

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. Вышелеского», 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.

Пунько 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**

СО Д Е Р Ж А Н И Е**C O N T E N T S****ЭПИЗООТОЛОГИЯ**

Лысенко А.П., Лемиш А.П., Лемиш Н.А., Герасимчук С.С., Красникова Е.Л., Потапчук Д.В., Ушаков С., Пономарев А.И., Пулиш А.В., Чиртик М.В. **3** СОВРЕМЕННЫЕ ДАННЫЕ О СТРЕПТОКОККОВОЙ (*STREPTOCOCCUS SUIS*) КО-ИНФЕКЦИИ В СВИНОВОДСТВЕ

Красникова Е.Л., Мальчик О.В., Мистейко М.М., Садовский А.Л. **19** ПОЛИМИКРОБНЫЕ И ПОЛИВИРУСНЫЕ АССОЦИАЦИИ У СВИНЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА С ПРИЗНАКАМИ РЕСПИРАТОРНОЙ ПАТОЛОГИИ НА ПРИМЕРЕ НЕСКОЛЬКИХ СВИНОКОМПЛЕКСОВ НА 24 ТЫСЯЧИ ГОЛОВ

Лысенко А.П., Высоцкий А.Э., Кучвальский М.В., Притыченко А.Н., Красникова Е.Л., Притыченко А.В. **23** ЛАТЕНТНАЯ ТУБЕРКУЛЕЗНАЯ ИНФЕКЦИЯ У НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ ТУБЕРКУЛИННЕГАТИВНЫХ КОРОВ

Красникова Е.Л., Садовский А.Л. **30** ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР РЕАЛ-ТАЙМ В МОНИТОРИНГЕ ПАТОЛОГИИ СВИНЕЙ, ВЫЗВАННОЙ ЦИРКОВИРУСОМ ВТОРОГО ТИПА

Дубаневич О.В., Тяпша Ю.И. **35** ВИРУСНЫЕ ПНЕВМОЭНТЕРИТЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ХОЗЯЙСТВАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ИММУНОБИОЛОГИЯ

Понаськов М.А. **42** ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ КРОЛИКОВ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ВАКЦИНЫ «БОЛЬШЕВАК»

ФАРМАКОЛОГИЯ

Радивил А.Н. **47** ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА «ВИРОКОКЦИД» ПРИ АССОЦИАТИВНЫХ ПАЗАРИТОЗАХ ОВЕЦ

Мамадуллаев Г.Х., Элмуродов Б.А., Джуракулов О.К., Файзиев У.М. **52** РИФИЗОСТРЕП – НОВЫЙ КОМБИНИРОВАННЫЙ ПРЕПАРАТ ПРОТИВ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

САНИТАРИЯ

Богданович Д.М. **58** ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО БИОФИЗИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА КАЧЕСТВО СПЕРМЫ ХРЯКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

EPIZOOTOLOGY

Lysenko A.P., Lemish A.P., Lemish N.A., Gerasimchuk S.S., Krasnikova E.L., Potapchuk D.V., Ushakov S., Ponomarev A.I., Pulish A.V., Chirtik M.V. **3** CURRENT DATA ON STREPTOCOCCUS (*STREPTOCOCCUS SUIS*) CO-INFECTION IN PIG PRODUCTION

Krasnikova E.L., Malchik O.V., Misteyko M.M., Sadovsky A.L. **19** POLYMICROBIAL AND POLYVIRUS ASSOCIATIONS IN PIGS OF DIFFERENT AGES WITH SIGNS OF RESPIRATORY PATHOLOGY ON THE EXAMPLE OF SEVERAL PIG COMPLEXES FOR 24 THOUSAND HEADS

Lysenko A.P., Vysotsky A.E., Kuchvalsky M.V., Pritychenko A.N., Krasnikova E.L., Pritychenko A.V. **23** LATENT TUBERCULOSIS INFECTION IN NEWBORN CALVES OF TUBERCULIN-NEGATIVE COWS

Krasnikova E.L., Sadovsky A.L. **30** THE USE OF REAL-TIME PCR IN THE MONITORING OF PATHOLOGY OF PIGS CAUSED BY THE CIRCOVIRUS OF THE SECOND TYPE

Dubanevich O.V., Tsiapsha Y.I. **35** VIRAL PNEUMOENTERITIS OF CATTLE IN FARMS OF THE REPUBLIC OF BELARUS

IMMUNOBIOLOGY

Ponaskov M.A. **42** IMMUNOMORPHOLOGICAL CHANGES IN THE ORGANISM OF ROBBIES AFTER APPLICATION OF BOLSHEVAK VACCINES

FARMACOLOGY

Radivil A.N. **47** EFFICIENCY OF NEW COMPLEX PREPARATION «VIROCOCCID» IN ASSOCIATIVE PARASITOSIS OF SHEEP

Mamadullaev G.H., Elmurodov B.A., Dzhurakulov O.K., Fayziev U.M. **52** RIFIZOSTREP – A NEW COMBINED PREPARATE AGAINST TUBERCULOSIS MICOBACTERS

SANITATION

Bogdanovich D.M. **58** EFFICIENCY OF COMPLEX BIOPHYSICAL IMPACT ON THE QUALITY OF SPERM OF BREEDERS

Компьютерная верстка: ЛУКЬЯНОВА И.А.

Подписано в печать 08.12.2022 г.

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

Уч.-изд. л. , усл. печ. л. 7,44 Тираж 100 экз. Заказ №

220063, г. Минск, ул. Брикета, 28. E-mail: bievmtut.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.

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹

Лемиш А.П., кандидат ветеринарных наук²

Лемиш Н.А., микробиолог диагностической ветеринарной лаборатории²

Герасимчук С.С., микробиолог диагностической ветеринарной лаборатории²

Красникова Е.Л., научный сотрудник¹

Потапчук Д.В., начальник ветеринарного отдела²

Ушаков С., кандидат ветеринарных наук²

Пономарев А.И., ветеринарный врач по свиноводству²

Пулиш А.В., ветеринарный врач²

Чиртик М.В., ветеринарный врач²

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

²ЗАО «Консул», г. Брест

СОВРЕМЕННЫЕ ДАННЫЕ О СТРЕПТОКОККОВОЙ (*STREPTOCOCCUS SUIS*) КО-ИНФЕКЦИИ В СВИНОВОДСТВЕ

Резюме

В статье представлены данные о сочетанной вирусно-бактериальной (*Streptococcus suis* и PRRS) инфекции поросят, наиболее распространенной в современном свиноводстве, а также раскрыта система ее диагностики и профилактики.

Ключевые слова: *Streptococcus suis*, бактериальные инфекции, свиньи, PPRSS, ко-инфекция, полимеразная цепная реакция, вирусные инфекции, диагностика, геном, ДНК, РНК.

Summary

The article presents data on a combined viral-bacterial (*Streptococcus suis* and PRRS) infection of piglets, the most common in modern pig farming, as well as a system for its diagnosis and prevention.

Keywords: *Streptococcus suis*, bacterial infections, pigs, PRRS, co-infection, polymerase chain reaction, viral infections, diagnostics, genome, DNA, RNA.

Поступила в редакцию 20.09.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

В современной ветеринарии наиболее распространенной бактерией, вызывающей заболевание у свиней, можно назвать *Streptococcus suis*, которая характеризуется большим разнообразием штаммов. На сегодняшний день известно 35 различных серотипов, классифицированных по их капсульным полисахаридам. *Streptococcus suis* вызывает менингиты, артриты, полисерозиты, эндокардиты, отиты, бронхопневмонии, которые в конечном итоге приводят к значительным экономическим потерям в свиноводстве. Бактерия достаточно хорошо приспособляется к защитным механизмам иммунной системы хозяина, является колонизатором широкого списка слизистых оболочек, а также является постоянным

обитателем верхних дыхательных путей и миндалин. *Streptococcus suis* является генетически и фенотипически гетерогенным видом бактерий. Штаммы, принадлежащие к разным капсулярным серотипам или даже к одному и тому же серотипу, генетически отличаются друг от друга [1, 2], (таблица 1). Этот аспект является ключевым в постоянном присутствии стрептококка как в организме отдельно взятых животных, так и в целом, в стадах хозяйств с различным эпизоотическим состоянием, обуславливающим стационарное неблагополучие.

Поросята впервые сталкиваются с этим возбудителем, находясь еще во внутриутробном состоянии, во время родов, проходя родовые пути свиноматок, а также в постнатальный период, потребляя молоко

и молозиво от вымени, через пуповину, при скалывании клычков, хвостиков, кастрациях и других ветеринарных манипуляциях. Около 98 % поросят получают инфицирование стрептококком в период выращивания. Своего максимального развития и проявления стрептококковые инфекции достигают в период после отъема, перегруппировок, когда материнский имму-

нитет снижается к возрасту с 35 до 60 дня жизни, а также в период откорма. Стрептококковая инфекция может проявляться в любом возрасте и в любой технологической группе поросят и свиноматок, в любом органе и тканях животного. *Streptococcus suis* является зооантропогенным микроорганизмом (рисунок 1).

Таблица 1. – Классификация стрептококков по предложению Ребекки Лэнсфилд (1933 год)

Наименование	Показатель	Вид стрептококка
Тип гемолиза	α	<i>S. suis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. equinus</i> , <i>S. bovis</i> ,
	β	<i>S. porcinus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. equi</i> , <i>S. zooepidermitidis</i> , <i>S. canis</i>
Серогрупповая принадлежность по Лэнсфилд	A	<i>S. pyogenes</i>
	B	<i>S. agalactiae</i>
	C	<i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. suis</i> , <i>S. equi</i> (все подвиды)
	D	<i>S. suis</i> , <i>S. bovis</i> , <i>S. equinus</i> , энтерококки
	G	<i>S. canis</i>
	E	<i>S. porcinus</i> , <i>S. uberis</i>
	R	<i>S. suis</i>
	S	<i>S. suis</i>
	P	<i>S. porcinus</i>
	N	<i>S. porcinus</i>
	V	<i>S. porcinus</i>
	нет	<i>S. pneumoniae</i>

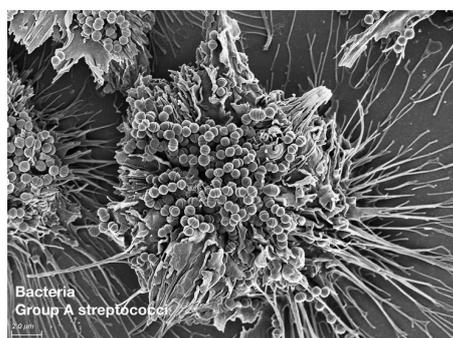


Рисунок 1. – Стрептококки, заселившие миндалины

Дополнительно инфекция *S. suis* встречается у других животных (крупный рогатый скот, овцы, козы, кабаны, лошади, кошки, собаки и птицы).

Индекс контагиозности *S. suis* равен 0,4, т.е. среднее число заболевших равно 40 % из каждых 100 индивидуумов, тем или иным путем соприкасавшихся с больными и инфицированными животными.

Степень тяжести развития болезни зависит от степени вирулентности бактерии, т.е. от заражающей способности.

У стрептококка обширное количество факторов вирулентности. В его клеточной стенке имеются М-, Т-, и R-протеины. М-протеин – один из главных факторов вирулентности. Стрептококки способны продуцировать токсины: эритрогенный токсин (токсин сыпи) обладает цитотоксичным, эритрогенным, симпатикотропным, аллергическим действием; экзо- и эндотоксины: стрептолизин S оказывает иммуносупрессорное действие; стрептолизин О обладает кардиотропностью; энтеротоксин вызывает диарею. Стрептококки продуцируют ферменты: гиалуронидазу, стрептокиназу, амилазу, липопротеиназу и др., которые способствуют распространению инфекции в организме [3] (таблица 2).

Таблица 2. – Основные факторы вирулентности стрептококка

Факторы вирулентности	Биологический эффект
Капсула (основной фактор)	антифагоцитарная активность
Протеин-адгезин	адгезия (прикрепление) к эпителию
Протеаза секреторных антител (IgA)	разрушает секреторные антитела (IgA)
Пневмолизин	вызывает гемолиз. Разрушает реснички мерцательного эпителия, активирует комплемент по классическому пути, подавляет «дыхательный взрыв» при фагоцитозе
Тейхоевая кислота клеточной стенки	активирует комплемент по альтернативному пути
Фрагменты пептидогликана клеточной стенки	
Пирогенные экзотоксины (эритрогенины А,В,С)	пирогенный эффект, усиление ГЗТ, иммуносупрессивный эффект на В-лимфоциты, появление сыпи, суперантиген
Стрептолизины: S (устойчив к кислороду) и O (чувствителен к кислороду)	разрушают лейкоциты, тромбоциты, эритроциты. Стимулируют освобождение лизосомальных ферментов.
Гиалуронидаза	облегчает инвазию, дезинтегрируя соединительную ткань
Стрептокиназа (фибринолизин)	разрушает кровяные сгустки (тромбы), способствует распространению микроба в тканях
ДНК-аза	демолимеризует внеклеточную ДНК в гное
С5а-пептидаза	разрушает С5а-компонент комплемента, хемоаттрактант

Недавние исследования выявили, что штаммы стрептококка серотипов 2 и 9 экспрессируют гены, кодирующие многомодальные белки адгезины, известные как антиген I / II (AgI / II). В присутствии гликопротеинов слюны ротовой полости эти адгезины (AgI / II) приводят к агрегации *S. suis*, адгезии и колонизации верхних дыхательных путей свиней. Сообщается, что особенно серотип 9 благодаря своей повышенной адгезии (AgI / II) способен к легкой агрегации и образованию биопленки, что в свою очередь способствует проникновению бактерий в нижележащие отделы пищеварительной системы. В агрегированном состоянии они защищены от низкого pH желудка, что приводит к дальнейшей колонизации кишечника [4]. *S. suis* также имеет адгезин, известный как фактор Н-связывающий белок, Fhb. Фактор Н обильно начинает синтезироваться бактериями, находящимися в плазме крови, отвечает за защиту бактерий от воздействия иммунной системы, в частности комплемента [8]. Связывание *S. suis* с фактором Н приводит к

усилению прилипания бактерий к эпителиальным и эндотелиальным клеткам животных, также защищает *S. suis* от фагоцитоза и опосредованного комплементом уничтожения [5, 6, 7].

Наиболее значимой антигенной структурой *S. suis*, как и у большинства стрептококков, является полисахаридная капсула, которая и определяет столь обширное разнообразие серогрупп и серотипов стрептококка. Бактериальная капсула покрывает всю поверхность бактериальной клетки, частично препятствуя адгезии к эпителиальным клеткам хозяина. Некоторые исследования показали, что отсутствие (или подавление синтеза) капсулы увеличивает взаимодействие адгезинов и последующее прикрепление бактерий [9, 10, 11]. Толщина капсулы зависит от окружающей бактерию среды, а также среды обитания бактерии в тканях восприимчивых животных. Установлено, что капсула тоньше во время колонизации и инвазии в клетках дыхательного эпителия [12, 13], также что капсула препятствует

адгезинам и гидрофобным компонентам клеточной стенки *S. suis*, которые ответственны за образование биопленки. Однако в кровотоке толщина капсулы выше, и это позволяет *S. suis* избежать фагоцитоза. Бактериальная капсула является эффективным средством противостояния бактерий влиянию антибиотиков.

Некоторые микроорганизмы избегают агрессивных сред путем агрегации в виде биопленок, которые позволяют им сохраняться и колонизировать ткани, противостоять вымыванию из организма хозяина и воздействию противомикробных препаратов, а также облегчают обмен генетической информацией [14]. *S. suis* способен образовывать биопленки, которые объединяют бактерии в так называемый информационно-биохимический кворум. Это сигнальная сеть, регулируемая геном *LuxS*, кодирующим фермент S-рибозилгомоцистеиназа, *LuxS*, который был обнаружен у вирулентных штаммов *S. suis*. Сообщалось, что *LuxS* играет важную роль благодаря его способ-

ности усиливать биосинтез аутоиндуктора 2 (AI-2), адгезии, образования биопленок, клеточного метаболизма и устойчивости к иммунным реакциям хозяина и антимикробной терапии [15, 16]. Производство биопленки *S. suis* индуцируется активностью опосредованного фибриногеном поперечного мостика *S. suis*. Присутствие фибриногена может стимулировать экспрессию адгезинов, тем самым облегчая прилипание бактерий друг к другу [17]. Кроме того, муцин, продуцируемый бокаловидными клетками эпителия, может усиливать образование биопленок и способствовать выживанию бактерий даже в условиях ограниченных питательных веществ [18]. Бактериальные биопленки эффективно защищают бактерии от противомикробных препаратов. Сообщалось, что вирулентные штаммы *S. suis* обладают более высокой способностью продуцировать биопленки, чем авирулентные штаммы [19, 20] (рисунок 2).

