл на выстриженный участок кожи боковой поверхности туловища размером 2×3 см в течение 15 дней. Остатки препарата с кожи удаляли через 4 ч. Разрешающую дозу в

той же концентрации наносили после 14-дневного интервала. Сенсибилизирующую способность экспериментального образца созданного препарата учитывали регулярно, оценивая реакцию со стороны кожи.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ результатов изучения острой токсичности показал, что после введения препарата в дозе 17500 мг/кг массы тела у белых крыс отмечалось кратковременное снижение двигательной активности, аппетит был сохранен, гибели животных не было.

Доза препарата 20000 мг/кг массы у лабораторных животных вызывала в начале легкую гиподинамию, затем крысы активизировались, аппетит был ослаблен, в течение суток пала 1 крыса.

С увеличением дозы вводимого препарата (22500, 25000 мг/кг) клинические признаки интоксикации усиливались. У животных наблюдалась гипо- и адинамия, крысы ложились, аппетит был ослаблен, а некоторые отказывались от приема корма и воды, дыхание учащалось, реакция на внешние раздражители была снижена. В течение двух суток погибли 2 и 4 крысы соответственно.

В дозе 27500 мг/кг массы отмечена 100%-ная гибель животных. Основная масса животных погибала в течение первых 24 ч.

В контрольной группе у крыс признаков интоксикации не наблюдалось. В течение всего периода наблюдений они были активны, охотно принимали корм и воду.

Результаты изучения хронической токсичности препарата «Ветгалофугинон» показали, что на протяжении всего опыта крысы опытных и контрольной групп охотно поедали корм и пили воду. По внешним признакам животные всех групп не отличались между собой: были подвижны, реагировали на внешние раздражители. Шерсть у всех крыс была гладкая, блестящая, кожный покров розового цвета без видимых повреждений, слизистые оболочки глаз влажные, блестящие, розового цвета.

В течение всего опыта не было случаев заболеваемости и гибели крыс всех четырех групп.

Результаты биохимического исследования сыворотки крови лабораторных животных в конце опыта приведены в таблице 1.

Таблица 1. – Биохимические показатели сыворотки крови опытных и контрольных крыс в конце опыта

Показатель	Группа			
	1	2	3	4 (контроль)
Общий белок, г/л	105,04±8,91	90,10±7,76*	107,14±6,62	117,80±3,60
Альбумин, г/л	48,24±4,42	41,66±3,32*	48,76±3,20	52,52±2,11
Амилаза, У/л	783,40±54,31	855,40±78,94	721,80±26,45	759,20±22,72
Аланинаминотрансфераза, У/л	51,12±17,19	33,14±14,99	43,80±16,45	39,34±15,09
Амилаза, У/л	783,40±54,31	855,40±78,94	721,80±26,45	759,20±22,72
Аспаргатаминотрансфераза, У/л	168,20±23,15	160,2±17,96	217,80±17,38	199,2±18,94
Билирубин прямой, мкмоль/л	16,29±3,95	15,67±2,82	17,45±6,10	22,4±3,79
Холестерин, ммоль/л	2,25±0,23	2,08±0,20	2,37±0,10	2,67±0,18
Триглицериды, ммоль/л	1,43±0,14*	2,59±0,94	2,50±0,59	2,97±0,49
Креатининкиназа, У/л	28,04±5,69	22,74±1,10*	22,89±5,41	28,44±2,58
Креатинин, мкмоль/л	72,86±1,56	69,16±3,03	70,96±2,06	72,64±1,77
Мочевая кислота, мкмоль/л	653,00±159,80	599,60±96,96	686,60±119,54	754,10±86,32
Глюкоза, ммоль/л	8,00±0,37	8,97±0,69	8,17±0,54	9,34±0,94
Лактатдегидрогеназа, ЕД/л	2867±351,60	2476,40±480,16	3253,20±270,41	3183,80±212,93
Натрий, ммоль/л	126,00±18,29	132,40±11,75	90,00±15,02	122,40±17,75
Кальций, ммоль/л	2,64±0,12	2,50±0,10	2,69±0,10	2,78±0,08
Магний, ммоль/л	1,15±0,04	1,04±0,08	1,21±0,08	1,24±0,07
Хлор, ммоль/л	118,60±4,74	146,60±33,64	119,20±5,54	120,0±2,10
Железо, мкмоль/л	137,14±33,04	99,9±23,11	148,50±31,52	162,40±16,61
Цинк, мкмоль/л	414,60±63,84	396,40±59,21	492,80±81,40	506,60±49,76

Примечание – *уровень значимости критерия достоверности по отношению к контрольной группе $P < 0,05$

Из таблицы 1 видно, что некоторые биохимические показатели (общий белок, альбумин, триглицериды и креатининкиназа) у лабораторных животных опытных групп в конце срока наблюдения достоверно отличались от аналогичных показателей контрольных крыс. На наш взгляд, сниже-

ние уровня общего белка за счет альбумина может свидетельствовать о гепатотоксическом действии испытуемого препарата.

Данные по динамике прироста массы тела опытных и контрольных крыс приведены в таблице 2.

Таблица 2. – Изменение массы тела опытных и контрольных крыс в течение опыта

Период опыта	Группа и масса крыс (г)			
	1	2	3	4 (контроль)
	M±m	M±m	M±m	M±m
Начало	198,40±3,08	191,20±4,56	175,50±5,20	214,00±4,20
10-й день	226,90±3,04	208,90±5,28	195,50±5,54	239,80±4,54
20-й день	249,20±3,49	226,80±5,70	209,70±6,42	264,00±5,22
30-й день	254,60±3,92	231,00±6,57	221,30±6,06	269,90±5,92
% к исходной массе тела	128,32	120,81	126,09	126,12

Данные таблицы 2 показывают, что в различные периоды эксперимента среди животных опытных и контрольной групп отмечены некоторые различия в темпах прироста массы тела. Тем не менее, у опытных крыс 1-й группы, получавших препарат в максимальной дозе (2250 мг/кг массы тела), на 30-й день опыта масса тела была несколько выше в сравнении с опытными животными 2-й и 3-й групп и лишь на 5,7 % ниже, чем в контрольной группе.