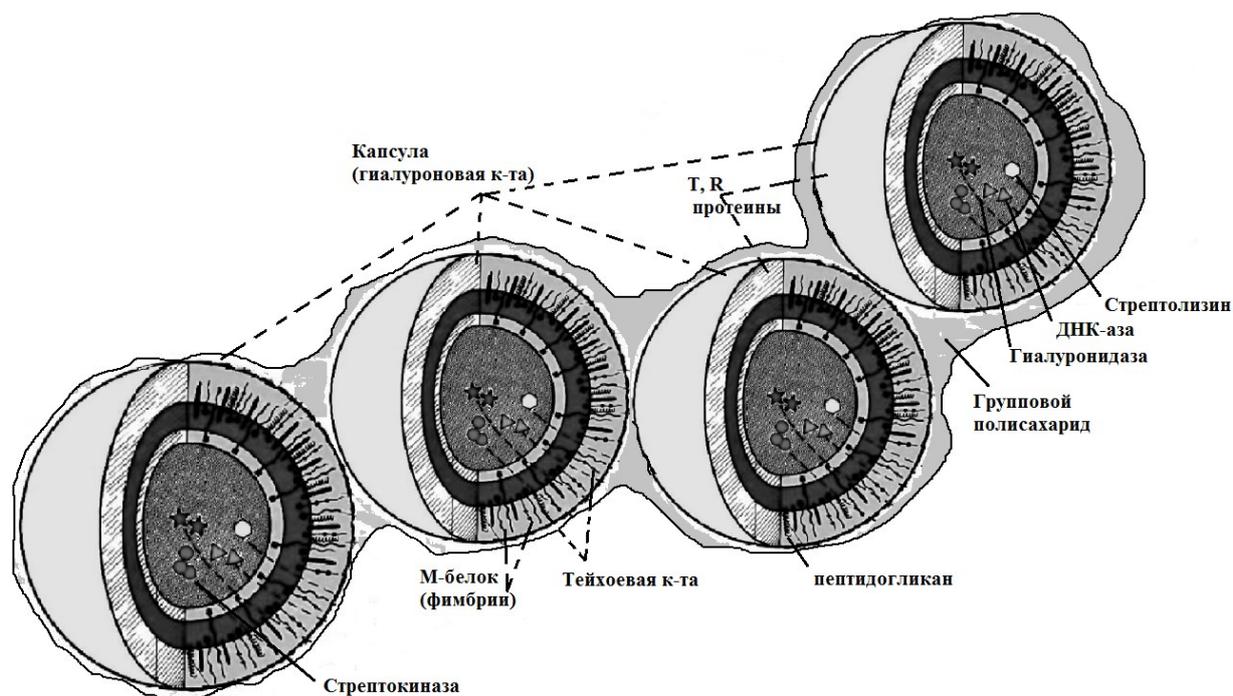


Рисунок 2. — Схематическое расположение факторов вирулентности

Цель работы – изучение значимости вирусно-бактериальной инфекции (*S.suis* и РРСС) в свиноводческих хозяйствах, влияние на иммунитет, профилактическая эффективность вакцины «СтрептоВаК-С».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приборы, оборудование и средства измерения поверены и аттестованы, технически исправны, подвергнуты метрологическому контролю в установленные сроки, имеются технические паспорта.

Диагностические питательные среды (питательные среды первичного посева, среды накопления, дифференцирующие питательные среды, бульонные и агаровые) готовили на электрической плитке. Изменение и коррекцию pH проводили при помощи pH-метра. Стерилизацию питательных сред проводили в стерилизаторе паровом серии LAC, модель LAC-5040S. Разливали среды по чашкам Петри и пробиркам в отдельном ламинарном шкафу, после застывания проводили контроль стерильности в отдельном термостате. После испытания среды до использования хранили в холодильнике.

Подготовку проб, взятие навесок, проведение разведений и посевы для дальнейшего культивирования проводили в отдельном боксовом помещении (бокс 1) в ламинарном шкафу. Далее посевы помещали в термостаты с оптимальными температурами и CO₂-инкубатор, анаэробат для обеспечения оптимальных условий роста соответствующих микроорганизмов. Учет их роста проводили ежедневно, рассев и выделение чистых культур осуществлялся в отдельном помещении и отдельном ламинарном шкафу. Здесь же проводили определение антибиотикорезистентности выделенных микроорганизмов.

Весь процесс исследований соответствует методическим указаниям и методикам, описанным в справочнике по бактериологическим методам исследования под редакцией А.Э. Высоцкого и З.Н. Барановской, 2008 г.

Иммунологические реакции, включая ИФА, проводятся согласно методическим указаниям по постановке серологических реакций при диагностике инфекционных болезней животных, утвержденным ГУВ МСХиП РБ 03.03.2008 (№ 10-1-5/129).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводится согласно методическим указаниям по постановке полимеразной цепной реакции в ветеринарных диагностических лабораториях, утвержденным ГУВ МСХ и П РБ 03.03.2008 (№ 10-1-5/127).

Отработанный материал проходит обеззараживание в автоклаве (паровом стерилизаторе LAC-05060S) при температуре 132 °C в течение 60 минут и проведении контролей эффективности стерилизации биологическими тестами (бактериальная

культура *Pseudomonas aeruginosa* КМИЭВ В-129), одноразовыми индикаторами воздушной стерилизации и максимальными термометрами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На сегодняшний день известно 35 серотипов, основанных на серологических различиях капсульных полисахаридов, но предполагается, что некоторые из них принадлежат к различным бактериальным видам.

В течение пяти лет мы проводили бактериологическую диагностику с выявлением чистых культур стрептококка, подвергали его ПЦР-детекции на основе определения генома, отвечающего за формирование капсульных особенностей, а также серологический мониторинг. Результаты нашей работы легли в основу создания вакцины против стрептококкоза свиней «СтрептоВаК-С».

Известно, что естественным резервуаром стрептококка являются свиньи и дикие кабаны, однако не стоит забывать и о носительстве среди людей. Субклиническое течение инфекции является ключевым в закреплении и распространении стрептококка среди восприимчивых животных, а также играет важную роль как в эпизоотологии, так и эпидемиологии.

Как факультативно-патогенная бактерия *S. suis* способна вызывать различную силу и степень клинического проявления болезни в зависимости от тех или иных факторов, способствующих усилению клинического проявления болезни. Не новостью является и то, что основную и главенствующую роль таких факторов занимает окружающая среда. К ним относятся скученное содержание, частые перегруппировки, плохая вентиляция, ненадлежащие параметры микроклимата, плохие санитарно-гигиенические условия, высокая вирусно-бактериальная, газовая (CO₂, NH₃) нагрузка на воздух. К прочим факторам стресса можно с уверенностью отнести наличие в стаде циркулирующих вирусов, вызывающих сильную иммуносупрессию/депрессию (PPCS, KCS, PCV2, PCV3, Грипп тип А и другие). Именно поэтому наиболее восприимчивой группой к стрептококку является группа поросят-отъемышей и более старшие поросята. Причиной

этому служит в первую очередь полное снижение к возрасту 35–40 дней защитных материнских антител, в то время как адаптивный иммунный ответ еще не успевает сформироваться. Ситуация осложняется еще и тем, что во время отъема поросят от свиноматок дыхательные пути начинают усиленно заселяться патогенной микрофлорой и другими видами бактерий, такими как *Haemophilus parasuis*, *M. Hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *P. multocida*, *Bordetella bronchiseptica*. В сумме все эти факторы вызывают комплекс бронхо-легочных заболеваний у поросят, достаточно трудно поддающихся лечению.

Наиболее сложному лечению поддаются вирусно-бактериальные ко-инфекции, например РРСС, КЧС, РСВ2, РСВ3 и *S. suis*,

а на более поздних сроках откорма дополнительно *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*.

Наши исследования показали, что при воздействии иммуносупрессивных вирусов происходит в значительной степени подавление фагоцитарной активности дендритных клеток и макрофагов, а также торможение антигенпрезентирующей функции плазматических клеток, Т- и В-лимфоцитов, что приводит к последующему клиническому проявлению стрептококковой инфекции, вызванной *S. suis*. Ниже представлены гистограммы цитокинового профиля поросят 20-, 40-, 60- и 80-дневного возраста, выраженные в процентах. За 100 % было взято максимальное значение физиологически нормального количества уровня того или иного цитокина (рисунок 3).

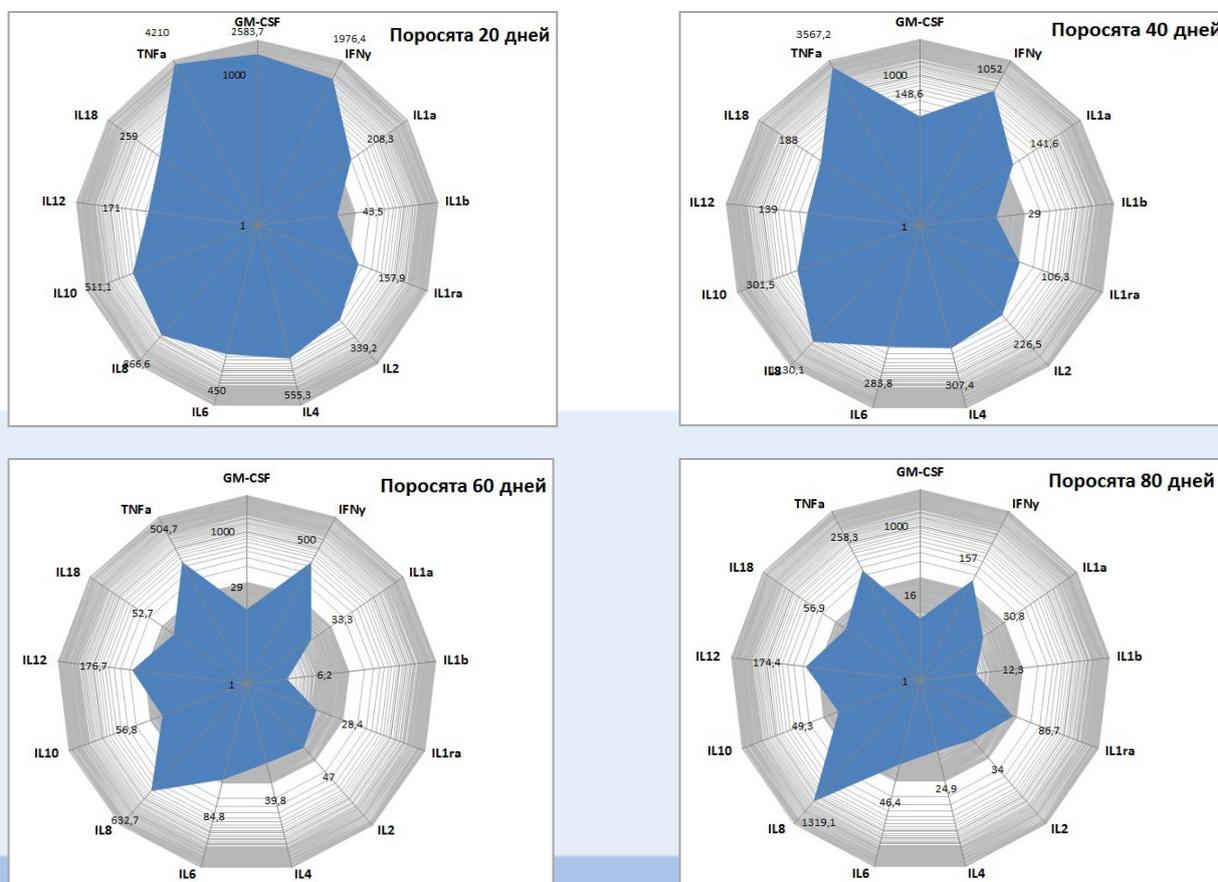


Рисунок 3. – Цитокиновый профиль поросят в возрасте 20–80 дней

GM-CSF – гранулоцитарномacroфагальный колониестимулирующий фактор, стимулирует рост и дифференцировку лимфоцитов (гранулоциты, эозинофилы

и макрофаги). Секретируется макрофагами, Т-клетками (Т-киллерами), тучными клетками, эндотелиальными клетками и фибробластами. Этот цитокин является

начальным этапом иммунного воспалительного каскада, благодаря которому осуществляется активация небольшого количества макрофагов, что в дальнейшем приводит к значительному увеличению их числа и является решающим в дальнейшей борьбе с инфекцией. Нами установлено, что при влиянии вируса РРСС после 40 дней жизни в последующий 40-дневный период происходит значительное угнетение синтеза этого фактора.

IFN γ – интерферон типа II, является цитокином, фактором адаптивного и врожденного противовирусного и частично антибактериального иммунного ответа. IFN γ – наиболее важный активатор макрофагов. Интерферон способен напрямую ингибировать репликацию любого вируса. Цитокин синтезируется в основном натуральными киллерами NK-клетками, а также дифференцированными Т-клетками CD4 (Th1) и CD8 (цитотоксическими Т-лимфоцитами), эффекторными Т-клетками после развития антиген-специфического иммунного ответа. Также относительно недавно (2010) установлен новый тип ранее неизвестных клеток, синтезирующих интерферон (IFN γ) нецитотоксическими врожденными лимфоидными клетками (ILC). Проведенные нами исследования показывают, что под влиянием вируса РРСС и прочих функция интерферон-синтезирующих клеток претерпевает несколько этапов изменений, проходя поэтапное снижение уровня к возрасту 80 дней.

Семейство интерлейкинов IL-1 представляет собой сложную сигнальную систему синтезируемую лейкоцитами и эндотелиальными клетками, регуливающую воспалительные реакции в тканях. Основными представителями этого семейства являются IL-1 α и IL-1 β , а также их внутриклеточный антагонист, тормозящий эффекторы воспаления – IL-1Ra.

К суперсемейству IL-1 также можно отнести и IL-18. Данный интерлейкин синтезируется макрофагами, выполняет роль регулятора воспалительных реакций. В значительной степени усиленный синтез IL-18 обуславливается бактериальными антигенами, а именно липополисахаридными комплексами клеточных стенок бактерий (LPS). IL-18 как и IL-12 стимулируют созревание и дифференцировку Т-клеток CD4⁺ (Th2), CD8 и NK-клеток, усиливает

синтез IFN γ . В сочетании IL-18 и IL-12 ингибируют синтез IL-4, а также продукцию IgE и IgG1, но увеличивает синтез IgG2a в В-клетках. Функция IL-4 играет ключевую роль в дифференцировке и активной пролиферации В-клеток и Т-клеток.

Интерлейкин IL-6 считается важным медиатором лихорадки и острой фазы воспаления. Данный интерлейкин преодолевает гематоэнцефалический барьер, воздействуя на регуляторный центр гомеостаза температуры тела в гипоталамусе, вызывая ее повышение. IL6 стимулирует рост нейтрофилов, В-клеток, но тормозит развитие Т-клеток.

Интерлейкин IL-8 – хемокин, синтезируемый в основном макрофагами, но также эндотелиальными клетками, клетками гладкой мускулатуры дыхательных путей. IL-8 обеспечивает в основном направленный хемотаксис нейтрофилов, гранулоцитов к месту направленного воспаления, усиливает фагоцитоз. При взаимодействии первого макрофага с вирусом или бактерией, любым антигеном происходит выброс IL-8 с целью привлечения внимания других макрофагов. IL-8 является маркерным цитокином, указывающим на вирусные воспалительные реакции, происходящие именно в легких. Проведенные нами исследования указывают, что воспалительные реакции в легких не только не уменьшаются, а наоборот усиливаются к возрасту 80 дней.

Интерлейкин IL-10 – фактор, ингибирующий синтез цитокинов и является противовоспалительным цитокином, подавляющим экспрессию и синтез других цитокинов иммунной системы, презентацию антигенов и активацию CD4 + Т-клеток. Так- же установлена роль IL-10 в стимулировании синтеза антител уже активированными и дифференцированными В-клетками, осуществлении ингибирования и торможения индуцированной бактериями (LPS) продукции провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-12 и секреции IFN γ .

Установлено, что у исследуемых групп животных на протяжении всего опыта резко увеличен уровень IL8 (+1319 %) и снижен уровень IL10 (-51 %).

Фактор некроза опухоли (TNF, кахексин или кахектин), однажды названный как фактор некроза опухоли альфа или

TNF α , синтезируется в основном макрофагами. Однако недавние исследования показали, что его синтез осуществляется широким перечнем клеток: тучные клетки, эндотелиальные клетки, сердечные миоциты, фибробласты и нейроны. Наибольшее количество этого цитокина синтезируется в ответ на бактериальные антигены (LPS). Высокое содержание в крови кахексина вызывает признаки воспаления, которые в последующем приводят к истощению животных.

На протяжении нескольких лет в хозяйстве велось наблюдение и сбор данных

о причинах непроизводительного выбытия поросят. На фотографиях представлены патологоанатомические изменения внутренних органов (легкие, сердце). Следует отметить, что патологоанатомические изменения зависят прежде всего от стадии и продолжительности инфекционного процесса. На представленных фотографиях выраженный хронический воспалительный процесс, характеризующийся крупозной и фибринозно-катаральной пневмонией, плевритом и перикардитом. Также отмечаются кровоизлияния в оболочке головного мозга (рисунки 4–8).



Рисунок 4. – Фибринозно-катаральная пневмония и перикардит



Рисунок 5. – Фибриновый перикардит

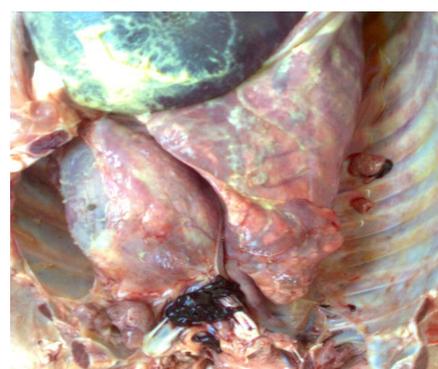


Рисунок 6. – Крупозная пневмония



Рисунок 7. – Фибриновый плеврит



Рисунок 8. – Кровоизлияния в головном мозге

При бактериологическом и вирусологическом исследовании патологического материала от поросят (легкие, сердце, головной мозг) была выделена микрофлора, представленная в таблице 3.

При исследовании методом полимеразной цепной реакции выявлен геном *Streptococcus suis* (серотипы 2, 3, 7, 12, 16, 18, 24, 29, 30, 31). Результаты электрофоре-

тической детекции ПЦР представлены на рисунке 9.

В результате вирусологического исследования методом полимеразной цепной реакции выявлен геном вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (таблица 4, рисунок 10).

Таблица 3. – Результаты микробиологического исследования патологического материала

Группа животных	Вид патологического материала	Выделенная микрофлора	Микология
Поросята	лёгкое, сердце	<i>Streptococcus suis</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , единичные <i>Escherichia coli</i>	не выявлено
	головной мозг	<i>Streptococcus suis</i>	не выявлено
	лёгкое, сердце	<i>Streptococcus suis</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Escherichia coli</i>	не выявлено
	головной мозг	<i>Streptococcus suis</i>	не выявлено
	лёгкое, сердце	<i>Streptococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Escherichia coli</i>	не выявлено
	головной мозг	<i>Streptococcus suis</i> единичные <i>Staphylococcus spp.</i>	не выявлено
	лёгкое, сердце	<i>Streptococcus suis</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Escherichia coli</i>	не выявлено
	головной мозг	<i>Streptococcus suis</i> , единичные <i>Staphylococcus spp.</i>	не выявлено
	лёгкое, сердце	<i>Streptococcus suis</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , единичные <i>Escherichia coli</i>	не выявлено
	головной мозг	<i>Streptococcus suis</i> , <i>Staphylococcus spp.</i>	не выявлено
	лёгкое, сердце	<i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , единичные <i>Escherichia coli</i> , единичные <i>Staphylococcus spp.</i>	не выявлено
	головной мозг	<i>Streptococcus suis</i>	не выявлено

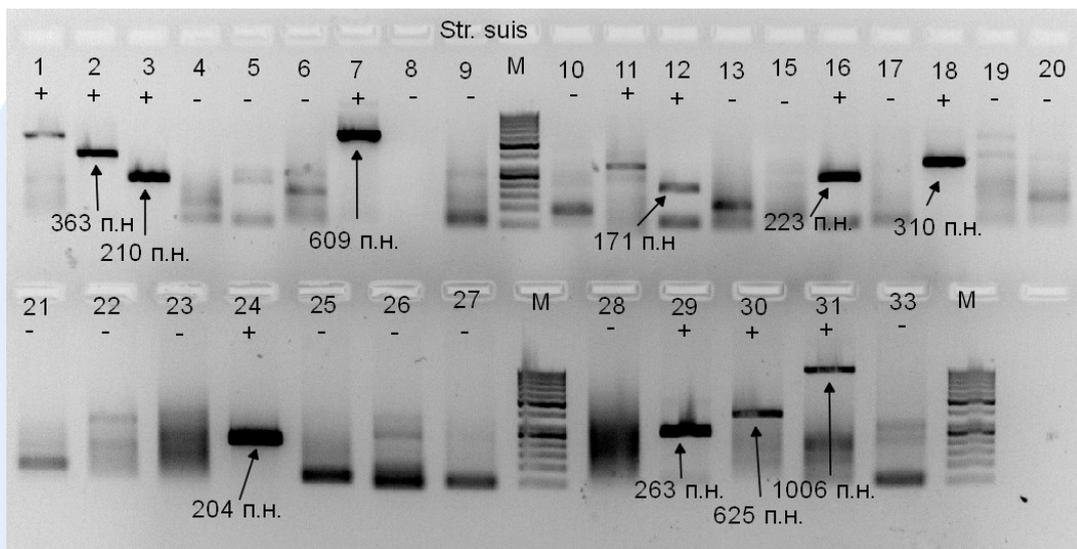
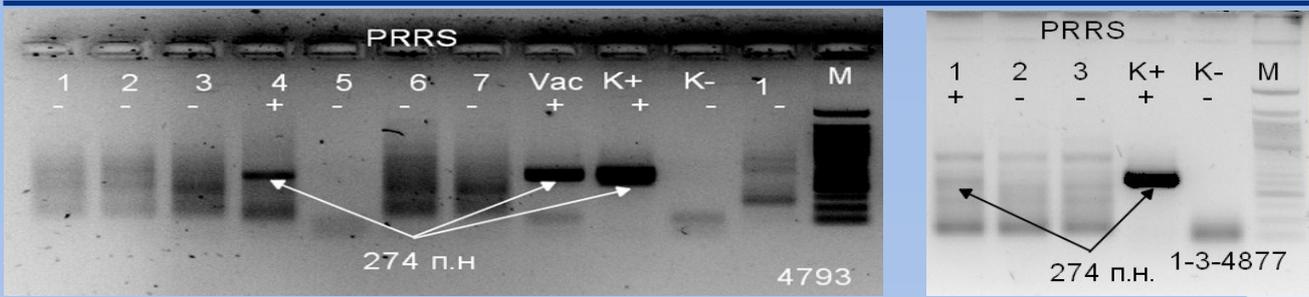


Рисунок 9. – Результаты ПЦР выделенного в патологическом материале *Streptococcus suis*

Таблица 4. – Результаты ПЦР детекции вируса РРСС

№ ПЦР пробы	Материал, группа животных	PRRS
1	Кусочки селезенки от поросят	положительно
2	Кровь от подвинков 40 дней, объединенная проба	положительно



К+ – положительный контроль реакции, РНК вируса РРСС– 274 п.н.;
 К- – отрицательный контроль реакции; М – маркер;
 1–7 – РНК исследуемых проб

Рисунок 10. – Результаты постановки ПЦР с праймерами, специфичными в отношении возбудителя РРСС

Также нами было проведено исследование уровней иммуноглобулинов (IgG) в отношении вируса РРСС, а также *Streptococcus suis* до вакцинации и после вакцинации животных вакцинами СтрептоВаК-С и Porcilis PRRS.

На диаграммах 1 и 2 представлен уровень иммуноглобулинов до и после программы вакцинации против вируса РРСС. Как видно, состояние иммунного ответа против вируса РРСС стабилизировано, неконтролируемой циркуляции вируса в стаде после применения вакцинных мероприятий не происходит. Уровень иммуноглобулинов до вакцинации под действием патогенного и высоковирулентного вируса РРСС составлял у поросят с 90-го дня жизни – 6-й титр-балл и выше, после вакцинации – не выше 3-4 титр-балла. Следует отметить, что наибольшее клиническое проявление в

виде бронхо-легочных заболеваний у поросят отмечалось именно в период с 35–40 дня жизни. Помимо этого, была применена вакцина СтрептоВаК-С свиноматкам и поросятам, после применения которой микробиологическим методом, а также в ПЦР стрептококк не выделялся, а значит данный этиологический агент был купирован. Результаты проведенной работы представлены на диаграммах 1–3.

Следующей задачей было проанализировать вариабельность нуклеотидной последовательности выявленного в анализируемом хозяйстве гена вируса (РРСС), кодирующего протеин капсида вируса. Белок капсида является важным объектом в организме поросят, за счет которого осуществляется выработка иммунитета и обеспечивается защита (рисунок 11).

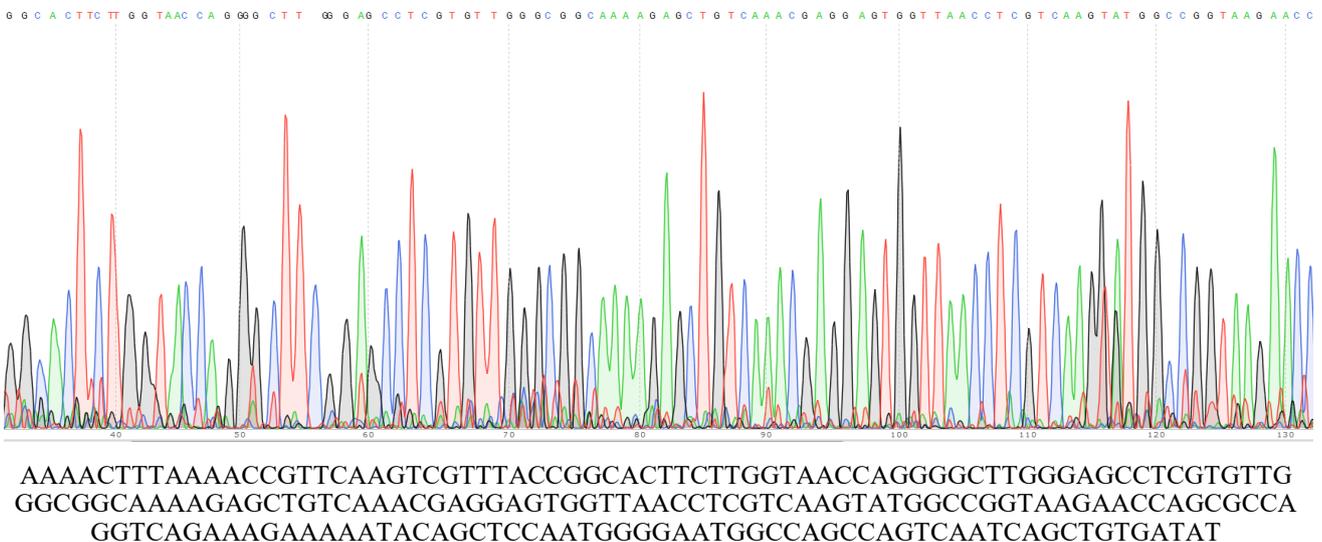


Рисунок 11. – Нуклеотидная последовательность анализируемой мишени вируса (РРСС), выделенного из объединенной пробы крови от поросят в возрасте 40 дней

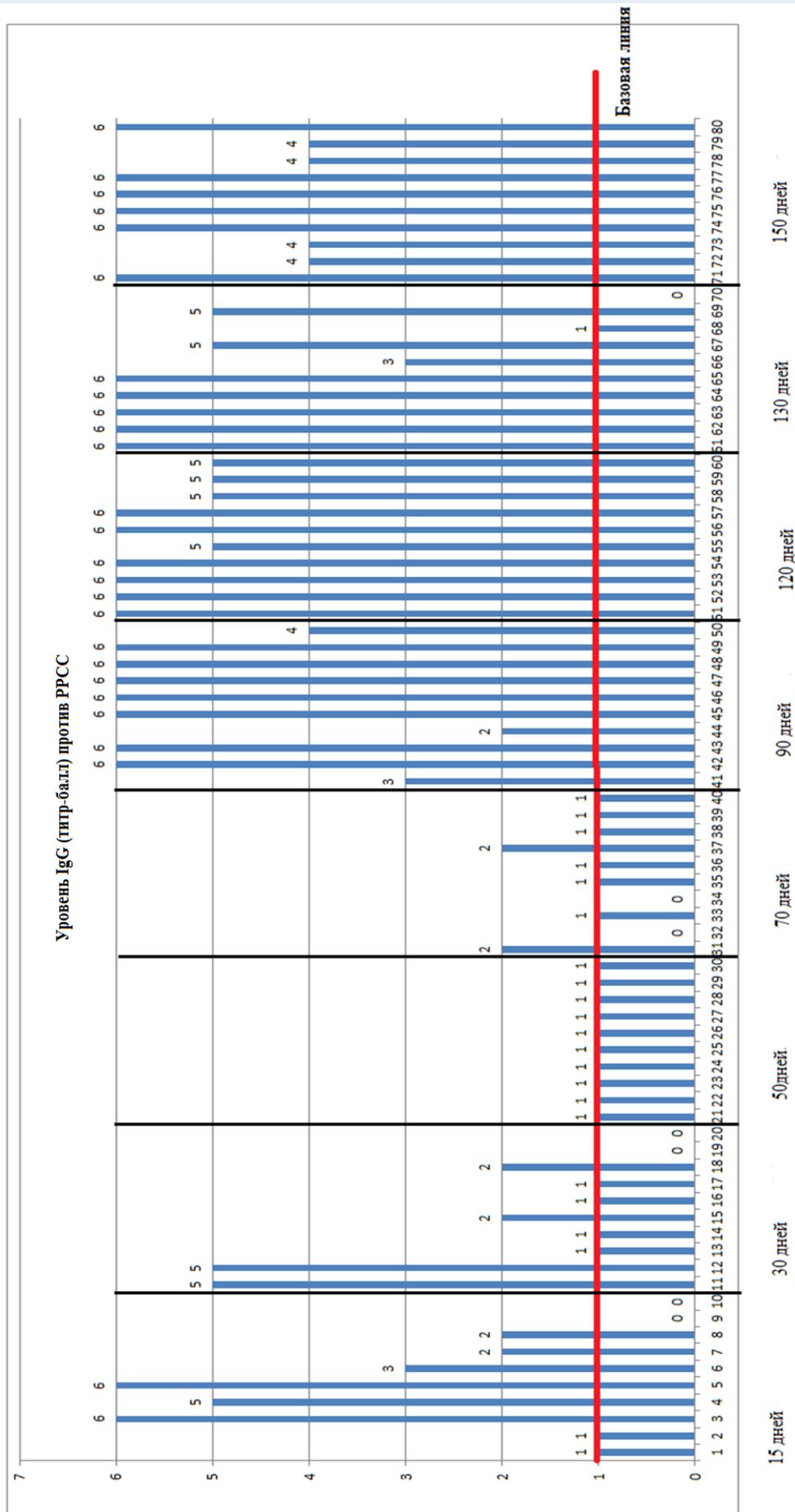


Диаграмма 1. – Серологический профиль (IgG) против PRSS, выраженный в титр-баллах, до вакцинации

Уровень (IgG, %) относительно Streptococcus suis

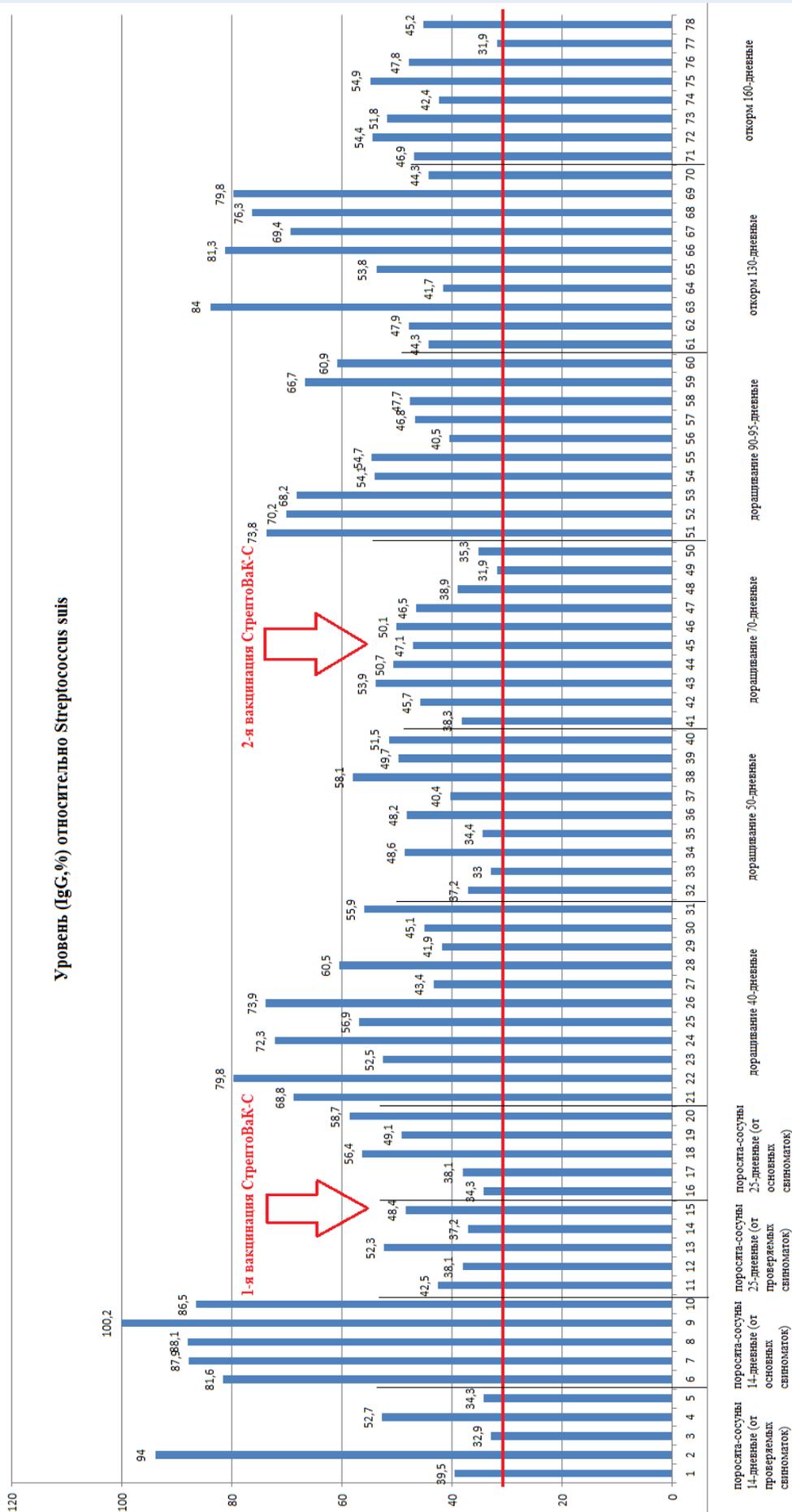


Диаграмма 3. – Серологический профиль (IgG, %) против Streptococcus suis

При сопоставлении сиквенса-последовательностей в качестве референсных были взяты несколько последовательно-

стей из базы данных геномов БД GenBank (таблица 5).

Таблица 5. – Наиболее близкородственные вирусы (PPCC) по отношению к выделенному в свиноводческом хозяйстве

Наименование	Номер в библиотеке	Белковый продукт	Генотип	% идентичности
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain SU1-Bel partial genome sequence	GenBank: KP889243.1	ORF6 membrane protein M ORF7 nucleocapsid protein N	genotype 1 subtype 3	94,76 %
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain lena , complete genome	GenBank: JF802085.1	ORF6 membrane protein M ORF7 nucleocapsid protein N	genotype 1 subtype 3	94,76 %
Lelystad virus , complete genome	NCBI Reference Sequence: NC_043487.1	ORF6 membrane protein M ORF7 nucleocapsid protein N	genotype 1 subtype 1	89,53 %
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate MLV-DV , complete genome	GenBank: KJ127878.1	ORF6 membrane protein M ORF7 nucleocapsid protein N	genotype 1 subtype 1	89,53 %

Анализ образца выявленного в хозяйстве вируса PPCC с прямым праймером подтвердил, что образец содержит кДНК вируса PPCC (участок последовательности, кодирующей мембранный протеин ORF6 membrane protein M, ORF7 nucleocapsid protein N). Сравнение выделенного вируса

между собой в различном материале показывает идентичность циркуляции полевого вируса в различных технологических группах животных. Выявленный вирус относится к вариантному штамму strain **SU1-Bel**, strain **lena** genotype: 1, subtype: 3; (рисунок 12).