При этом процент прироста к исходной массе тела у опытных крыс 1-й группы оказался даже несколько выше, чем у контрольных животных.

При патологоанатомическом вскрытии трупов белых крыс опытных и контрольной групп каких-либо изменений во внутренних органах не обнаружено.

Значения весовых коэффициентов внутренних органов животных представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Влияние экспериментального препарата на весовые коэффициенты внутренних органов опытных и контрольных крыс

Орган	Группа			
	1	2	3	4 (контроль)
	M±m	M±m	M±m	M±m
	Весовые коэффициенты			
Печень	38,32±2,48	42,73±4,13	38,05±1,83	38,26±0,79
Селезенка	3,42±0,17	4,18±0,40	4,27±0,27	3,36±0,11
Легкие	9,14±0,95	11,32±1,55	10,02±1,67	9,80±1,14
Сердце	3,66±0,16	3,97±0,40	3,99±0,21	3,18±0,17
Почки	7,25±0,66	6,92±0,83	5,93±0,12	6,18±0,24

Проанализировав данные таблицы 3, можно заключить, что весовые коэффициенты внутренних органов крыс, подвергшихся хроническому воздействию сконструированным препаратом, находились в

пределах физиологической нормы и статистически не отличалась от данных контрольной группы.

Данные, характеризующие влияние препарата на кожу, приведены в таблице 4.

Таблица 4. – Результаты исследований по оценке функционального состояния кожи при изучении местного раздражающего действия препарата

№ кролика	Интенсивность эритемы	Оценка в баллах	Интенсивность отека, величина нарастания толщины кожной складки, мм	Оценка в баллах
1	отсутствие эритемы	0	отсутствие отека	0
2	отсутствие эритемы	0	отсутствие отека	0
3	отсутствие эритемы	0	отсутствие отека	0
4	отсутствие эритемы	0	отсутствие отека	0
среднегрупповой балл		0	среднегрупповой балл	0

Из данных, представленных в таблице 4, следует, что при однократных накожных аппликациях экспериментального образца препарата в дозе 20 мг/см³ на выстриженные участки кожи спины кроликов внешних признаков интоксикации не наблюдается. В области нанесения препарата кожа оставалась эластичной, естественной окраски. В течение всего периода наблюдений подопытные животные оставались активными, аппетит был сохранен.

В нижний конъюнктивальный мешок правого глаза кроликов однократно

вносили ветгалофугинон в нативном виде в количестве 100,0 мкл, а в левый глаз – по 2 капли дистиллированной воды. Визуальное наблюдение за состоянием слизистой проводили также в течение 2 недель, регистрируя при этом наличие слезотечения, блефароспазм, инъекцию сосудов, набухание век, выраженность симптомов и их длительность.

Данные о влиянии экспериментального препарата на слизистые оболочки глаз приведены в таблице 5.

Таблица 5. – Результаты изучения оценки раздражающего действия препарата на слизистые оболочки глаз по степени выраженности симптомов

Симптомы повреждения	Характеристика выраженности симптомов	Оценка в баллах
Гиперемия конъюнктивы роговицы	отсутствует	0
Отек век	отсутствует	0
Выделения из глаза	отсутствуют	0
Среднегрупповой балл		0

Анализ данных, представленных в таблице 5, показывает, что однократное внесение в конъюнктивальный свод глаз кроликов 100,0 мкл препарата в нативном виде не вызывает изменений со стороны органа зрения и слизистых оболочек.

Анализ результатов опыта на морских свинках по изучению аллергизирующего действия показал, что испытуемый образец созданного препарата при многократной его аппликации на кожу не обладает аллергенной способностью.

ВЫВОДЫ

1. Среднесмертельная доза экспериментального образца ветеринарного препарата на основе галофугинона лактата при внутрижелудочном введении белым крысам составляет 22500 мг/кг массы тела.

2. Согласно ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности» созданный

экспериментальный образец препарата относится к 4-му классу опасности (вещества малоопасные).

3. Внутрижелудочное введение ветгалофугинона белым крысам в течение 30 дней в дозах 1/10, 1/20 и 1/50 от ЛД₅₀ не оказывает существенного влияния на клиническое состояние лабораторных животных, не нарушает обмен веществ, не вызывает патологоанатомических изменений во внутренних органах и не влияет на их весовые коэффициенты.

4. По классификации выраженности раздражающих кожу свойств экспериментальный образец ветеринарного препарата на основе производного хиназолинона относится к первому классу (раздражающее действие отсутствует). Он также не оказывает повреждающего действия на слизистые оболочки и орган зрения.

5. Аллергизирующего действия у ветгалофугинона не выявлено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии / А. Э. Высоцкий [и др.]. – Минск, 2007. – 156 с.
2. Пахноцкая, О. П. Криптоспоридиоз телят (патогенез, иммуноморфогенез, разработка и эффективность нового иммуностимулирующего препарата «Янсевит») : автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук : 03.02.11 : Паразитология / О. П. Пахноцкая // Нац. акад. наук Беларуси, РУП «Ин-т экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского». – Минск, 2016. – 24 с.
3. Рекомендации по применению новых лекарственных средств растительного и химического происхождения при гельминтозах и протозоозах мелких жвачных : рекомендации / А. И. Ятусевич [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2017. – 28 с.
4. Руководство по ветеринарной паразитологии / А. И. Ятусевич [и др.]; под ред. В. Ф. Галата, А. И. Ятусевича. – Минск : ИВЦ Минфина, 2015. – 411 с.
5. Шахов, А. Г. Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях / А. Г. Шахов // Ветеринарная патология. – 2003. – № 2. – С. 6–7.
6. Якубовский, М. В. Показатели гуморального иммунитета у телят при криптоспориidioзе / М. В. Якубовский, О. П. Пепеляева // Российский паразитологический журнал. – 2014. – № 4. – С. 44–48.
7. Якубовский, М. В. Криптоспоридиоз животных и его профилактика / М. В. Якубовский, Т. Я. Мяцова, С. И. Лавор // Весці Акадэміі навук БССР. Серыя с.-г. навук. – Минск : Навука. – 1991. – № 2. – С. 116–121.
8. Якубовский, М. В. Криптоспоридиоз в Республике Беларусь / М. В. Якубовский, Г. Н. Чистенко // Здравоохранение Беларуси. – 1993. – № 3. – С. 34–38.