PPRS4_PRRS-F	(1)	AAAACCTTTAAACCGT---TCAAGTC-GTT-TACCGGCACTTCTTGGTAA
PPRS6_PRRS-F	(12)	AAGAAAAAGGCGCGGACTAACGTCAGTTGTACCGGCACTC--TGGTAA
Consensus	(12)	AA A A CCG T A GTC GTT TA CGGCACT TGGTAA
		62 111
PPRS4_PRRS-F	(46)	CCAGGGGCTTGGAGCCTCGTGTTGGGCGGCAAAAGGCTGTCAAACGAG
PPRS6_PRRS-F	(59)	CCAGGG-CTTGGAGCCTCGTGTTGGGCGGCAAAAGGCTGTCAAACGAG
Consensus	(62)	CCAGGG CTT GGAGCCTCGTGTTGGGCGGCAAAAG GCTGTCAAACGAG
		112 161
PPRS4_PRRS-F	(96)	GAGTGGTTAACCTCGTCAAGTATGGCCGGTAAGAACCAGCCAGGTCAG
PPRS6_PRRS-F	(108)	GAGTGGTTAACCTCGTCAAGTATGGCCGGTAAGAACCAGCCAGGTCAG
Consensus	(112)	GAGTGGTTAACCTCGTCAAGTATGGCCGGTAAGAACCAGCCAGGTCAG
		162 211
PPRS4_PRRS-F	(146)	AAAGAAAAATACAGCTCCAATGGGGAATGGCCAGCCAGTCAATCAGCTGT
PPRS6_PRRS-F	(158)	AAAGAAAAATACAGCTCCAATGGGGAATGGCCAGCCAGTCAATCAGCTGT
Consensus	(162)	AAAGAAAAATACAGCTCCAATGGGGAATGGCCAGCCAGTCAATCAGCTGT
		212
PPRS4_PRRS-F	(196)	GA
PPRS6_PRRS-F	(208)	GA
Consensus	(212)	GA

Рисунок 12. – Сравнительный генетический анализ выявленного вируса PPCC и материала от поросят в рамках двух исследований (кусочки селезенки, объединенные пробы крови поросят в возрасте 40 дней)

Далее было проведено сравнение и анализ участков геномов выявленных полевых вирусов с вакцинными штаммами вирусов **Lelystad virus**, **MLV-DV**. Результаты этого сравнения представлены на рисунке

13, а, б. Референс-штамм **Lelystad virus** Sequence: NC_043487 является типичным европейским представителем (генотип 1, субтип 1).

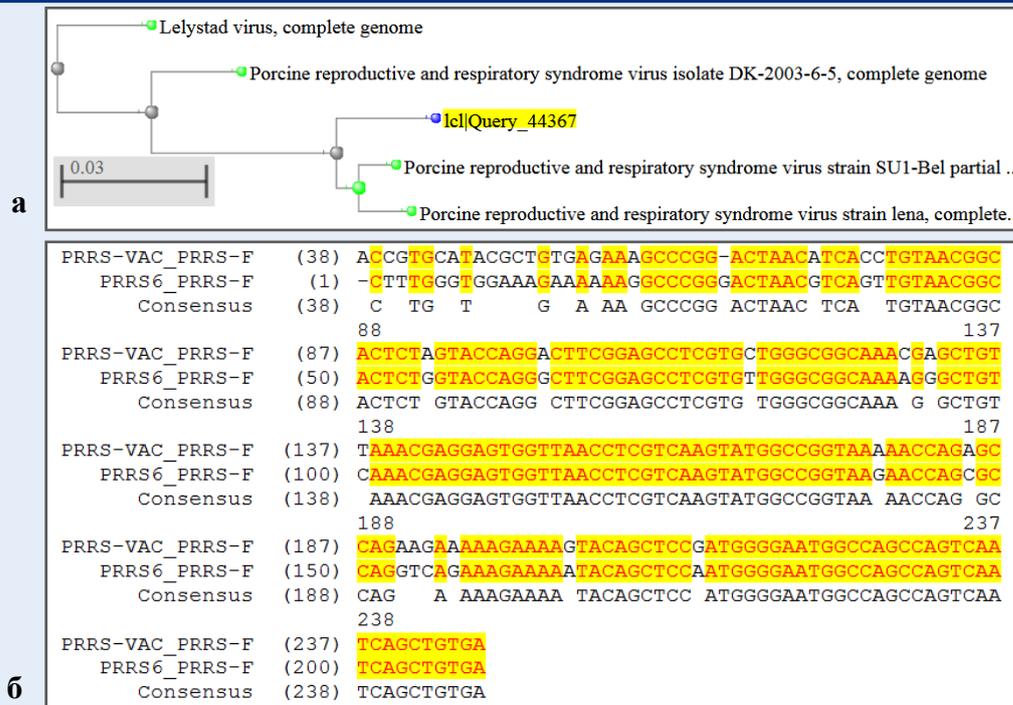


Рисунок 13. – Сравнительный генетический анализ выявленного полевого вируса РРСС в хозяйстве с вакцинным вирусом *Porcillus*, серия A214CE01, дата изготовления – 08-2018, срок годности – до 08-2020

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная работа показывает, что длительное применение антибиотиков в схемах лечения как кормовых, так и инъекционных не позволяет в должной степени избавиться свиноводческое поголовье от циркуляции стрептококка *Streptococcus suis*. Стрептококки до настоящего времени являются наиболее распространенными в свиноводстве патогенами бактериальной этиологии, вызывающими артрит, менингит, плеврит, пневмонию, перикардит как у молодняка, так и у взрослого поголовья. В анализируемом хозяйстве наблюдалось стационарное неблагополучие по *Streptococcus suis* серотипами 2, 3, 7, 12, 16, 18, 24, 29, 30, 31. Серотиповое разнообразие, а также значительные антигенные различия стрептококков создают сложности в разработке стратегий сдерживания распространения и профилактики болезни. Эволюционно бактерия *Streptococcus suis* выработала ряд механизмов защиты и ухода от влияния как иммунной системы, так и от действия антибиотиков. Применение интенсивной схемы вакцинации на маточном поголовье и поросятах вакциной «СтрептоВаК-С» позволило купировать распространение и негативное влияние *Streptococcus suis* вплоть

до полного отсутствия его последующей циркуляции в хозяйстве.

Исследования клеточного иммунитета (цитокиновый профиль) поросят указывают на значительное доминирование воспалительных процессов со стороны бронхолегочной ткани, сердца, что приводит к истощению и кахексии поросят, обусловленной ассоциативными ко-инфекциями, преимущественно вирусно-бактериальной этиологии (вирус РРСС и *Streptococcus suis*). К сожалению, на рынке стран СНГ не существует зарегистрированных вакцин, в состав которых входят аттенуированные вирусы РРСС, тип 1, подтипы 2, 3. Выявленный и генотипированный нами вирус РРСС, циркулирующий в анализируемом хозяйстве, наиболее близок к штамму strain SU1-Bel, strain lena genotype 1, subtype 3. Степень гомологии составляет 94,76 %. Реализация программы вакцинации с применением вакцины Porcillus PRRS (MSD) позволила купировать острую фазу клинического проявления РРСС, снизив циркуляцию высоко патогенного полевого вируса в хозяйстве. Безусловно, циркуляция полевого вируса полностью не остановлена, и без выполнения минимума обязательных мероприятий,

направленных на контроль распространения полевого вируса РРСС, всегда создает риск повторного обострения болезни. Контроль проведенных мероприятий с применением методов оценки уровней IgG (ELISA), полное отсутствие клинического и

патологоанатомического проявления, а также бактериологического выявления ранее циркулировавшей ко-инфекции РРСС+ *Streptococcus suis* позволяет сделать заключение о наиболее важном среди прочих методов профилактики – вакцинации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тимченко, В. Н. Инфекционные болезни у детей / В. Н. Тимченко. – СПб. : СпецЛит, 2017.
2. Genetic and virulence-phenotype characterization of serotypes 2 and 9 of *Streptococcus suis* swine isolates / V. Blume [et al.] // *Int. Microbiol.* – 2009. – № 12. – S. 161–166.
3. Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Quebec, Canada / M. Gottschalk [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2013. 162, 819–825. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.10.028.
4. Serotype-specific role of antigen I/II in the initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis* / S. Chuzeville [et al.] // *Vet. Res.* – 2017. – 48:39. doi: 10.1186/s13567-017-0443-4.
5. Fhb, a novel factor H-binding surface protein, contributes to the antiphagocytic ability and virulence of *Streptococcus suis* / Y. Pian [et al.] // *Infect. Immun.* – 2012. – 80, 2402–2413. doi: 10.1128/IAI.06294-11.
6. Recruitment of factor H to the *Streptococcus suis* cell surface is multifactorial // D. Roy [et al.] // *Pathogens.* – 2016. – 5 : E47. doi: 10.3390/pathogens5030047.
7. Structural basis of the interaction between the meningitis pathogen *Streptococcus suis* adhesin Fhb and its human receptor / C. Zhang [et al.] // *FEBS Lett.* – 2016. 590, 1384–1392. doi: 10.1002/1873-3468.12174.
8. Cordoba, S. R. Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H / S. R. Cordoba // *Clin. Exp. Immunol.* 151, 1–13. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03552.x.
9. Properties of a *Streptococcus suis* isolate of serotype 2 and two capsular mutants / S. I. Salasia // *Vet. Microbiol.* – 1995. 45, 151–156. doi: 10.1016/0378-1135(95)00036-A.
10. Esgleas, M. *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins / M. Esgleas, S. Lacouture, M. Gottschalk // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2005. – 244, 33–40. doi: 10.1016/j.femsle.2005.01.017.
11. Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells / L. Benga [et al.] // *Cell Microbiol.* – 2004. – 6, 867–881. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00409.x.
12. Critical *Streptococcus suis* virulence factors: are they all really critical? / M. Segura [et al.] // *Trends Microbiol.* – 2017. 25, 585–599. doi: 10.1016/j.tim.2017.02.005.
13. Pleiotropic effects of polysaccharide capsule loss on selected biological properties of *Streptococcus suis* / S. Tanabe [et al.] // *Can. J. Vet. Res.* – 2010. 74, 65–70.
14. Donlan, R. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R. M. Donlan, J. W. Costerton // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2002, 15, 167–193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.
15. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholera* / J. Zhu // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2002. 99, 3129–3134. doi: 10.1073/pnas.052694299.
16. Crystal structure and identification of two key amino acids involved in AI-2 production and biofilm formation in *Streptococcus suis* / Y. Wang [et al.] // *LuxS. PLoS One* – 2015. 10:e0138826. doi: 10.1371/journal.pone.0138826.
17. Bonifait, L. Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance / L. Bonifait [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. 74, 4969–4972. doi: 10.1128/AEM.00558-08.
18. Mothey, D. Mucin can enhance growth, biofilm formation, and survival of *Streptococcus mutans* / D. Mothey, B. A. Buttaro, P. J. Piggot // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2014. 350, 161–167. doi: 10.1111/1574-6968.12336.
19. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics / M. E. Olson [et al.] // *Can. J. Vet. Res.* – 2002. 66, 86–92.
20. Grenier, D. Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate / D. Grenier, L. Grignon, M. Gottschalk // *Vet. J.* – 2009. 179, 292–295. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.09.005.

УДК 619:579.27:636.4

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-2-19-22>

Красникова Е.Л., научный сотрудник

Мальчик О.В., научный сотрудник

Мистейко М.М., кандидат ветеринарных наук, доцент

Садовский А.Л., ветеринарный врач-консультант

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

ПОЛИМИКРОБНЫЕ И ПОЛИВИРУСНЫЕ АССОЦИАЦИИ У СВИНЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА С ПРИЗНАКАМИ РЕСПИРАТОРНОЙ ПАТОЛОГИИ НА ПРИМЕРЕ НЕСКОЛЬКИХ СВИНОКОМПЛЕКСОВ НА 24 ТЫСЯЧИ ГОЛОВ

Резюме

В статье приведены данные по изучению вирусно-бактериального профиля у свиней разного возраста в хозяйствах Республики Беларусь. Установлено, что максимальное количество возбудителей КРЗС в большинстве хозяйств выделяется в возрасте 60–80 дней, бактериальная патология накапливается постепенно и, как правило, является вторичной инфекцией (исключение ИАР).

Вирусно-бактериальный профиль зависит от эпизоотической ситуации в хозяйстве. Наиболее полный перечень возбудителей КРЗС (11 из 13) наблюдался в хозяйстве № 4. Первичное выявление в пробах 60–80-дневных поросят генома-возбудителя АПП говорит о более позднем его инфицировании по сравнению с возбудителями гемофиллеза и ИАР. Заражение возбудителем ИАР предположительно происходит в послеродовой период до 40 дней.

Ключевые слова: комплекс респираторных заболеваний свиней, диагностика, свиньи, респираторные инфекции, полимеразная цепная реакция, вирусные инфекции, бактериальные инфекции, геном, ДНК, РНК.

Summary

The article presents data on the study of the viral-bacterial profile in pigs of different ages in the farms of the Republic of Belarus. It has been established that the maximum number of PRDC pathogens in most households is isolated at the age of 60–80 days, bacterial pathology accumulates gradually and, as a rule, is a secondary infection (with the exception of IAR).

The viral and bacterial profile depends on the epizootic situation in the farm, the most complete list of CRPC pathogens (11 out of 13) was observed in farm No. 4. Primary detection in samples of 60–80 day old piglets of the APP pathogen genome indicates its later infection compared to hemophiliasis pathogens and IAR. Infection with the causative agent of IAR presumably occurs in the post-weaning period up to 40 days.

Keywords: complex of porcine respiratory diseases, diagnostics, pigs, respiratory infections, polymerase chain reaction, viral infections, bacterial infections, genome, DNA, RNA.

Поступила в редакцию 11.10.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

В последние 3–5 лет респираторная патология в свиноводческих хозяйствах многих стран мира оценивается не как моноинфекционная причина, а как многофакторная нозологическая единица, получившая название «комплекс респираторных болезней свиней» (КРБС, КРЗС, PRDC). Имея сложное происхождение, включающее инфекционные и неинфекционные агенты, КРЗС чаще всего наблюдается у свиней в возрасте от 1 до 3 месяцев [1, 2].

Мнение о первичности и вторичности инфекционного и неинфекционного начал разделяются в научной среде. Считается, что возникновение респираторной

патологии на фермах поросят может быть связано с первоначальным стрессом транспортировки поросят на фермы, после которого первичное вирусное поражение вызывает вторичную инфекцию бактерий, обитающих у этих животных [1, 2, 3]. Следовательно, основываясь на их способности повреждать эпителий верхних дыхательных путей, травмировать паренхиму легкого и способствовать вторичной бактериальной колонизации, первичные вирусные патогены способны влиять на развитие и исход PRDC [3].

Нами ранее было установлено, что основными патогенами, вызывающими КРЗС в хозяйствах Республики Беларусь,

являются вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС), цирковирус второго типа, а также *Haemophilus parasuis* (HPS), *Streptococcus suis* (SS) и *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) *Bordetella bronchiseptica* (ИАР) [4, 5].

Нашей целью было установить ассоциации встречающихся инфекционных агентов у поросят разного возраста и сравнить их в рамках отдельных свиноводческих хозяйств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами в 2018–2019 гг. проведены исследования патологического материала из 6 хозяйств Минской области Республики Беларусь, каждому из которых присвоены номера от 1 до 6.

Патологический материал (кусочки легких, печени, почек, селезенки, а также лимфатические узлы) отбирались от поросят 6 различных возрастных групп. В каждой группе отбор патологического материала осуществлялся от 5 голов свиней с признаками респираторной патологии. Всего в исследовании участвовало 180 животных.

ДНК и РНК из патологического материала выделяли набором «Рибосорб» (фирмы «Амплиценс», Россия) согласно инструкции. Количество и чистоту выделенной суммарной ДНК/РНК определяли на приборе «Nanodrop».

Исследования проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме

реального времени. Объем реакционной смеси – 25 мкл. Объем исследуемой РНК – 5 мкл, объем исследуемой ДНК – 2 мкл. Для амплификации использовали следующие программы:

- ДНК 94 °С – 3 минуты, затем 40 повторяющихся циклов 94 °С – 30 секунд, 55 °С – 30 секунд, 72 °С – 15 секунд.

- РНК 42 °С – 45 минут, 3 минуты, затем 40 повторяющихся циклов 94 °С – 30 секунд, 55 °С – 30 секунд, 72 °С – 15 секунд.

В работе использовали созданные, либо тестируемые наборы РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Исследования проводились с целью обнаружения генома 7 бактериальных (*Haemophilus parasuis* (HPS, гемофиллез), *Streptococcus suis* (SS, стрептококкоз) и *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP, актинобациллярная плевропневмония) *Bordetella bronchiseptica* (ИАР инфекционный атрофический ринит), *Pasteurella multocida* (пастереллез), *Chlamydia* (хламидиоз), сальмонеллез и 6 вирусных патогенов (РРСС, цирковирус второго типа, парвовирус свиней, вирус болезни Ауески, трансмиссивный гастроэнтерит, классическая чума свиней (КЧС)).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты наших исследований отражены на рисунке.

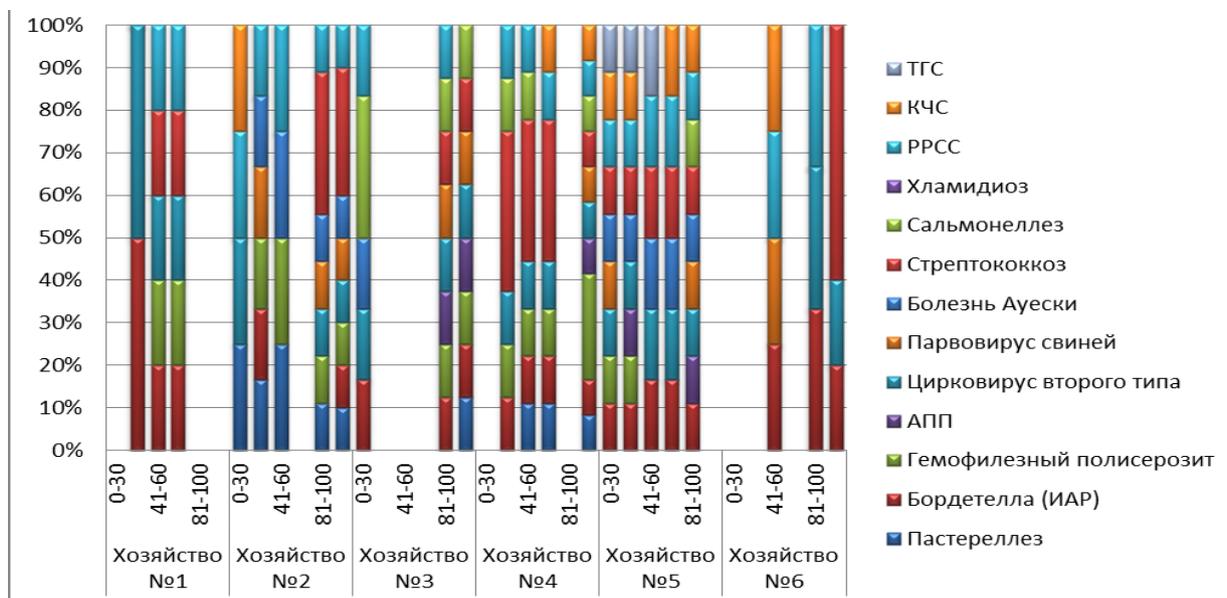


Рисунок. – Вирусно-бактериальный профиль, выявленный методом ПЦР в шести свиноводческих хозяйствах у животных разного возраста

Как видно из рисунка, у свиней возрастной группы 0–30 дней наблюдалось минимальное число патогенов:

- в двух хозяйствах (33 %) выделялся геном возбудителя инфекционного атрофического ринита;

- в трех (50 %) – геном цирковируса второго типа и РРСС;

- в одном (16,6 %) – геном возбудителей стрептококкоза, сальмонеллеза и ТГС.

У свиней возрастной группы 30–40 дней:

- в четырех хозяйствах (66 %) – геном возбудителя инфекционного атрофического ринита;

- в трех хозяйствах (50 %) – геномы гемофиллезного полисерозита, цирковируса второго типа, стрептококкоза и РРСС;

- в двух свиноккомплексах (33 %) – ТГС;

- в одном (16,6 %) – сальмонеллеза.

Примечательно, что в хозяйствах, из которых отбирались пробы в интервале 0–30 и 30–40 дней, видовой состав выделяемых патогенов несколько изменился. Так, во втором хозяйстве кроме вируса РРСС выявлены возбудители ИАР и гемофиллезного полисерозита. А в пятом хозяйстве к ранее выявленным антигенам добавился возбудитель ИАР, что может быть связано с переводом животных из одной группы в другую (отъем).

У свиней возрастной группы 40–60 дней нами выделен геном следующих возбудителей:

- в трех хозяйствах (50 %) – геном инфекционного атрофического ринита, гемофиллезного полисерозита, цирковируса второго типа, РРСС;

- на двух свиноккомплексах (33 %) – ТГС и стрептококк;

- в одном хозяйстве (16,6 %) – геном сальмонеллеза в сочетании с ТГС.

У свиней возрастной группы 60–80 дней:

- в четырех хозяйствах (66 %) выявлен геном возбудителя инфекционного атрофического ринита и РРСС;

- в двух хозяйствах (33 %) – геном возбудителей гемофиллезного полисерозита и стрептококкоза;

- в одном хозяйстве (16,6 %) – геномы возбудителей актинобактериальной пневмонии и парвовируса.

В первом хозяйстве наблюдается наиболее полный набор возбудителей КРЗС (геном возбудителей АПП, гемофиллезного полисерозита, инфекционного атрофического ринита, цирковируса второго типа, РРСС).

В пятом хозяйстве сочетание выявленного генома возбудителя парвовируса свиней и РРСС может быть маркером, предполагающим наличие в хозяйствах репродуктивной патологии, вызываемой этими агентами.

У свиней возрастной группы 80–100 дней:

- в четырех хозяйствах (66 %) – геном возбудителя цирковируса второго типа, стрептококкоза;

- в трех хозяйствах (50 %) – геном гемофиллезного полисерозита и РРСС, инфекционного атрофического ринита, АПП.

В первом и четвертом хозяйствах наблюдается сочетанная вирусно-бактериальная респираторная патология (геномы возбудителей АПП, гемофиллезного полисерозита, инфекционного атрофического ринита, цирковируса второго типа, РРСС).

Кроме того, в четвертом хозяйстве выявляются геномы возбудителей вирусных инфекций, вызывающих не только респираторную, но и репродуктивную патологию (цирковирус второго типа, РРСС, парвовирус свиней).

У свиней возрастной группы 100–120 дней выявлен геном следующих возбудителей:

- в трех хозяйствах – геном возбудителя инфекционного атрофического ринита, цирковируса второго типа, РРСС;

- на двух комплексах – геномы гемофиллезного полисерозита, стрептококкоза и парвовируса;

- в одном хозяйстве – АПП.

В четвертом хозяйстве установлено вирусно-бактериальное постоянство, начиная с 80-дневного возраста.

Исследование проб от свиней в возрасте более 120 дней проводилось только из третьего и шестого хозяйств, где нами установлен устойчивый вирусно-бактериальный статус ранее выделенных инфекционных агентов.

В третьем хозяйстве, кроме ранее обнаруженного генома возбудителей вирусно-бактериальной патологии, выявлял-

ся геном возбудителей сальмонеллеза и стрептококкоза. В шестом хозяйстве выделялся геном возбудителей инфекционного атрофического ринита, цирковируса второго типа и стрептококкоза.

Анализ выделяемости генома возбудителей указывает на то, что количество генома цирковируса второго типа увеличивается к 80–120-дневному возрасту и в промежутке 31–40 дней. Это может вызывать симптоматику и патологоанатомическую картину, характерную для цирковиральной инфекции.

Только во втором хозяйстве наблюдалась стойкая персистенция возбудителя пастереллеза у всех возрастных групп.

Во всех хозяйствах присутствует инфицирование возбудителем ИАР, причем, исходя из полученных данных, можно говорить о заражении данным возбудителем в период до 40 дней, затем длительной персистенции без видимых клинических признаков, возможно, на фоне применения антимикробных препаратов с положительными результатами в ПЦР уже в возрасте более 100 дней с характерной клинической картиной, о чем свидетельствуют дополнительные анамнестические данные, полученные в ходе проведения исследований.

В шестом хозяйстве не выявлен возбудитель гемофиллезного полисерозита. В свою очередь, в пятом хозяйстве геном возбудителя выявлялся только из проб, полученных от свиней в возрасте 31–40 дней в виде смешанной инфекции с АПП.

В двух хозяйствах персистенция возбудителя АПП не обнаруживалась, тогда как геном возбудителя АПП в хозяй-

ствах № 3 и № 4 обнаруживался только у свиней откормочного возраста и тоже в сочетании с геномом возбудителя гемофиллезного полисерозита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Максимальное количество возбудителей КРЗС в большинстве хозяйств выделяется в возрасте 60–80 дней, бактериальная патология наслаивается постепенно и, как правило, является вторичной инфекцией (исключение ИАР).

Вирусно-бактериальный профиль зависит от эпизоотологической ситуации в хозяйстве, наиболее полный перечень возбудителей КРЗС (11 из 13) наблюдался в четвертом хозяйстве.

Первичное выявление в пробах 60–80-дневных поросят генома возбудителя АПП говорит о более позднем его инфицировании по сравнению с возбудителями гемофиллеза и ИАР.

Заражение возбудителем ИАР предположительно происходит в послеотъемный период до 40 дней.

Исходя из полученных результатов можно предположить, что в данных хозяйствах первичными патогенами являются возбудители РРСС, цирковируса второго типа и ИАР. В хозяйствах наблюдается сочетанная вирусно-бактериальная респираторная патология (выделены геномы возбудителей АПП, гемофиллезного полисерозита, инфекционного атрофического ринита, цирковируса второго типа РРСС). Бактериальные патогены являются факторами, осложняющими течение респираторной патологии свиней и усугубляющими поражения со стороны дыхательной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Co-infection analysis of bacterial and viral respiratory pathogens from clinically healthy swine in Eastern China* / H. Zhu [et al.] // *Veterinary medicine and science*. – 2021. – 7(5). – P. 1815–1819.
2. *The Role of Pathology in the Diagnosis of Swine Respiratory Disease* / G. Sarli [et al.] // *Veterinary sciences*. – 2021. – 8 (11). – P. 256.
3. *Полимикробная респираторная болезнь у свиней* / Т. Оприессниг [et al.] // *Здоровье Res.* – 2011. – Rev. 12. – С. 133–148.
4. *Эффективность трех систем выделения для диагностики возбудителей PRDC-комплекса* / Е. Л. Красникова [и др.] // *Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария*. – 2022. – № 1. – С. 56–61.
5. *Красникова, Е. Л. Молекулярно-генетическая детекция Actinobacillus pleuropneumoniae и Haemophilus parasuis* / Е. Л. Красникова [и др.] // *Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария*. – 2022. – № 1. – С. 61–67.

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹

Высоцкий А.Э., кандидат ветеринарных наук, доцент²

Кучвальский М.В., аспирант³

Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент¹

Красникова Е.Л., научный сотрудник¹

Притыченко А.В., кандидат ветеринарных наук, доцент⁴

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

²Научно-исследовательский институт «БиоФарм», г. Минск

³Белорусский государственный университет, г. Минск

⁴УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

ЛАТЕНТНАЯ ТУБЕРКУЛЕЗНАЯ ИНФЕКЦИЯ У НОВОРОЖДЁННЫХ ТЕЛЯТ ТУБЕРКУЛИННЕГАТИВНЫХ КОРОВ

Резюме

При посеве на питательную среду MycCel DW деконтаминированных 6%-ной щавелевой кислотой гомогенатов смесей тканей телят 7–14-дневного возраста, инкубированных в стимуляторе роста ВКГ, в 77,8 % случаев удалось выделить некислоустойчивые и частично кислотоустойчивые микобактерии туберкулёза (МБТ) с дефектной клеточной стенкой, являющиеся маркером туберкулёзной инфекции. Так как телята были 7–14-дневного возраста, скорее всего, имело место трансплацентарная передача инфекции и персистенция МБТ в изменённых формах, незаметных для рутинных методов диагностики. Это подтверждает риск появления в стадах туберкулин-положительных особей и рецидивов болезни без заноса инфекции, а также вызывает необходимость дальнейшего совершенствования противотуберкулёзных мероприятий и использование методов, выявляющих изменённые формы МБТ для формирования неинфицированных стад.

Ключевые слова: микобактерии туберкулёза с дефектной клеточной стенкой, CWD формы микобактерий, телята, диагностика туберкулёза, латентная туберкулёзная инфекция.

Summary

When sowing 6% oxalic acid decontaminated homogenates of 7-14-day-old calf tissue mixtures incubated in a growth stimulant VKG on MycCel DW nutrient medium, non-acid-fast and partially acid-fast cell wall deficient mycobacteria tuberculosis (CWD MBT) which are a marker of tuberculosis infection were isolated in 77,8% of cases. Since the calves were 3-14 days old, there was most likely a transplacental transmission of infection and the persistence of MBT in changed forms that were invisible to routine diagnostic methods. This confirms the risk of tuberculin-positive individuals appearing in herds and relapses of the disease without infection, and also calls for further improvement of anti-tuberculosis measures and the use of methods that detect CWD MBT for the formation of uninfected herds.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis with a defective cell wall, CWD forms of mycobacteria, calves, diagnosis of tuberculosis, latent tuberculosis infection.

Поступила в редакцию 19.09.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на огромный массив сведений о микобактериях туберкулёза (МБТ), проблема латентной (скрытой) туберкулёзной инфекции (ЛТИ) нуждается в дальнейшем изучении. Представления о ЛТИ противоречивы. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определяет её как состояние стойкого иммунного ответа, вызванного присутствием в организме антигенов *Mycobacterium tuberculosis* без клинических проявлений активной формы болезни [1]. Но остаётся неясным, что подразу-

меваются под антигенами *Mycobacterium tuberculosis*, так как до сих пор преобладают представления, признающие этиологическими агентами только микроорганизмы с классическими признаками, описанными на заре микробиологии [2]. В то же время, уже достоверно известно, что МБТ могут существовать в виде форм с дефектной клеточной стенкой – cell wall deficient (CWD-, L-), ультрамелких и фильтрующихся, а также защитных форм [3, 4, 5, 6, 7].

В определении ВОЗ вызывает вопрос

и стойкость иммунного ответа, так как при ЛТИ не всегда развивается реакция на туберкулин. Даже при систематических аллергических исследованиях крупного рогатого скота не удаётся выявить всех инфицированных животных, особенно тех, у которых персистируют изменённые МБТ [8, 9], так как трансформация МБТ в L- и CWD- формы – это, в известной степени, уход от контроля иммунной системы [3, 4].

Неоднозначны и представления об опасности ЛТИ. Вероятность развития активной формы болезни у людей с ЛТИ оценивается в 5–10 % [1], при этом не учитывается, что персистенция МБТ повышает риск развития сахарного диабета, болезней сердечнососудистой системы и опухолей [10, 11, 12]. Считается, что люди с ЛТИ не заразны [1], но этот вывод сделан на основе рутинных методов диагностики, не выявляющих изменённые формы МБТ. Тем не менее, уже достоверно известно о роли фильтрующихся форм, в частности, в трансплацентарной передаче инфекции [13].

Не ясен масштаб распространения ЛТИ. ВОЗ считает, что «...треть населения планеты инфицирована *M. tuberculosis*» [1]. Однако эта цифра явно не учитывает инфицированность изменёнными формами МБТ, так как такие исследования не проводились. В ветеринарной медицине существует представление, что крупный рогатый скот с ЛТИ ещё может оставаться в стаде после оздоровительных мероприятий [8, 9], но в благополучных стадах животных с ЛТИ не должно быть. Тем не менее рецидивы болезни отмечаются даже в странах, считающихся оздоровленными от туберкулёза [14].

Предполагается, что у животных рецидивы туберкулёза возникают при снижении резистентности из-за реверсии L-форм МБТ в классическую форму [8, 9]. Однако явных доказательств этого не получено, процесс может быть гораздо сложнее, так как *in vitro* получить реверсию трудно [4], а *in vivo* переход стабильных L-форм в типичные МБТ происходит только после многократных (иногда не менее 13) пассажей на морских свинках [2].

Для контроля эпизоотической ситуации в стадах предлагается бактериологиче-

ский надзор путём посева патологического материала от туберкулинположительных особей на модифицированную питательную среду Школьниковой для выделения L-форм МБТ [8, 9]. Однако метод не рекомендован для прижизненной диагностики, трудоемок, низкоспецифичен из-за щадящих режимов деконтаминации и позволяет выделять преимущественно осмозависимые формы МБТ [2, 8, 9]. Этим недостатком лишен метод инкубации биологического материала (в том числе взятого при жизни) в специальных стимуляторах роста (ВКГ, МусСел DW) с последующим посевом на соответствующую питательную среду (ВКГ, ВЛАКОН, МусСел DW) [15, 16, 17]. При этом независимо от того, в какой форме в пробе присутствуют МБТ (типичные КУ, вирусоподобные фильтрующиеся, CWD- или L-формы), на питательной среде через 1–10 суток вырастают неокислотоустойчивые (НКУ) CWD МБТ, что отражает одно из направлений стратегии выживания МБТ. Метод успешно используется для прижизненной диагностики и выяснения причин реакций на туберкулин путем посева крови и молока реагирующих на туберкулин коров [16, 17]. Вместе с тем выявление маркеров туберкулёзной инфекции в молоке коров длительно благополучных стад [18, 19] вызывает необходимость изучения инфицированности туберкулинотрицательных животных. Наибольший интерес представляют новорождённые телята, так как их статус в большей степени связан с состоянием здоровья матерей, а не инфицированием из внешней среды.

Цель работы – выявление бактериологических маркеров туберкулёзной инфекции в случайно отобранном патологическом материале новорождённых телят, родившихся от туберкулинотрицательных коров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали патологический материал (гомогенат фрагментов печени, почек, легких, сердца) от 9 телят 7–14-дневного возраста, павших от причин, не связанных с заболеванием туберкулёзом и родившихся от туберкулиннегативных коров 4 благополучных по туберкулёзу хозяйств.

Препараты-отпечатки тканей и препараты-мазки изолятов окрашивали по Kinyoun. Микроскопию проводили на Olympus B51X.

Для посева ткани растирали в ступках, добавляя 6%-ную щавелевую кислоту. Гомогенаты центрифугировали при 3600 g 10 мин. К осадкам добавляли по 5 мл стимулятора роста ВКГ («Hansa») [15], смеси выдерживали 24 ч при температуре 37 °С и высевали на среду МусСел DW [16] (по 2 пробирки). Посевы инкубировали при температуре 37 °С. При отсутствии роста через 1–2 суток проводили «слепые» пассажи.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с электрофоретической детекцией. Изоляты (0,2–0,5 мг/мл) прогревали в лизирующем буфере (5 мин, 95 °С), ДНК выделяли на колонках с сорбентом (ИБОХ НАНБ).

Аmplification проводили на CFX1000 Thermal Cycler (BioRad) с праймерами, синтезированными в ОДО «Праймтех» (Минск):

Режим амплификации: первичная денатурация – 95 °С, 10'; затем 40 циклов – денатурация 94 °С, 30'; отжиг 54 °С, 90'; финальная элонгация 72 °С, 10'.

ДНК части изолятов исследовали в ПЦР с праймерами 16s RNA, MPB 64, MPB 70 («Праймтех») и электрофоретической детекцией продуктов амплификации.

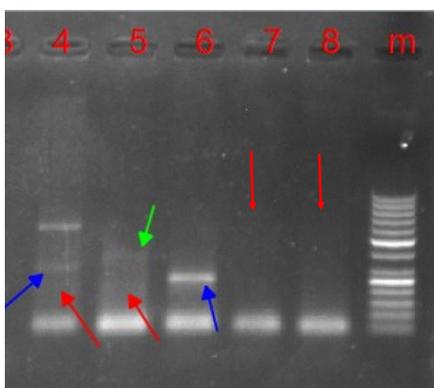
Полипептидный состав изучали в электрофорезе в 10 % ПААГ-ДСН по Laemmli (1970), используя лизат отмытой

бактериальной массы изолятов, полученный прогреванием 7 мин при температуре 98 °С в буферном растворе для нанесения образцов (4x).