УДК 614.9:637.11

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-1-75-81>

Кажеко О.А., кандидат сельскохозяйственных наук, доцент¹

Барановский М.В., доктор сельскохозяйственных наук, профессор¹

Музыка А.А., кандидат сельскохозяйственных наук, доцент¹

Высоцкий А.Э., кандидат ветеринарных наук, доцент²

¹РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», г. Жодино

²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск

К ВОПРОСУ О САНИТАРНОМ СОСТОЯНИИ МОЛОКОПРОВОДЯЩЕЙ СИСТЕМЫ ДОИЛЬНЫХ УСТАНОВОК

Резюме

В статье отражён обзорный материал об уровне контаминации микробными клетками молокопроводящих участков транспортной системы доильных установок типа 2АДС-Н (молокопровод), «Карусель», «Ёлочка» и «Параллель».

Отмечены различия в уровне бактериальной обсеменённости поверхностей узлов и деталей, контактирующих с молоком, в зависимости от объёмно-конструктивных особенностей и вида материалов, используемых для их изготовления. Выявлены критические пределы контаминации, позволяющие своевременно предпринимать корректирующие действия по нивелированию потенциально опасных биологических рисков в соответствии с принципами HACCP.

Указано на необходимость исследований микробной загрязнённости молочных шлангов по перекачке молока из доильного зала в танк-охладитель и из танка-охладителя в молоковоз, а также корректировки режимов санитарной обработки данных видов изделий.

Ключевые слова: доильные установки 2АДС-Н (молокопровод), «Ёлочка», «Параллель», «Карусель», узлы и детали, молокопровод, внутренняя поверхность, смывы, бактериальная обсеменённость, критические пределы контаминации.

Summary

The article contains a review material on the level of microbial contamination of the milk-carrying sections of the transport system of the 2ADS-N (milk pipeline), Merry-go-round, Herringbone and Parallel milking plants.

The differences in the level of bacterial contamination of the surfaces of components and parts in contact with milk, depending on the volume and structural features and types of materials used for their production, have been noted. The critical contamination limits have been identified that allow taking timely corrective actions to mitigate potentially dangerous biological risks in accordance with the HACCP principles.

It is indicated on the necessity of investigation of microbial contamination of milk hoses for pumping milk from the milking parlor to the cooling tank and milk hoses for pumping milk from the cooling tank to the milk delivery truck, as well as the correction of sanitary treatment regimes for these types of products.

Keywords: 2ADS-N (milk pipeline), Merry-go-round, Herringbone and Parallel milking plants, components and parts, milk pipeline, internal surface, rinse sampling, microbial contamination, critical contamination limits.

Поступила в редакцию 10.03.2022 г.

Молоко является исключительно ценным пищевым продуктом, который имеет огромное значение в питании человека. Молоко и молочные продукты содержат весь спектр питательных веществ, в том числе и незаменимых, необходимых человеку для жизни.

Санитарно-гигиеническое качество произведённого молока – комплексная проблема, определяемая рядом факторов. Доминирующим фактором, оказывающим влияние на качество молока, является санитарно-гигиеническое состояние доильного оборудования, на поверхности кото-

рого находится до 90 % всех видов загрязнений [1, 2, 3].

Обеспечить удовлетворительное санитарно-гигиеническое состояние доильных установок представляется крайне затруднительным. Большое количество стыков между трубами молокопроводов, их малый диаметр, удаленность молокоприемника от доильных аппаратов в цепи транспортирования молока, резкие изгибы профиля молокопровода, применение пластиковых и резиновых соединительных труб в этих местах, доступ воздуха в замкнутую систему доения и транспортировки сырья, недостаточный объем приемной камеры коллектора, сильное гидродинамическое воздействие на молоко в процессе транспортировки по молокопроводу, отсутствие автомата промывки охлаждающего танка и многие другие факторы способствуют интенсивному образованию трудноудаляемых липидо-протеиновых загрязнений.

При образовании загрязнений на поверхности молочного оборудования во время доения коров особенно важную роль играют микроструктурные изменения молока, возникающие в результате воздействия на него разных механических и физических факторов. Совместное движение молока и разреженного воздушного потока в молокопроводе при доении приводит к образованию воздушно-молочной эмульсии и обуславливает возникновение сильно развитой поверхности раздела фаз (плазма – жировые шарики и плазма – воздух), что, в свою очередь, вызывает перераспределение концентрации белково-липоидной оболочки в пограничных слоях контактирующих фаз.

При столкновении частиц часть поверхностно-активной оболочки в результате механических факторов и перепада вакуума разрушается и переходит с жировых шариков на поверхность воздушного пузырька. Соли кальция, входящие в состав молока и промывочных жидкостей, создают армирующий скелет высокой прочности и закрепляют загрязнения на поверхности оборудования, образуя твердые отложения в виде «молочного камня».

По химической структуре липидо-протеиновые загрязнения на внутренних поверхностях доильно-молочного оборудования наиболее близки к сливочному маслу, отличаясь от него большим содержанием белка и сахара, и являются хорошей средой для развития микроорганизмов. Так, молочнокислые бактерии на подобных средах удваивают свою численность в среднем за 40 мин, бактерии группы кишечной палочки – за 20 мин при 30 °С. Это значит, что в идеальных условиях в период между дойками (9 часов при двукратном доении) численность микрофлоры возрастет в 214 раз. Таким образом, бактерии, остающиеся после дезинфекции в количестве 2 %, даже с учетом снижения жизнеспособности в среде липидо-протеиновых загрязнений могут восстановить свою численность приблизительно за 3,5 часа. Единственная возможность предотвращения столь сильной контаминации молока при доении заключается в снижении интенсивности размножения микрофлоры за счет эффективной очистки доильно-молочного оборудования от липидо-протеиновых загрязнений и, следовательно, лишения микроорганизмов питательной среды.

Все загрязнения, встречающиеся на машинах и оборудовании при доении, с учетом возможных способов очистки и дезинфекции можно разделить на три группы: адгезионные (в виде остатков молока и устойчивых частиц молочного жира); поверхностно-адсорбционно связанные (в виде макрочастиц, белково-жирового комплекса и гелеобразных отложений) и прочно связанные (в виде «молочного камня»).

Для удаления адгезионных загрязнений достаточно незначительного воздействия теплой водяной струи или потока на очищаемую поверхность, так как в этом случае нет действительного прилипания, а имеет место лишь тесное соприкосновение загрязнений с поверхностью либо с загрязнениями другого вида. На практике очистка загрязнений данного вида осуществляется промыванием молокопровода и до-

ильной посуды теплой водой (30 ± 5 °С) для удаления видимых остатков молока. Применение воды повышенной температуры для этой операции недопустимо, так как ведет к структурным изменениям компонентов молока и влечет за собой прилипание жировых частиц к поверхности. В то же время понижение температуры воды снижает эффективность данной операции.

Основная масса загрязнений молочного оборудования представлена второй группой. Эти загрязнения образуются в результате физико-механического воздействия на молоко при доении и транспортировке. Их макромолекулярный слой, содержащий нестабилизированный молочный жир, активно адсорбируется твердой поверхностью и не удаляется водой. Для разрыва внешних ионных связей необходимо применение более химически активных соединений, называемых высокоэффективными моющими средствами. Такие средства представляют собой композиции, включающие обычно около пяти компонентов, сочетание которых обуславливает проявление умягчающего, пенообразующего, рН-регулирующего, стабилизирующего, антикоррозионного, очищающего, бактерицидного и других действий.

На практике от загрязнений второй группы освобождаются при промывании замкнутой технологической системы и молочной посуды горячим раствором (60 ± 5 °С) моющего средства концентрацией 0,3–1,0 % в течение 10–15 мин в зависимости от вида применяемого средства.

При систематическом несоблюдении правил очистки и использовании низкоэффективных моющих средств на основе липидо-протеиновых и гелеобразных загрязнений второй группы образуется прочный минеральный армирующий скелет – «молочный камень», относящийся к третьей группе. Удалить его можно только путем химического разрушения агрессивными средами (обычно растворами кислот). Эта операция губительно сказывается на оборудовании, поэтому во всем мире предпочитают метод профилактики образования «молочного камня» путем поперемен-

ного использования щелочных и кислотных моющих средств [4, 5].

Исследованиями последних лет были изучены уровни контаминации микроорганизмами внутренних (рабочих) поверхностей доильно-молочного оборудования молочно-товарных ферм и комплексов Республики Беларусь, где сбор молока и его транспортировка осуществляется посредством либо длинного (привязное содержание коров), либо короткого молокопровода (беспривязно-боксовое содержание коров). Установлено, что узлы и детали доильной установки типа 2АДС-Н (доение в длинный молокопровод), составляющие единую молокопроводящую систему доильно-молочного оборудования, имели различный уровень контаминации микроорганизмами. Так, на 1 см^2 внутренних поверхностей стенки танка-охладителя молока, колбы молокоопорожнителя, силиконового соскового чулка, металлического корпуса и молокосорной камеры коллектора содержалось $2,0 \pm 1,4$; $9,6 \pm 1,7$; $48,0 \pm 5,8$; $14,6 \pm 1,4$; $24,8 \pm 1,4$ колониеобразующих единиц (КОЕ) соответственно, что свидетельствовало о невысоком уровне бактериальной обсемененности данных узлов и деталей и указывало на их хорошее санитарно-гигиеническое состояние. Средний уровень контаминации микробными клетками установлен на рабочих поверхностях молокоприёмника, секции дозатора и молочного насоса для перекачки молока из молокоопорожнителя в танк-охладитель, где на 1 см^2 содержалось от 30 до 52 и от 45 до 60 колоний мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) соответственно. Значение показателя КОЕ (количество колониеобразующих единиц на 1 см^2) в среднем за период исследований составило $38,8 \pm 3,9$ и $52,0 \pm 2,5$ на 1 см^2 . Высокий уровень контаминации микробами отмечался на поверхностях крана для подключения доильного аппарата к молокопроводу – $160,4 \pm 18,8$ КОЕ/ см^2 и сливного крана танка-охладителя молока – $160,4 \pm 18,8$ – $204,0 \pm 11,8$ КОЕ/ см^2 , а также на поверхностях молочного ПВХ шланга доильного аппарата –

от 110 до 250 колониеобразующих единиц на 1 см² (в среднем 173,0±24,9), что превышало предельный уровень бактериальной загрязнённости доильно-молочного оборудования, регламентированный действующими Ветеринарно-санитарными правилами для молочно-товарных ферм и сельскохозяйственных организаций, личных подсобных и крестьянских (фермерских) хозяйств по производству молока (2005 г.), в среднем на 60,4 и 104,0 КОЕ/см², также на 66,6 и 73,3 КОЕ/см². Критический уровень микробного загрязнения был установлен на поверхности транспортного молокопровода доильной установки – 438,4±95,9 КОЕ/см². Установлено, что 63,7 % молока, произведённого на доильной установке типа 2АДС-Н (молокопровод) в условиях молочно-товарной фермы «Берёзовица» РДУП «ЖодиноАгроПлемЭлита», по показателю бактериальной обсеменённости не соответствовало требованиям к сорту «Экстра» (СТБ 1598-2006); 14,9 % – по содержанию соматических клеток; 21,4 % – по бактериальной обсеменённости и содержанию соматических клеток одновременно. Основной причиной несоответствия явился высокий уровень бактериальной обсеменённости сборного молока, при котором общее количество микроорганизмов в 1 см³ находилось в диапазоне от 300 до 400 тыс. включительно, что в 1,2–1,9 раза превосходило среднее значение данного показателя проб молока общего удоя [6, 7, 8].