Антигенный состав изолятов, изучали в реакции иммунодиффузии (РИД) и в ракетном иммуноэлектрофорезе (РИЭФ) с антисыворотками к СWD МБТ «Br 2/17» [20], к СWD МБТ «Is Hela 3 kD» [21] и к типичному штамму *M. avium* 1603. Соникаты бактериальной массы получали дезинтеграцией на Bandelin Sonopuls 2400 (8x, 4 цикла по 5 мин). Контролями служили соникаты экспериментально полученных штаммов СWD *M. tuberculosis* H37Rv и СWD *M. bovis* 8d, СWD МБТ Is «Hela is 6» [21] и *M. avium* 1603.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При микроскопии препаратов-мазков и препаратов-отпечатков тканей, окрашенных по Kinyoun, ни в одном случае не обнаружено КУ палочковидных форм (МБТ). Тем не менее, из 9 посеянных проб 7 проб (77,8 %) дали рост колоний, которые в 4 случаях (57,1 %) появились в исходном посеве через 3–6 дней, в 2 случаях (28,6 %) – в I «слепом» пересеве и в 1 случае (14,3 %) – во II «слепом» пересеве. Изоляты представляли собой НКУ и частично кислотоустойчивые (ЧКУ) полиморфные палочковидные формы типичные для СWD МБТ, что и подтвердили результаты ПЦР (таблица 1, рисунок 1).



- 4 – № 9/2 пн (MPB 70+, MPB 64+);
 5 – № 9/1 пн (16s RNA+, MPB 64±);
 6 – № 8 мо (MPB 64+);
 7 – № 725 мо (MPB 64±);
 8 – № 1 мо (MPB 64±)

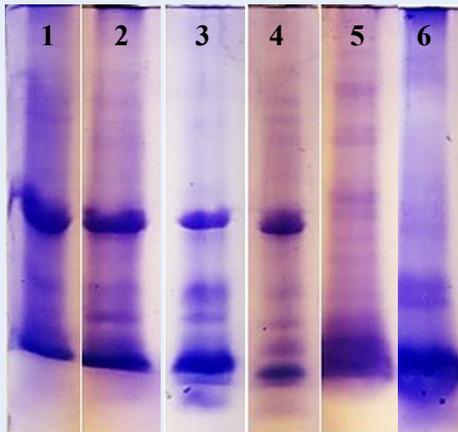
Рисунок 1. – Результат ПЦР с ДНК изолятов

ЭПИЗООТОЛОГИЯ

Таблица 1. – Посев патологического материала телят, деконтаминированного 6%-й щавелевой кислотой на среду МусСел DW и идентификации изолятов в ПЦР

№, возраст, ПЦР	Морфология изолятов и её изменение при пересевах		
Хозяйство «ПН»			
№ 9/2 пн, 14 дней, MPB 70+ , MPB 64±			
№ 9/1 пн, 14 дней, 16s RNA+ MPB 64±			
Хозяйство «МО»			
№ 8 мо, 14 дней, MPB 64+			
№ 725 мо, 10 дней, MPB 64±			
№ 1 мо, 14 дней, MPB 64±			
Хозяйство «СТ»			
«Ст 2», 7 дней, Is 6110+			
Хозяйство «ХО»			
«Хо 3», 14 дней, Is 6110+			

Несмотря на то, что по результатам ПЦР изоляты можно отнести к комплексу *tuberculosis-bovis*, они имели различающиеся полипептидные спектры (рисунок 2).

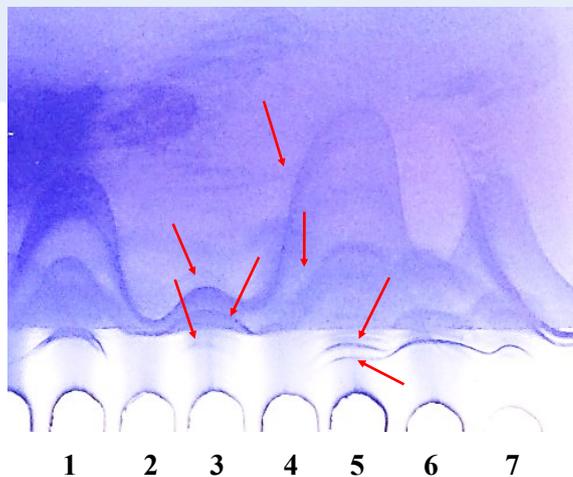


- 1 – CWD *M. bovis* 8 dm;
- 2 – изолят 9/2 пн (MPB 70+, MPB 64+);
- 3 – изолят № 725 мо (MPB 64±);
- 4 – изолят 1мо (MPB 64±);
- 5 – изолят 9/1 пн (16s RNA+, MPB 64±);
- 6 – изолят № 8 мо (MPB 64±)

Рисунок 2. – ЭФ в 12% ПААГ-ДСН

Если изоляты 9/2 пн (MPB 70+, MPB 64+), 725 мо (MPB 64±), 1 мо (MPB 64±) были по спектру очень близки к экспериментально полученному штамму CWD *M. bovis* 8 dm, то спектры изолятов 8 мо (MPB 64±) и 9/1 пн (16s RNA+, MPB 64±)

отличались. Тем не менее, по данным РИ-ЭФ, их антигенный состав практически не отличался от состава штамма CWD *M. bovis* 8 dm и был близок к составу CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv dm (рисунок 3).

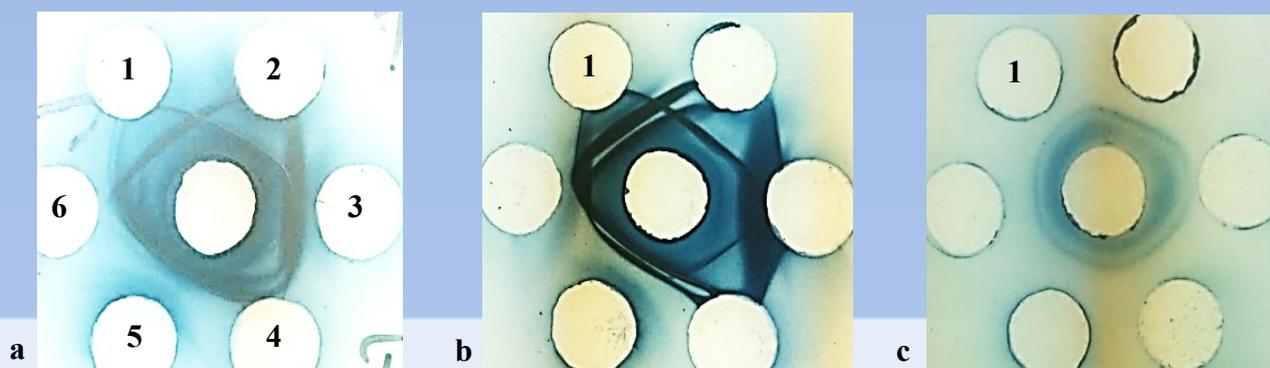


- 1 – CWD *M. bovis* 8 dm; 2 – изолята № 8 мо (1:4); 3 – изолята № 8 мо (1:1);
 - 4 – изолята № 9/1 пн; 5 – изолята № 725 мо; 6 – CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv dm;
 - 7 – CWD МБТ «Br 2/17» (стрелки преципитаты общих антигенов с CWD *M. bovis* 8 dm и CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv dm).
- геле агарозы антисыворотка к CWD МБТ «Br 2/17»

Рисунок 3. – РИЭФ соникатов

У изолятов «Ст 2» и «Хо 3» антигенный состав также не отличался от состава CWD *M. bovis* 8 dm и CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv dm. Варьировала только концентрация отдельных антигенов (рисунок 4). Ин-

тересно, что в РИД с антисывороткой к типичному штамму *M. avium* 1603 изоляты формировали плавно сливающиеся преципитаты.



а – к CWD МБТ «Br 2/17»; б – к CWD МБТ «Is Hela 3 kD»;
 с – к *M. avium* 1603 и соникатов: 1 - CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, 2 – «Ст 2»;
 3 – CWD *M. bovis* 8d; 4 – «Хо 3»; 5 – CWD *M. bovis* Ne;
 6 – Is «Hela is 6» (расположение одинаковое)

Рисунок 4. – РИД антисывороток (в центре)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из тканей 77,8 % обследованных новорождённых телят туберкулиннегативных коров пяти благополучных стад выделены CWD формы МБТ, являющиеся бактериологическим маркером туберкулёзной инфекции. Так как возраст телят составлял всего 7–14 дней, скорее всего, имела место трансплацентарная передача инфекции, причём в виде фильтрующихся вирусоподобных форм, как и при активном заболевании коров [22].

МБТ персистировали у телят явно в изменённой форме, что делало их незаметными для рутинных методов диагностики. С помощью специального метода посева с использованием стимулятора роста и соответствующей питательной среды были вы-

делены CWD-формы МБТ, несколько отличавшиеся друг от друга по полипептидному составу, что, возможно, связано с персистенцией у матерей МБТ бычьего или человеческого вида.

Обнаружение латентной туберкулёзной инфекции у телят в известной степени, объясняет обнаружение генома и CWD МБТ в молоке туберкулинотрицательных коров благополучных стад [18, 19] и подтверждает риск постоянного появления туберкулинпозитивных особей и даже рецидивов болезни без заноса инфекции. Это вызывает необходимость дальнейшего совершенствования противотуберкулёзных мероприятий и использования методов, выявляющих изменённые формы МБТ для формирования неинфицированных стад.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Latent tuberculosis infection: updated and consolidated guidelines for programmatic management [Electronic resource] : World Health Organization. – Mode of access: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/260233>. – Date of access: 23.09.2022.*
2. Дорожкова, И. Р. *Скрыто протекающая туберкулёзная инфекция* / И. Р. Дорожкова, З. С. Земскова. – М. : Медицина, 1984. – 222 с.
3. Tefu, L. *Mycobacterium tuberculosis L-forms* / L. Tefu, H. Guliang // *Microbial Ecology in Health and Disease*. – 1999. – Vol. 10. – P. 129–133.
4. Mattman, L. *Cell Wall Deficient Forms – Stealth Pathogens* / L. Mattman. – 3rd ed. – CRC Press Boca Raton, 2001. – 416 p.
5. Гольшевская, В. И. *Роль ультрамелких форм микобактерий в патоморфозе туберкулёза* / В. И. Гольшевская // *Пробл. туберкулёза*. – 2003. – № 3. – С. 26–30.
6. Slavchev, G. *Stress-induced L-forms of M. bovis: challenge to survivability* / G. Slavchev, L. Michailova, N. Markova // *New Microbiologica*. – 2013. – Vol. 36. – P. 157–166.

7. Sporulation in mycobacteria / J. Ghosh [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106, № 26. – P. 10781–10786.
8. Хамзин, А. З. Роль L-форм микобактерий в эпизоотологии туберкулеза крупного рогатого скота и прогнозирование эпизоотической ситуации с помощью бактериологического надзора : дисс. ... канд. ветеринар. наук : 16.00.03 / А. З. Хамзин. – Казань, 2001. – 167 л.
9. Семенов, В. И. Латентная туберкулезная инфекция и ее роль в эпизоотологии туберкулеза крупного рогатого скота : дисс. ... канд. ветеринар. наук : 16.00.03 / В. И. Семенов. – Благовещенск, 2003. – 100 л.
10. Смурова, Т. Ф. Туберкулез и сахарный диабет / Т. Ф. Смурова, С. И. Ковалева. – М. : Медкнига, 2007. – 317 с.
11. Dooley, K. Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics / K. Dooley, R. Chaisson // *Lancet Infect. Dis*. – 2009. – Vol. 9. – P. 737–746.
12. 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.
13. Mother-to-newborn transmission of mycobacterial L-forms and Vδ2 T-cell response in placentobiotome of BCG-vaccinated pregnant women / T. Dimova [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – P. 1–11.
14. Humphrey, H. M. Bovine tuberculosis slaughter surveillance in the United States 2001–2010: assessment of its traceback investigation function / H. M. Humphrey, K. A. Orloski, F. J. Olea-Popelka // *BMC Veterinary Research*. – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 182.
15. Власенко, В. В. Туберкулез в фокусе проблем современности / В. В. Власенко. – Винница : Наука, 1998. – 350 с.
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. Лемши, А. П. Ранняя диагностика туберкулеза крупного рогатого скота на основе выявления бактериологического маркера инфекции : автореф. дисс. ... канд. ветеринар. наук : 16.00.03 / А. П. Лемши. – Минск, 2008. – 21 с.
18. 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.
19. Обнаружение маркеров туберкулезной инфекции в ультрапастеризованном молоке, произведенном в разных странах / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2021. – № 2. – С. 13–26.
20. CWD Tuberculosis Found in Spongiform Disease Formely Attributed to Prions: Its Implication towards Mad Cow Disease, Scrapie and Alzheimer's / A. P. Lysenko [et al.] // *Journal of Molecular Pathological Epidemiology*. – 2017. – Vol. 3, № 3. – P. 1–13.
21. Возможная роль туберкулезной инфекции в возникновении опухолей / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2020. – № 1. – С. 53–69.
22. Трансплацентарная передача туберкулезной инфекции у коров, зараженных *Mycobacterium bovis* / А. П. Лысенко [и др.] // *Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария*. – 2021. – № 2. – С. 18–26.

ПРЕПАРАТ ВЕТЕРИНАРНЫЙ

ХРОМАРЦИН



**ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГИПОМИКРОЭЛЕМЕНТОЗОВ,
ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА МОЛОДНЯКА
И ЕГО СОХРАННОСТИ**

НАНОЧАСТИЦЫ ЖЕЛЕЗА, ЦИНКА, МАРГАНЦА

- улучшают работу сердечной мышцы;
- ускоряют ключевые биохимические процессы;
- повышают обмен веществ



УДК 619:616-07:619:616.98:578.831.31:636.4
<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-2-30-34>

Красникова Е.Л., научный сотрудник
Садовский А.Л., ветеринарный врач-консультант

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

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР РЕАЛ-ТАЙМ В МОНИТОРИНГЕ ПАТОЛОГИИ СВИНЕЙ, ВЫЗВАННОЙ ЦИРКОВИРУСОМ ВТОРОГО ТИПА

Резюме

В статье приведены данные по персистенции цирковируса второго типа в одном из хозяйств Республики Беларусь. Установлено наличие генома возбудителя у свиней разного возраста, приведены сравнительные данные результатов ПЦР- и ИФА-исследований.

Ключевые слова: комплекс респираторных заболеваний свиней, диагностика, свиньи, респираторные инфекции, полимеразная цепная реакция, вирусные инфекции, цирковирус второго типа, геном, ДНК, РНК, иммуноферментный анализ.

Summary

The article presents data on the persistence of type 2 circovirus in one of the farms of the Republic of Belarus. The presence of the pathogen genome in pigs of different ages was established, and comparative data on the results of PCR and ELISA were presented.

Keywords: complex of respiratory diseases of pigs, diagnostics, pigs, respiratory infections, polymerase chain reaction, viral infections, circovirus of the second type, genome, DNA, RNA, enzyme immunoassay.

Поступила в редакцию 28.06.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Цирковиральная инфекция свиней – мультисистемное заболевание, возбудителем которого является цирковирус свиней.

Цирковирусы входят в состав рода *Circovirus* семейства *Circoviridae* – это представители семейства мелких (17 нм) безоболочечных вирусов икосаэдральной формы, содержащих кольцевую одноцепочечную ДНК. Представители семейства были впервые обнаружены в прошлом столетии. Семейство *Circoviridae* включает три рода: *Circovirus*, *Gyrovirus* и *Anellovirus* [1, 2].

Цирковиральные инфекции свиней распространены в странах с развитым свиноводством. В то время как ЦВС-1 не патогенен для рассматриваемого вида животных, ЦВС-2 является первичным этиологическим агентом синдрома мультисистемного истощения поросят-отъемышей (СМИО), ассоциирован с синдромом нефропатии и дерматитов поросят (СНДП), вовлечен в респираторную и репродуктивную патоло-

гию свиней. Кроме того, может вызывать клинические симптомы заболеваний пищеварительной, лимфатической, кровеносной и нервной систем, а также изменений на коже [3].

Доказано, что источником возбудителя инфекции являются больные и латентно инфицированные свиньи различных возрастных групп, у которых вирус выделяется с фекалиями, слюной и слезной жидкостью, а также присутствует в сыворотке крови инфицированных животных [2].

ЦВС-2 может вызывать у свиней персистирующую инфекцию. ДНК ЦВС-2 обнаруживали в тканях свиней, подвергшихся убою на 125 день после заражения [4, 5]. Свиньи, хронически инфицированные ЦВС-2, встречались как в благополучных, так и в неблагополучных по СПМИ хозяйствах [6]. Совместное использование современных методов ПЦР (полимеразная цепная реакция) и ИФА (иммуноферментный анализ) диагностики позволяет своевременно выявлять цирковирус и антитела

к нему, а следовательно, корректировать методы и схемы профилактики данного заболевания.

Цель работы – определить персистенцию цирковируса второго типа у свиней с респираторной патологией методом ПЦР реал-тайм. Сравнить результаты ПЦР и ИФА сывороток крови животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы использовали сыворотки крови от свиней разного возраста и физиологического состояния, а также патологический материал и сперму из хозяйства закрытого типа, полного цикла. Завоз поголовья со стороны не проводился. Хозяйство благополучно по цирковирусу второго типа, соответственно, вакцинация не проводилась.

Ранее проведенные клинические исследования животных указывают на наличие респираторной и репродуктивной патологии. Отдельные клинические признаки (пневмонии, нефропатия) свидетельствуют о возможной циркуляции цирковируса второго типа.

Выделение ДНК проводили набором ДНК/РНК-фактор (фирмы «Ветфактор», Россия), согласно прилагаемой к набору инструкции.

Для постановки ПЦР использовали набор «PCV-2 PCR REAL TIME», сконструированный в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Выше-

лесского» согласно прилагаемой инструкции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анамнестические данные 2020–2021 гг. указывают на единичные случаи возникновения клинической картины, схожей с цирковирусной инфекцией.