Молокопроводящие пути узлов и деталей доильных установок типа «Ёлочка» и «Параллель» также были неодинаково контаминированы микроорганизмами. Меньше всего контаминации микробными клетками подвергались танк-охладитель, счётчик индивидуального учёта молока, молокопровод и сливной кран танка-охладителя молока доильной установки «Ёлочка» 2×10, а также молокосборная камера коллектора, внутренняя стенка танка-охладителя и счётчик индивидуального учёта молока доильной установки «Параллель» 2×17, на 1 см² рабочей поверхности которых содержалось, соответственно, 10–

20; 20–40; 40–60; 40–100 и 10–40; 20–40; 20–30 колоний мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. Установлено, что содержание КОЕ на 1 см² внутренней поверхности молочного насоса и молокосборной камеры коллектора доильной установки «Ёлочка» 2×10, а также сосковой резины, молочного насоса и молокопровода доильного зала «Параллель» 2×17, соответственно, на 220; 320 и 150; 520; 150 КМАФАНМ превысило нормативные требования «Ветеринарно-санитарных правил для молочно-товарных ферм и сельскохозяйственных организаций, личных подсобных и крестьянских (фермерских) хозяйств по производству молока», 2005 г., предъявляемые к качеству санитарного состояния доильных установок. Установлено, что на 1 см² внутренней поверхности молочного шланга доильного аппарата доильной установки «Ёлочка» 2×10 содержалось до 1400 колоний мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, что указывало на предельно критический уровень контаминации данного участка молокопроводящей системы. Критический предел контаминации микроорганизмами установлен на внутренней поверхности молочного шланга доильного аппарата доильной установки «Параллель» 2×17, где содержалось до 1100–1300 КОЕ/см². Количество микроорганизмов в пробах сборного молока за период исследований составило в среднем 121±27 тыс./см³ (доильная установка «Ёлочка») и 218±52 тыс./см³ (доильная установка «Параллель»), что на 21 и 118 тыс./см³ соответственно превысило требования СТБ 1598-2006 «Молоко коровье. Требования при закупках» (изменённая редакция, измен. № 3), предъявляемые к сорту «Экстра» по показателю общей бактериальной обсеменённости [9, 10, 11, 12].

Установлено, что узлы и детали доильной установки «Карусель» модификации Auto Rotor Per Former «Westfalia Surge» (доение в короткий молокопровод), как и в предыдущих случаях, в процессе эксплуатации были в разной степени кон-

таминированы микроорганизмами. Так, меньше всего контаминации микробными клетками подвергались стенка танка-охладителя молока, клапан молочного крана холодильника, сосковая резина (силиконовая), корпус фильтра для очистки молока от механических примесей, а также штуцер сливного крана танка-охладителя молока, на 1 см² рабочей поверхности которых среднее содержание колоний мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов составило 9; 11; 28; 51; 66 единиц соответственно. Стабильно высокий уровень контаминации микробными клетками установлен для внутренних поверхностей молочной камеры коллектора – 129±27; колбы молокоприёмника – 171±43; молокопровода – 193±37, корпуса молочного насоса – 516±52 КОЕ/см², что, соответственно, на 29; 71; 93 и 416 единиц превысило нормативные требования вышеуказанных ветеринарно-санитарных правил, предъявляемые к качеству санитарного состояния доильных установок (до 100 КОЕ/см²). Критически высокий уровень контаминации микроорганизмами наблюдался на внутренней поверхности молочного шланга доильного аппарата, обладающего достаточно значительной протяжённостью поверхности, контактирующей с молоком в процессе доения и оказывающей существенное влияние на санитарно-гигиеническое состояние получаемого молока – 710±79 КОЕ/см² (в 7 раз выше норматива) [13, 14, 15].

Молокопроводящая система доильных установок состоит из узлов и деталей, изготовленных из разных материалов. Так, сосковый чулок доильного аппарата изготовлен из нитрильной резины и силикона, молочный шланг доильного аппарата – из полиэтилена, коллектор (верхняя часть) – из нержавеющей стали, нижняя часть (молочосборная камера) – из полистирола, молокопровод – из нержавеющей стали, кран для подключения доильного аппарата к молокопроводу – из пластмассы, молокоопорожнитель – из стекла. Молочные шланги для перекачки молока из молоко-

опорожнителя в холодильник, а из него – в молоковоз изготовлены из пищевого полиэтилена. Кроме того, узлы и детали доильных установок характеризуются определёнными объёмно-конструктивными особенностями, что оказывает определённое влияние на контаминацию микробами поверхностей, контактирующих с молоком в процессе дойки.

Исследования [16, 17] показали, что меньше всего контаминации микробными клетками подвергался полистирол и стекло, на 1 см² внутренней поверхности которых среднее содержание колоний мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов составило 2,67 и 8,3 соответственно.

Высокие антиадгезивные свойства полистирола и стекла, а также наличие в составе стекла кремния, который обладает бактерицидными качествами, способствовали поддержанию хорошего гигиенического состояния узлов и деталей молокопродящих путей, изготовленных из данных материалов, при котором содержание микробных клеток на 1 см² поверхности не превышало установленного уровня (до 100 микробных клеток при отсутствии в смывах кишечной палочки). Средний уровень контаминации наблюдался на поверхностях из силикона и пластмассы, характеризующихся содержанием, соответственно, от 40 до 130 и от 80 до 170 КМАФАнМ на 1 см². При этом среднее значение показателя КОЕ составило 86,6±15,8 и 138,0±15,9 соответственно. Высокий уровень бактериальной обсемененности установлен на поверхности изделий из нержавеющей стали (от 180 до 500 КМАФАнМ на 1 см²). Следует отметить, что детали и узлы доильной установки, изготовленные из нержавеющей стали, были неодинаково контаминированы микробами. Так, на 1 см² внутренней поверхности молочного патрубка коллектора содержалось всего 30 колоний мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, в то время как на поверхности молочного крана холодильника, контактирующей с молоком в процессе дойки, – 220 КМАФАнМ.

Наиболее высокий уровень контаминации микробами наблюдался на поверхностях изделий из полиэтилена и нитрильной резины: показатель КОЕ находился в пределах от 500 до 3000 и от 2000 до 7000 соответственно. При таком уровне микробной загрязнённости санитарное состояние молокопроводящих участков доильно-молочного оборудования из полиэтилена и нитрильной резины согласно вышеуказанным ветеринарно-санитарным правилам может быть оценено как неудовлетворительное.

Узлы и детали доильных установок характеризуются определёнными объёмно-конструктивными особенностями, что оказывает влияние на контаминацию микробами поверхностей, контактирующих с молоком в процессе дойки [15, 18]. Из представленных узлов доильной установки «Карусель» более сложную конструкцию имеют молочный насос и коллектор доильного аппарата, снабженный шарообразными клапанами для предотвращения смачивания кончиков сосков и, как следствие, перезаражения маститом здоровых долей вымени. Самую большую протяженность и объем имеют молокопровод и ёмкость танка-охладителя молока, а молокосорная камера коллектора и молочный шланг во время пересменки коров на площадке находятся без молока. Учитывая то, что данная доильная установка укомплектована 40 единицами доильных аппаратов, а каждый из них имеет свой молочный шланг, то объём контактирующей поверхности с молоком значительный. Поэтому данный узел может существенно влиять на санитарно-гигиенические показатели производимого молока. Все вышеперечисленные узлы после каждой дойки подвергаются циркуляционной мойке и один раз в неделю – механической чистке специальными ершами.

Характерной особенностью эксплуатации молочных шлангов для перекачки молока из молокоопорожнителя в танк-охладитель и молочных шлангов для перекачки молока из танка-охладителя в молоковоз в контексте рассматриваемого во-

проса является то, что, обладая большой длиной и площадью сечения, а следовательно, большой поверхностью, контактирующей с молоком в процессе его производства, санитарное состояние данных участков молокопроводящей системы оказывает существенное влияние на уровень бактериальной загрязнённости молока.

Во-вторых, из рассматриваемых молочных шлангов – для перекачки молока из доильного зала в танк-охладитель, а из него – в цистерну молоковоза – последние не включены в систему циркуляционной мойки доильно-молочного оборудования, предполагающую автоматический режим мойки и дезинфекции с дозированной подачей моюще-дезинфицирующего концентрата при соответствующей температуре и продолжительности использования, способную обеспечить удовлетворительное санитарно-гигиеническое состояние внутренних (рабочих) поверхностей при качественной санитарной обработке.

В то же время в доступной нам литературе не обнаружено данных, свидетельствующих об уровне микробного загрязнения внутренних (рабочих) поверхностей молочных шлангов для перекачки молока из молокоопорожнителя в танк-охладитель и молочного шланга для перекачки молока из танка-охладителя в молоковоз, изготовленных из различных видов материалов, а также данных о динамике санитарного состояния молочного шланга для перекачки молока из доильного зала в танк-охладитель и из него – в цистерну в период между последоильной обработкой и до очередного доения. Не изучено влияние длины молочных шлангов на механическую загрязнённость, бактериальную обсеменённость, общую (титруемую) кислотность, содержание соматических клеток в молоке.

Усилия, направленные на решение обозначенных задач, будут способствовать усовершенствованию технологических процессов и элементов последоильной обработки транспортных молокопроводящих путей, обеспечивающих существенное повышение санитарного качества сырья при производстве молока.