В декабре 2021 г. были проведены исследования сывороток крови в ИФА набором фирмы Ingenasa (Испания) и получены положительные результаты, указывающие на наличие в сыворотках антител к цирковирусу второго типа. Эти же сыворотки были объединены и привезены в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», где проведены ПЦР-исследования и получены следующие результаты (рисунок 1).

Установлено, что 3 пробы сыворотки были отрицательными, 1 проба сомнительная, остальные положительные. Исходя из проведенных ранее исследований нами установлено, что при Ct 25–27 в ПЦР количество геном-эквивалента указывает на то, что в пробах достаточно вируса для развития инфекционного процесса, а при Ct 30 и выше наиболее часто можно говорить о носительстве вируса без видимой клинической патологии. Так, у поросят в возрасте до 25 дней и в 70–80 дней количество генома вируса незначительно, тогда как количества антител достаточно для формирования иммунитета.

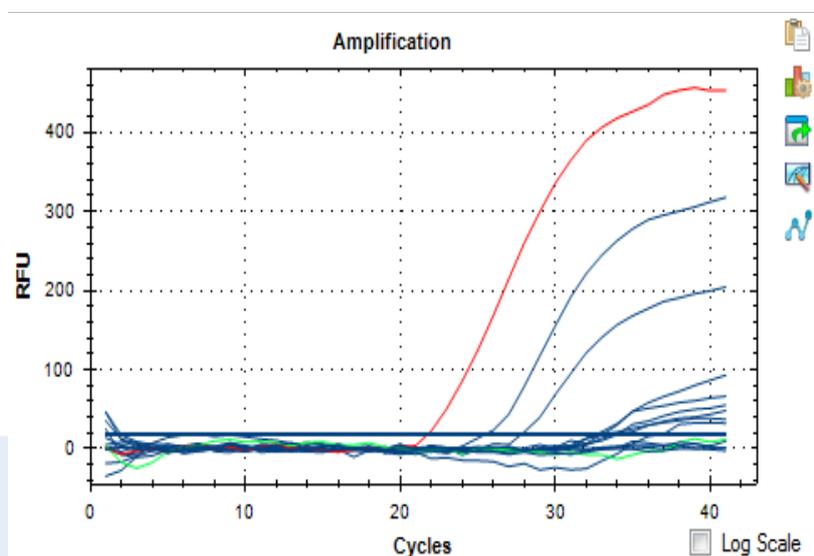


Рисунок 1. – Результаты ПЦР-реал-тайм ДНК, выделенной из сывороток крови свиней с праймерами к цирковирусу второго типа

ИФА-набор фирмы Ingenasa, согласно инструкции, позволяет интерпретировать данные и диагностировать стадию

развития инфекционного процесса с отличием вакцинных титров антител от инфекционных (таблица 1).

Таблица 1. – Результаты ИФА- и ПЦР-сывороток крови свиней разного возраста

Животные и возраст	Интерпретация результатов ИФА	Соотношение Ig G/IgM	Результаты ПЦР, Ст
Поросята 25 дней	колостральные антитела	1,1/0,2	32,81
Поросята 50 дней	хроническое инфицирование или пост-вакцинальные антитела	0,46/0,28	30,55
Свиньи 70–80 дней	нет инфекции	0,22/0,34	32,15
Свиньи 100 дней	острое инфицирование у 30 % исследуемых	0,5/0,88	23,32
Свиньи 130 дней	хроническая инфекция у 30 % недавно инфицированных	1,82/0,84	25
Свиньи 170 дней	хроническое инфицирование или пост-вакцинальные антитела	1,85/0,49	28,42
Ремонтные свинки перед осеменением	хроническое инфицирование или пост-вакцинальные антитела	1,86/0,54	28,49
Ремонтные свинки 80 дней супоросности	хроническое инфицирование или пост-вакцинальные антитела	1,48/0,48	28,22
Свиньи 1–2 опороса	хроническое инфицирование или пост-вакцинальные антитела	1,3/0,36	24,89
Свиньи 3–4 опороса	хроническое инфицирование или пост-вакцинальные антитела	1,37/0,4	28,73
Свиньи 5–6 опороса	50/50 – хроническое инфицирование и чистые животные, присутствует 1 проба от недавно инфицированного животного	0,9/0,53	34,38

Примечание – получение полной корреляции невозможно, т.к. для ПЦР-исследования использовались объединенные пробы, в каждой пробе объединялись по 6 сывороток крови

В хозяйстве вакцинация против цирковируса второго типа не проводилась, так как оно считалось благополучным, поэтому можно с полной уверенностью утверждать, что в сыворотках крови хронически инфицированных животных с характерной клинической картиной присутствует достаточное количество вирусного генома, равное 10^5 – 10^6 геном-эквивалента, что, по данным исследователей [6], достаточно для наличия характерной клинической картины. В сыворотках крови групп хронически инфицированных животных, в которых до 30 % животных с острым инфицированием, количество геном-эквивалента 10^6 – 10^7 в мл.

При хроническом инфицировании Ст

составляло 32–34, что соответствовало 10^3 – 10^4 геном-эквивалента/мл.

У свиней в возрасте 70–80 дней антитела отсутствовали, но при постановке ПЦР установлено наличие генома вируса в количестве 10^2 – 10^3 , что говорит о наличии вируса в организме животных в следствие недавнего инфицирования. Эти данные не противоречат исследованиям более ранних источников, в которых указано, что при заражении антитела могут быть обнаружены через 11–90 дней после заражения [7].

Параллельное использование ИФА и ПЦР позволяет в случаях со спорными результатами (например, у свиней в возрасте 170 дней количество и соотношение

иммуноглобулинов указывает на хроническое инфицирование или поствакцинальные антитела, а проведенные ПЦР-исследования указывают на наличие генома в количестве, способном вызывать заболевание, также картина патологоанатомических изменений указывает на пневмонии и нефриты) установить наличие возбудителя и статус инфекции.

Дополнительно были проведены исследования патологического материала от поросят в возрасте 25, 50, 70 и 90 дней.

На вскрытии у таких поросят наблюдались:

- точечные кровоизлияния в почках,

граница коркового и мозгового вещества стерты;

- поражения легких, участки катаральной и геморрагической пневмонии;
- увеличение или уменьшение селезенки;
- кровоизлияния в брыжеечных лимфоузлах;
- дистрофические изменения в печени.

Согласно проведенным ПЦР-исследованиям все пробы были положительными, количество геном-эквивалента цирковируса второго типа незначительно зависело от возраста (рисунок 2).

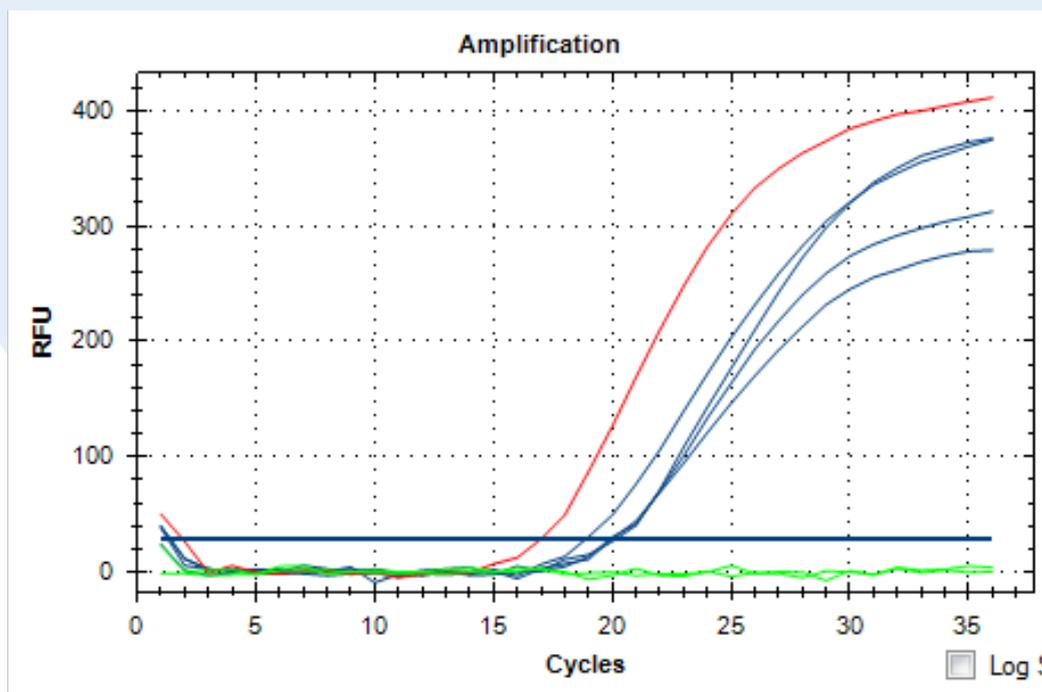


Рисунок 2. – Результаты ПЦР-реал-тайм ДНК, выделенной из патологического материала от свиней разного возраста, с праймерами к цирковирусу второго типа

Во всех возрастных группах поросят, павших с признаками респираторной патологии St составило 18–20, что соответствует геном-эквиваленту 10^7 – 10^8 в мл. Так как при жизни у поросят наблюдалась картина респираторной патологии, а при вскрытии присутствовали признаки мультисистемного поражения, можно сказать, что такого количества вирусного генома достаточно для развития заболевания.

Одним из факторов риска, по литературным источникам, может стать привозная сперма [6]. Нами были проведены ис-

следования четырех спермодоз на наличие возбудителя цирковируса. По результатам проведенных исследований установлено, что в сперме отдельных хряков выявлялся геном цирковируса второго типа, причем количество соответствовало 10^5 геном-эквивалента/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В хозяйстве, где проводились наши исследования, геном цирковируса второго типа обнаруживается не только в сыворотках крови свиней, но и в патологическом

материале в количестве 10^5 – 10^8 геном-эквивалента/мл, способном вызвать заболевание у животных.

Используемая в хозяйстве сперма содержит геном цирковируса второго типа, что может быть источником инфицирования.

В зависимости от стадии заболевания данные ПЦР и ИФА коррелируют друг с другом, при первичном недавнем инфицировании животных результаты ПЦР положительные при отсутствии антител в сыворотках крови.

Набор ПЦР реал-тайм, разработанный в РУП «Институт экспериментальной

ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», позволяет выявлять геном цирковируса второго типа из сывороток крови свиней разного возраста. Исследования сывороток крови методом ПЦР позволяют контролировать ситуацию в стаде и своевременно выявлять животных, недавно инфицированных цирковирусом второго типа.

Одновременное использование в диагностике цирковируса второго типа ПЦР и ИФА позволяет сделать своевременные выводы о благополучии хозяйства по данному заболеванию, а следовательно, скорректировать методы и схемы профилактики.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. *Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication* / G. M. Allan [et al.] // *Arch. Virol.* – 2000. – Vol. 145. – № 11. – P. 2421–2429.
3. Гречухин, А. Н. Особенности проявления цирковирусной инфекции свиней и ее специфическая профилактика / А. Н. Гречухин // *Свиноводство*. – 2010. – № 2. – С. 48–50.
4. Krakowka, S. Features of cell degeneration and death in hepatic failure and systemic lymphoid depletion characteristic of PCV-2-associated postweaning multisystemic wasting disease (PMWS) / S. Krakowka, J. Ellis, F. McNeilly // *Vet. Pathol.* – 2004. – № 41. – P. 471–481.
5. *Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus* / S. Krakowka [et al.] // *Vet. Pathol.* – 2000. – Vol. 37. – № 3. – P. 254–263.
6. Hamel, A. L. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus / A. L. Hamel, L. L. Lin, C. Sachvie // *Can. J. Vet. Res.* – 2000. – V. 64. – P. 44–52.
7. *PCR detection and proof of isolation of porcine circovirus type 2 in boar semen* / R. Larochelle // *J Clin Microbiol.* – 2000; 38. – P. 4629–4632.



**ПРЕПАРАТ
ВЕТЕРИНАРНЫЙ**

КМП ПЛЮС



- содержит железо, йод, селен, цинк, марганец, кобальт;
- профилактика заболеваний крупного рогатого скота и свиней, обусловленных дефицитом входящих в его состав биоэлементов;
- лечение телят, больных энзоотическим зобом, железодефицитной анемией, беломышечной болезнью, токсической дистрофией печени;
- улучшение воспроизводительной функции коров и свиноматок, профилактика у них родовой и послеродовой патологии;
- повышение жизнеспособности новорожденного молодняка



УДК 619:578.833.3:578.2(476)

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-2-35-41>

Дубаневич О.В., старший научный сотрудник
Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук, доцент

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

ВИРУСНЫЕ ПНЕВМОЭНТЕРИТЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ХОЗЯЙСТВАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Резюме

В статье приводятся результаты этиологической структуры пневмоэнтеритов крупного рогатого скота (КРС) в животноводческих хозяйствах Республики Беларусь за период 2020–2021 гг. на основе анализа результатов собственных исследований, описана роль ассоциаций вирусов, участвующих в их возникновении.

Среди этиологических причин пневмоэнтеритов КРС выделяют такие инфекции, как вирусная диарея, инфекционный ринотрахеит, парагрипп-3, респираторно-синцициальная инфекция, рота- и коронавирусные инфекции, наносящие значительный экономический ущерб животноводству.

Профилактика заболеваний – важнейшая задача современного животноводства. Во многих случаях профилактические меры способны предупредить развитие заболеваний или сделать их прогноз и последствия более благоприятными. Профилактику и лечение предваряет быстрая и точная лабораторная диагностика. Помимо установления этиологии заболевания лабораторная диагностика имеет важное значение в установлении эпизоотической ситуации и в организации противоэпизоотических мероприятий.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, инфекция, вирус вирусной диареи, инфекционный ринотрахеит, вирус парагриппа типа 3 (ПГ-3), вирус респираторно-синцициальной инфекции, рота- и коронавирус, пневмоэнтериты.

Summary

The article describes the etiological structure of pneumoenteritis in cattle (cattle) in livestock farms of the Republic of Belarus for the period 2020–2021. based on the analysis of the results of our own research and describes the role of associations of viruses involved in their occurrence.

Among the etiological causes of pneumoenteritis in cattle, there are such infections as BVDV, IBR, PIV-3, BRSV, bovine rotavirus and bovine coronavirus infections that cause significant economic damage to livestock. Prevention of diseases is the most important task of modern animal husbandry. In many cases, preventive measures can prevent the development of diseases or make their prognosis and consequences more favorable. Prevention and treatment requires rapid and accurate laboratory diagnosis. In addition to establishing the etiology of the disease, laboratory diagnostics is important in establishing the epizootic situation and in organizing anti-epizootic measures.

Keywords: polymerase chain reaction, infection, bovine viral diarrhea virus, infectious bovine rhinotracheitis, Parainfluenza virus type 3, Bovine Respiratory Syncytial Virus, bovine rotavirus, bovine coronavirus, pneumoenteritis.

Поступила в редакцию 28.11.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы вирусной диареи (ВД), инфекционного ринотрахеита (ИРТ), парагриппа типа 3 (ПГ-3), респираторно-синцициальной инфекции (РСИ), рота- и коронавирусной инфекции КРС, вызывающие пневмоэнтериты, являются одной из основных причин недополучения животноводческой продукции. Ущерб складывается из абортос в разные периоды стельности, рождения мертвых телят, у молодняка КРС проявляется снижением привеса и падежом, дополнительными расходами на лечение и кормление. Вирусные заболевания

часто осложняются секундарной микрофлорой, условно-патогенными бактериальными инфекциями (пастереллез, сальмонеллез, колибактериоз, стрептококкоз, стафилококкоз, хламидиоз, микоплазмоз и др.) Телята, переболевшие вирусными пневмоэнтеритами в раннем возрасте, теряют до 20 % будущей мясной и молочной продуктивности, оставаясь вирусносителями и источниками инфекции в стаде [1, 10].

Для предотвращения вирусных заболеваний и осложнений, связанных с бактериальными инфекциями, для коррекции специфической профилактики в хозяйст-

ствах, занимающихся промышленным животноводством, следует регулярно, не менее 2-3 раз в год, проводить вирусологический мониторинг состояния поголовья КРС по основным вирусным заболеваниям, вызывающим пневмонии, энтериты и пневмоэнтериты: ВД, ИРТ, ПГ-3, РСИ, рота- и коронавирусной инфекциям. За два года (2020-2021 гг.) нами происследованы пробы биоматериала (патологический материал, сыворотки крови, фекалии, носовая и влагалищная слизь животных) из хозяйств Республики Беларусь.

Клиническая картина. Предрасполагающими факторами массовых вспышек пневмоэнтеритов являются состояние иммунной системы, уровень кормления и содержания животных, наличие стрессовых ситуаций [5].

Вирусы и бактерии вызывают схожие по симптомам болезни. Вирусные инфекции распространены в большей степени, поэтому при появлении симптомов часто предполагают именно их. Вирусные инфекции могут поражать здоровое животное, а вот бактериальные чаще развиваются на фоне ослабленного иммунитета или же являются осложнением перенесенного заболевания [5].

Инфекционный ринотрахеит – острое инфекционное заболевание крупного рогатого скота, характеризующееся поражением органов дыхания и пищеварения у молодняка и половых органов у взрослых животных, также менингоэнцефалитом у телят. Восприимчивые животные – крупный рогатый скот независимо от пола и возраста. Наиболее подвержен молодняк до 2 лет. Более тяжело болезнь протекает у скота мясных пород [5, 9]. Заболеваемость ИРТ может составлять от 30 до 90 % [4, 5, 9]. При инфекционном ринотрахеите летальность достигает 25 %, при осложнении секундарной микрофлорой – до 40 % [5].

Вирусная диарея крупного рогатого скота – контагиозная болезнь, наблюдается у всех возрастных групп во всем мире [3] и носит, как правило, стационарный характер с поражением 10–100 % животных и гибелью 10–90 % заболевших в неблагополучном очаге [7].