ЛИТЕРАТУРА

1. Битюков, В. Источники бактериальной загрязнённости молока на молочно-товарных фермах / В. Битюков // Труды Кубанского СХИ. – 1977. – Вып. 140. – С. 41–52.
2. Герцен, Е. И. Условия производства молока высокого качества / Е. И. Герцен, Г. Н. Дюрнич // Производство молока. – М. : Колос, 1972. – С. 259–264.
3. Дюрнич, Г. Н. Чистота доильных установок – главный фактор, определяющий санитарное качество молока / Г. Н. Дюрнич // Науч.-техн. бюл. НИИ животноводства Лесостепи и Полесья УССР. – 1975. – № 4. – С. 32–35.
4. Дегтерёв, Г. П. Механизм очистки загрязнённых поверхностей молочного оборудования / Г. П. Дегтерёв // Молочная промышленность. – 1999. – № 7.
5. Дегтерёв, Г. П. Образование загрязнений на молочном оборудовании и средства для их удаления / Г. П. Дегтерёв // Техника и оборудование для села. – 1999. – № 5.
6. Барановский, М. В. Бактериальная обсеменённость и санитарно-гигиеническое состояние молокопроводящих путей доильной установки 2АДСН / М. В. Барановский, О. А. Кажеко, А. С. Курак // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. – Жодино, 2017. – Т. 52, ч. 2 : Технология кормов и кормления, продуктивность. Технология производства, зоогигиена, содержание. – С. 81–89.
7. Барановский, М. В. Контаминация микробными клетками основных узлов доильной установки 2АДСН и влияние на санитарное качество молока / М. В. Барановский, О. А. Кажеко, А. С. Курак // Актуальні питання технології продукції тваринництва : зб. ст. за результатами II Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції, 26–27 жовтня 2017 року. – Полтава, 2017. – С. 152–158.
8. Барановский, М. В. Бактериальная обсеменённость доильной установки 2АДСН и влияние на санитарно-гигиеническое состояние молока / М. В. Барановский, О. А. Кажеко, А. С. Курак // Приоритетные и инновационные технологии в животноводстве – основа модернизации агропромышленного комплекса России : сб. науч. ст. по материалам Междунар. науч.-практ. конф. науч. сотр. и преподавателей, г. Ставрополь, 22 декабря 2017 г. – Ставрополь, 2018. – С. 93–97.
9. Барановский, М. В. Бактериальная обсеменённость молокопроводящих путей узлов и деталей при доении коров на доильной установке типа «Ёлочка» и «Параллель» / М. В. Барановский, О. А. Кажеко, А. С. Курак // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. – Жодино, 2018. – Т. 53, ч. 2 : Технология кормов и кормления, продуктивность. Технология производства, зоогигиена, содержание. – С. 117–126.
10. К вопросу о бактериальной загрязнённости доильных установок / М. В. Барановский [и др.] // Современное состояние животноводства: проблемы и пути их решения : сб. материалов Междунар. науч.-практ. конф., г. Саратов, 21–23 марта 2018 г. – Саратов, 2018. – С. 101–102.
11. Качество молока, производимого на доильной установке «Ёлочка» и «Параллель», в зависимости от уровня контаминации основных узлов и деталей / О. А. Кажеко [и др.] // Современные технологии сельскохозяйственного производства: сб. науч. ст. по материалам XXI Междунар. науч.-практ. конф., 18 мая 2018 г. – Вып. : Ветеринария. Зоотехния. – Гродно : ГГАУ, 2018. – С. 144–147.
12. Барановский, М. В. Уровень контаминации микробными клетками молокопроводящих поверхностей в зависимости от объёмно-конструктивных особенностей доильных установок / М. В. Барановский, О. А. Кажеко, А. С. Курак // Животноводство и ветеринарная медицина. – Горки, 2018. – № 4. – С. 12–16.
13. Мониторинг санитарного состояния доильной установки «Карусель» и санитарно-гигиенические показатели молока при его производстве / М. В. Барановский [и др.] // Современные технологии сельскохозяйственного производства : сб. науч. ст. по материалам XXII Междунар. науч.-практ. конф., г. Гродно, 16 мая, 13 июня 2019 г. – Вып. : Ветеринария. Зоотехния. – Гродно : ГГАУ, 2019. – С. 107–109.
14. Доильная установка «Карусель» и степень бактериальной загрязнённости рабочих поверхностей основных узлов и деталей / О. А. Кажеко [и др.] // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сб. науч. тр. – Гродно : ГГАУ, 2019. – Т. 44 : Зоотехния. – С. 71–82.
15. Уровень бактериальной обсеменённости молокопроводящих путей узлов и деталей доильных установок в зависимости от их объёмно-конструктивных особенностей / М. В. Барановский [и др.] // Зоотехническая наука Беларуси: сб. науч. тр., посвящ. 70-летию со дня основания Научно-практического центра Национальной академии наук Беларуси по животноводству – Жодино, 2019. – Т. 54, ч. 2 : Технология кормов и кормления, продуктивность. Технология производства, зоогигиена, содержание. – С. 121–133.
16. Кажеко, О. А. Бактериальная обсеменённость рабочих поверхностей доильно-молочного оборудования из различных видов материалов и мониторинг качества молока / О. А. Кажеко, М. В. Барановский, А. С. Курак // Вісник Сумського національного аграрного університету (Серія «Тваринництво»). – 2017. – Вып. 7 (33). – С. 170–176.
17. Уровень контаминации микроорганизмами доильно-молочного оборудования в зависимости от различных материалов, используемых для его изготовления / М. В. Барановский [и др.] // Современные технологии сельскохозяйственного производства: сб. науч. ст. по материалам XX Междунар. науч.-практ. конф., г. Гродно, 19, 11 мая 2017 г. – Вып. : Ветеринария. Зоотехния. – Гродно : ГГАУ, 2017. – С. 117–119.
18. Барановский, М. В. Уровень контаминации микробными клетками молокопроводящих поверхностей в зависимости от объёмно-конструктивных особенностей доильных установок / М. В. Барановский, О. А. Кажеко, А. С. Курак // Животноводство и ветеринарная медицина. – Горки, 2018. – № 4. – С. 12–16.



МЕЖДУНАРОДНАЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ВЫСТАВКА «БЕЛАГРО-2022»

В рамках Белорусской агропромышленной недели с 7 по 11 июня 2022 г. на площадке выставочного центра Китайско-Белорусского индустриального парка «Великий Камень» прошла Международная специализированная выставка «БЕЛАГРО-2022».

Этот аграрный форум традиционно собирает вместе не только белорусских аграриев и работников пищевой и перерабатывающей промышленности, но и их зарубежных коллег и партнеров. Участие в выставке приняли более 400 компаний Республики Беларусь и Российской Федерации.

Коллективные экспозиции сформировали Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Министерство промышленности, Национальная академия наук Беларуси, концерн «Белгоспищепром», Белкоопсоюз, все области Республики Беларусь.

Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского, входящий в состав Научно-практического центра НАН Беларуси по животноводству, широко представил свою экспозицию, включающую макеты вакцин для профилактики и лечения вирусных и бактериальных инфекций сельскохозяйственных животных, противопаразитарных, лечебно-профилактических препаратов и стимуляторов иммунной системы, дезинфицирующих средств и диагностикумов: вакцина «Респивак» для профилактики пастереллёза крупного рогатого скота, вакцина инактивированная для профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и пастереллёза крупного рогатого скота «БелВироПаст», вакцина инактивированная эмульгированная для профилактики пастереллеза крупного рогатого скота «ПНЕВМОБАКТ-L», вакцина ассоциированная против пастереллёза, гемофильного полисерозита и актинобациллярной плевропневмонии свиней «РЕСПИС-ПГА», вакцина живая для профилактики миксоматоза кроликов «БелМиксоВак», эффективные и безопасные препараты, в состав которых входят пробиотики, пребиотики, наночастицы и др. Были продемонстрированы



последние разработки ученых института с пометкой «Новинка»: вакцина для профилактики пастереллеза, бордетеллеоза и миксоматоза кроликов «Респимикс», вакцина инактивированная для профилактики рота- и коронавирусной инфекции, вирусной диареи и колибактериоза крупного рогатого скота «ВироКолиВак», вакцина «Колитокс-ЛТ» инактивированная эмульгированная для профилактики колибактериоза (эшерихиоза) и клебсиеллеза крупного рогатого скота, ветеринарные препараты «Талпан», «Микровит», «Трикламизол» и др.

У посетителей экспозиции была возможность получить квалифицированные консультации специалистов института. Гости могли ознакомиться с основными направлениями деятельности нашей организации, представленными в видеоролике и презентации об институте.



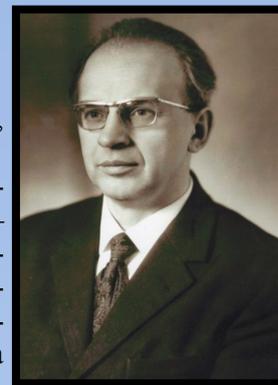
К выставке были оформлены новые стенды «Комплексная система профилактики и лечения болезней копыт крупного рогатого скота» и «Инновационные противопаразитарные препараты», представлена промомпродукция с логотипом института, а также печатные материалы: каталог производимых вакцин и препаратов, рекламные брошюры, буклеты, научно-практические журналы, флаеры.

Посетить экспозицию института гостей приглашала забавная ростовая кукла Корова. Большой интерес вызвал демонстрационный улей, предоставленный лабораторией болезней пчел.

По итогам выставки Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского был удостоен диплома 1-й степени Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь за активное участие в 32-й Международной специализированной выставке «БЕЛАГРО-2022», а также диплома ЗАО «МинскЭкспо» за многолетнее плодотворное сотрудничество, активное участие в 32-й Международной специализированной выставке «БЕЛАГРО-2022» и комплексное представление на коллективной экспозиции новейших научных разработок для агропромышленного производства страны.

Красочное оформление экспозиций, презентации и дегустации продукции, ярмарка-продажа и выступления творческих коллективов сделали выставку ярким, запоминающимся праздником для всех посетителей.

ПАМЯТИ БОГУША АЛЕКСАНДРА АЛЕКСАНДРОВИЧА (1931–2022 гг.)



21.04.2022 г. ушел из жизни ветеран института, доктор ветеринарных наук, профессор Богуш Александр Александрович.

А.А. Богуш родился 18 февраля 1931 г. в г.п. Кореличи Гродненской области в семье крестьян. В 1948 г. окончил Кореличскую среднюю школу, в 1953 г. – с отличием Витебский ветеринарный институт, затем работал заведующим ветеринарной лечебницей в г.п. Любча Гродненской области и старшим ветеринарным врачом Любчанской машинно-тракторной станции. В 1961 г. поступил в аспирантуру Белорусского научно-исследовательского ветеринарного института (БелНИВИ). Научным руководителем был академик Х.С. Горегляд. В 1964–1965 гг. работал младшим научным сотрудником в отделе ветеринарной санитарии и болезней рыб, в 1966–1970 гг. – старшим научным сотрудником, в 1971–2002 гг. – заведующим отделом, с 2002 по 2015 гг. – главным научным сотрудником. Защита докторской диссертации состоялась в 1983 г., присуждение ученого звания профессора – в 1991 г. Звание почетного профессора Витебской ордена «Знак Почета» государственной академии ветеринарной медицины присвоено в 2003 г.

Александр Александрович отличался необычным трудолюбием, требовательностью к себе, глубокими знаниями научных проблем в области ветеринарной санитарии и ветеринарно-санитарной экспертизы. За годы трудовой деятельности и при его участии выполнен ряд фундаментальных и прикладных работ, оказавших существенное влияние на развитие этих направлений ветеринарной науки.

А.А. Богуш подготовил 12 кандидатов наук, опубликовал 338 научных работ, в том числе 10 книг. В соавторстве им создано 69 нормативных документов. С его непосредственным участием разработано и освоено производство 16 ветеринарных препаратов и получено 12 патентов на изобретения. В течение 16 лет являлся членом высших аттестационных комиссий СССР, России и Беларуси.

Александр Александрович всегда будет для нас ярким примером безграничной преданности профессии ученого.

ПАМЯТИ ЯСТРЕБОВА АСКАЛОНА СЕРГЕЕВИЧА (1937–2022 гг.)



29 апреля 2022 г. коллектив РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского» понес невосполнимую утрату – ушел из жизни доктор ветеринарных наук, доцент, главный научный сотрудник отдела вирусных инфекций Ястребов Аскалон Сергеевич.

Аскалон Сергеевич родился 25 апреля 1937 г. в д. Коптевка Дрибинского района Могилевской области в семье крестьян. В 1955 г. после окончания средней школы поступил в Витебский ветеринарный институт, который окончил в 1960 г. Работал в должности главного ветеринарного врача совхоза «Мишневичи» Шумилинского района Витебской области, затем – заместителем главного ветеринарного врача Шумилинской райветстанции, главным ветеринарным врачом колхоза «Россия» Толочинского района Витебской области. В 1972 г. поступил в аспирантуру Белорусского научно-исследовательского ветеринарного института, которую успешно окончил в 1975 г., защитил кандидатскую диссертацию, а в 1999 г. – докторскую диссертацию на тему «Вирусные гастроэнтериты свиней (распространение, диагностика и специфическая профилактика)». Работая в институте с 1975 г., прошел все ступени – от младшего до главного научного сотрудника, был заведующим лабораторией болезней свиней.

Всю свою трудовую деятельность Аскалон Сергеевич посвятил проблемам вирусных инфекций свиней. Им разработано множество вакцин, тест-систем, которые внедрены в ветеринарную практику и позволили сократить потери в свиноводческих хозяйствах Республики Беларусь. Постоянно оказывал хозяйствам научно-практическую помощь по выяснению причин заболеваемости и падежа свиней, постановке диагноза заболеваний и разработке мероприятий по их ликвидации и профилактике.

А.С. Ястребовым опубликовано более 120 научных работ, в том числе 4 монографии, получено 4 патента, подготовлены и утверждены технические научно-правовые акты на ветеринарные препараты – вакцины, сыворотки, диагностикумы.

Мы будем помнить Аскалона Сергеевича Ястребова как глубоко интеллигентного, отзывчивого, необычайно деятельного человека и талантливого ученого. Скорбим об утрате нашего коллеги и друга и выражаем глубокие и искренние соболезнования родным и близким.