Вирусная диарея КРС поражает преимущественно молодых животных. У коров чаще наблюдается латентная форма, которая может приводить к острой инфекции

плодов, могут наблюдаться аборт на любой стадии беременности [3]. По результатам исследований ветеринарных лабораторий Беларуси за 2005 г. выделяемость из исследуемого материала вируса вирусной диареи составила 60–80 % [6], по данным Красочко П.П. за 2010–2011 гг. – 50–70 %.

Респираторно-синцитиальная инфекция – остро протекающая вирусная болезнь телят, характеризующаяся лихорадкой и поражением респираторных органов. У взрослых коров болезнь чаще всего протекает бессимптомно, но иногда отмечаются пневмонии и аборты. По данным Красочко П.А. (2005) серологически положительно реагирует КРС в 44–73 % случаев, по данным других авторов в 20–90 % случаев. Заболеваемость телят составляет до 60 %, летальность – до 20 % [5, 9].

Парагрипп-3 крупного рогатого скота – острое контагиозное заболевание КРС (преимущественно телят до 6-месячного возраста), характеризующееся катарально-гнойным поражением органов дыхания, катаральным конъюнктивитом. Серологически положительно реагирует КРС в 36–67 % случаев [5]. При осложнении парагриппа-3 секундарной (условно-патогенной) микрофлорой летальность может достигнуть 5–10 % от числа заболевших телят. При неоказании терапевтической помощи и отсутствии надлежащих условий содержания летальность животных может повыситься до 20 % [5, 8].

Ротавирусная инфекция телят – остро протекающая болезнь новорожденных телят, характеризующаяся диареей, дегидратацией организма, развитием катарального или катарально-геморрагического гастроэнтерита [5, 9]. В естественных условиях болеют новорожденные телята в возрасте 2–12 дней, но чаще в первые 2–6 дней жизни, когда заболеваемость составляет 75,5–100 % при 30–50%-ной летальности [5, 9]. Более подвержены заболеванию телочки (45,5 %), чем бычки (32,0 %). У взрослых животных заболевание протекает бессимптомно и сопровождается длительным выделением возбудителя во внешнюю среду [5]. Некоторые ученые сообщают, что рота- и коронавирус находили методом ИФА в фекалиях у 40 % клинически здоровых животных [9].

Коронавирусная инфекция широко распространена среди КРС, что подтверж-

дается наличием антител у взрослого скота в 50–100 % случаев [5, 9]. У телят заболевание характеризуется поражением ЖКТ, диареей, иногда со слизью и кровью в каловых массах, дегидратацией организма и истощением. Болезнь регистрируется у телят чаще с 7–18-дневного возраста. Заболеваемость составляет 40–100 %, у взрослых телят 15 % [9]. Летальность среди телят – 15–20 %, среди старших телят 5–7 % [9]. К заболеванию более предрасположены телочки, чем бычки [5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проводили исследования заболеваемости животных ВД, ИРТ, ПГ-3, РСИ, рота- и коронавирусной инфекциями КРС за 2020–2021 годы.

Для определения этиологической структуры ассоциаций вирусов в возникновении пневмоэнтеритов КРС и роли возбудителя вирусной диареи КРС в ней было исследовано 552 пробы биоматериала на наличие генома вирусов ВД, ИРТ, ПГ-3, РСИ, рота- и коронавирусных инфекций КРС. Материалом для исследования явились сыворотки крови, фекалии, носовая и влагалищная слизь, от павших животных – кусочки органов и тканей. Материал для исследования отбирался от КРС из 122 животноводческих хозяйств всех областей Республики Беларусь. Экспериментальная часть работы выполнена на базе отдела молекулярной биологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского».

Для пробоподготовки исследуемых образцов, выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР использовали следующее оборудование, материалы и реактивы: ламинарный шкаф, холодильник с морозильной камерой, микротермостат BIOSAN-SH 100» (Латвия), амплификатор для ПЦР диагностики «С 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США), микроцентрифуга высокоскоростная (14000 об/мин) Jouan (Франция), система для электрофореза «Consort», (Бельгия), рН-метр HANNA 221, система подготовки чистой воды «Crystal B», ADRONA (Латвия), комплект автоматических пипеток «SOCOREX» (Швейцария) 0,1–2 мкл, 0,5–10 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 1–10 мл и наконечники к ним (RNA, DNA free), пробирки типа эппендорф вместимостью 0,5 и 1,5 мл, вортекс «BIOSAN» (Латвия), про-

бирки для ПЦР 0,2 мл для прибора «С 1000 Thermal Cycler», весы аналитические RADWAG AS 220/X (Польша), паровой автоклав.

Выделение ДНК/РНК проводили российским набором «АмплиПрайм РИ-БО-сорб» согласно инструкции по его применению. Постановку ПЦР проводили с помощью разработанных нами на базе отдела молекулярной биологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского» тест-систем для детекции геномов вирусов вирусной диареи, ИРТ, ПГ-3, рота- и коронавирусных инфекций КРС согласно инструкциям по применению.

Для проведения электрофореза полученного ПЦР-продукта использовали 1,5%-ный гель с использованием агарозы (helicon, Россия), маркера молекулярного веса «GeneRuler 50 bp Ladder» (Fermentas, Литва), бромистого этидия (SIGMA, США), буфера для внесения проб, трисборатного буфера для электрофореза с рН–8,3.

Для детекции (визуализации) и анализа продуктов амплификации в агарозном геле использовали GEL DOC XR с программным обеспечением Image Lab Software.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По результатам наших исследований за 2020–2021 г. в биологических пробах от подозреваемых в заболевании, заболевших или павших животных в 89 % исследованных хозяйств были выделены один или более геномов вирусов ИРТ, ВД, ПГ-3, РСИ, рота- и коронавирусной инфекций, а в 11 % вирусы не обнаружены (рисунок 1).

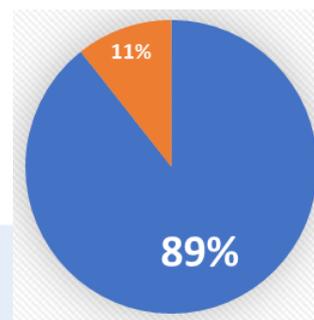
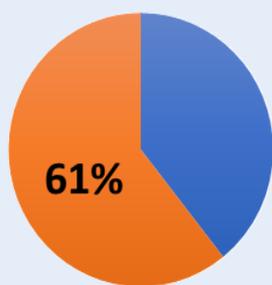


Рисунок 1. – Удельный вес хозяйств, неблагополучных по ИРТ, ВД, ПГ-3, РСИ, рота- и коронавирусной инфекциям КРС (n=122)

В 335 пробах (61 %) от исследуемого материала был обнаружен геном вирусов вирусных инфекций КРС (рисунок 2).

По результатам исследований было установлено, что ИРТ, ВД, ПГ-3, РСИ, рота- и коронавирусные инфекции КРС встречаются в 22–65 % от исследуемых хозяйств. Количество положительных проб при исследовании колебалось от 10 до 40 %.

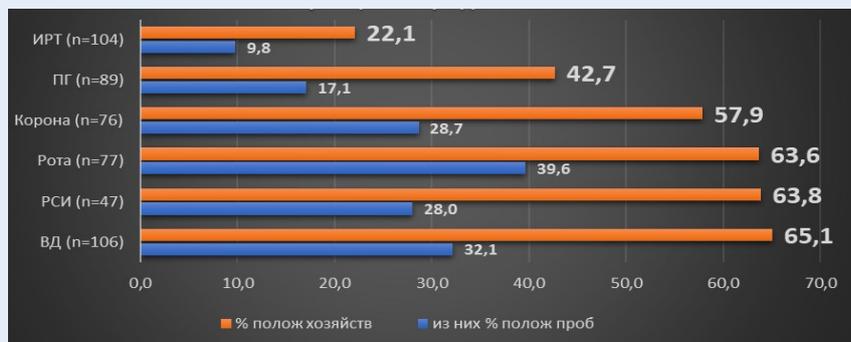


■ отриц ■ полож

Рисунок 2. – Доля положительных проб от общего числа исследованных на наличие генома вирусов ИРТ, ВД, ПГ-3, РСИ, рота- и коронавирусной инфекций КРС (n=552)

Вирусные инфекции в исследованных хозяйствах протекали, как правило, в виде ассоциаций – в 63 % случаев. Всего было установлено 30 комбинаций вирусных ассоциаций. Чаще всего, в 6 случаях, идентифицировали ассоциацию «ВД+ро-

Наиболее часто выявлялся геном вирусов ВД, РСИ, рота- и коронавирусной инфекций. Наиболее редко, в 22 % хозяйств, встречался вирус ИРТ. В ходе исследования биологического материала методом ПЦР были идентифицированы вирусы ВД в 65,1 % исследованных хозяйств, РСИ – в 65,1 %, ротавирус – в 63,6 %, коронавирус – в 57,9 %, ПГ-3 – в 42,7 %, ИРТ – в 22,1 % хозяйствах (рисунок 3).



% полож. хозяйств – % хозяйств, в которых получен положительный результат при детекции геномов ИРТ, ВД, ПГ-3, РСИ, рота- и коронавирусной инфекций КРС;

из них % полож. проб – % положительных проб при детекции геномов ИРТ, ВД, ПГ-3, РСИ, рота- и коронавирусной инфекций КРС

Рисунок 3. – Эпизоотическая ситуация в исследованных хозяйствах по ИРТ, ВД, ПГ-3, РСИ, рота- и коронавирусной инфекциям КРС

та+корона». Ассоциацию «ВД+корона» и «ВД+ИРТ» идентифицировали в пяти случаях, ассоциации «ВД+ПГ+РСИ», «ВД+ПГ» и «ВД+ПГ+корона+рота+РСИ» – в четырех случаях (рисунок 4, таблица).

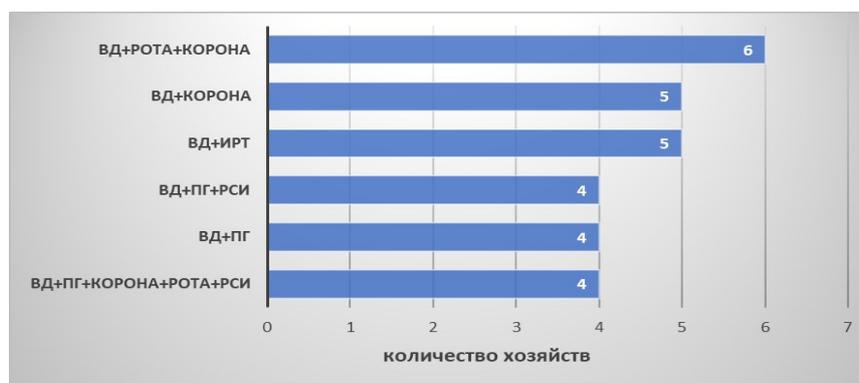


Рисунок 4. – Наиболее часто выявляемые ассоциации ИРТ, ВД, ПГ-3, РСИ, рота- и коронавирусной инфекций КРС

Таблица. – Количество случаев выявления вирусов ВД, ПГ-3, ИРТ, РСИ, рота- и коронавирусной инфекций КРС в виде ассоциаций и моноинфекций

№ п/п	Наименование ассоциации	Количество хозяйств с ассоциацией	Количество хозяйств с моноинфекцией
1	ВД		14
2	Рота		8
3	ПГ-3		8
4	ИРТ		6
5	Корона		3
6	РСИ		1
7	ВД + Рота + Корона	6	
8	ВД + Корона	5	
9	ВД + ИРТ	5	
10	ВД + ПГ-3 + РСИ	4	
11	ВД + ПГ-3	4	
12	ВД + ПГ-3 + Рота + Корона + РСИ	4	
13	ВД + ПГ-3 + Рота + Корона	3	
14	ВД + ПГ-3 + Рота + РСИ	3	
15	ВД + Рота + Корона + ИРТ + РСИ	3	
16	ПГ-3 + Рота + Корона + РСИ	3	
17	ВД + Рота	3	
18	Рота + Корона	3	
19	ВД + ПГ-3 + Корона	2	
20	ВД + ПГ-3 + ИРТ	2	
21	ПГ-3 + РСИ	2	
22	Рота + РСИ	2	
23	ВД + ПГ-3 + ИРТ + РСИ	2	
24	ВД + Корона + РСИ	1	
25	ВД + Рота + РСИ	1	
26	ВД + Рота + Корона + ИРТ	1	
27	ВД + Корона + РСИ	1	
28	ВД + РСИ	1	
29	ВД + Рота + ИРТ	1	
30	ВД + Рота + Корона + РСИ	1	
31	Рота + Корона + ПГ-3	1	
32	Рота + Корона + ИРТ	1	
33	ПГ-3 + Корона + РСИ	1	
34	ПГ-3 + Корона	1	
35	Рота + ПГ-3 + ИРТ	1	
36	Рота + ИРТ	1	
ИТОГО:		69 (63,3 %)	40 (36,7 %)

Как моноинфекции вирусные инфекции в исследованных хозяйствах встречались в 37 % случаев. Вирусная диарея встречалась наиболее часто, в 14 (35 %)

случаях. Реже – ПГ-3, ротавирусная инфекция и ИРТ, в 8 (20 %), 8 (20 %) и 6 (15 %) случаях соответственно (рисунок 5, таблица 1).

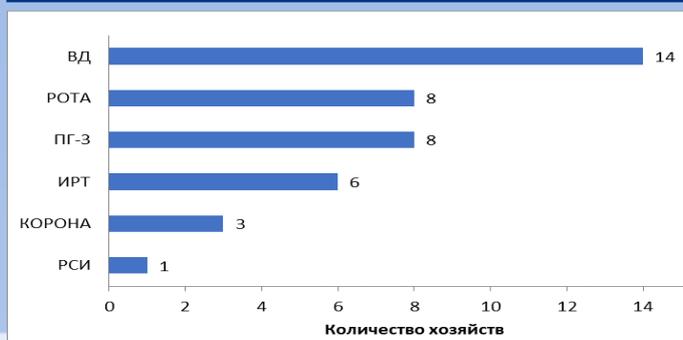


Рисунок 5. – Вирусные инфекции, протекающие в виде моноинфекций

Изучена эпизоотическая ситуация по вирусным заболеваниям КРС в исследованных хозяйствах. Установлено, что 89 % исследованных хозяйств являются резервуарами вирусных инфекций, вызываемых вирусами ИРТ, ВД, ПГ-3, РСИ, рота- и коронавирусами.

Наибольшая инфицированность в исследованных хозяйствах наблюдалась вирусами ВД, РСИ, рота- и коронавирусами: 65,1 %, 63,8 %, 63,6 % 57,9 % соответственно. Наиболее редко, в 22 % хозяйств, встречался вирус ИРТ.

Полученные нами результаты доказывают, что ведущее место в этиологии пневмоэнтеритов КРС занимают ассоциации вирусов. В 63 % вирусные инфекции протекали в ассоциациях. Наиболее частые ассоциации: «ВД+рота+корона», «ВД+корона», «ВД+ИРТ».

В 37 % случаев в исследованных хозяйствах вирусные инфекции протекали в виде моноинфекций. Как моноинфекция наиболее часто встречалась ВД – в 35 % случаев, реже – рота- и ПГ-3 – в 20 % случаев, ИРТ – в 15 % случаев, коронавирус – в 7,5 % случаев, РСИ – в 2,5 % случаев.

Установлена этиологическая структура пневмоэнтеритов КРС в исследуемых хозяйствах. Наибольшую долю в этиологии пневмоэнтеритов КРС занимали такие вирусы, как вирус ВД, ротавирус, вирус ПГ-3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При смешанных инфекциях диагностика по клиническим, патолого-анатомическим признакам представляет трудности, поэтому в дифференциальной диагностике наиболее важную роль играет метод полимеразной цепной реакции.

Исходя из результатов исследования видно, что большинство исследованных хозяйств (89 %) инфицированы вирусами

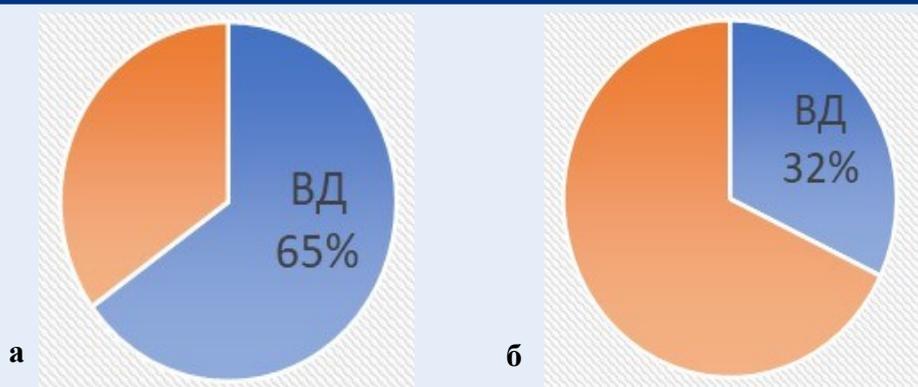
ИРТ, ВД, ПГ-3, РСИ, рота- и коронавирусной инфекциями. При этом 13 (11 %) хозяйств были благополучны по вирусным инфекциям, что может быть связано с предоставлением недостаточного количества материала (это одна или две пробы для исследований). Поэтому для более объективного результата рекомендуется присылать для исследований не менее 10 проб [5].

Надо отметить, что среди хозяйств в исследуемых пробах наиболее часто была установлена ВД КРС. В этих пробах в 65 % случаев (рисунок 6 а) обнаруживали геном вируса ВД, доля положительных проб также была одна из самых высоких – 32 % (рисунок 6 б) после ротавирусной инфекции.

ВД наиболее часто встречается в сочетании с другими вирусными инфекциями и как моноинфекция, что может являться признаком того, что ВД является первичным патогеном. На это указывают и факторы патогенности вируса вирусной диареи, и его способность вызывать иммуносупрессию [11, 12].

Вирусы (ВД, ИРТ, ПГ-3, РСИ, рота- и коронавирусные инфекции) могут протекать без видимых клинических признаков, однако при определенных стрессовых ситуациях и нарушении технологии кормления, содержания они могут активизироваться, разрушая клетки, вызывая воспаление, открывая ворота инфекции для пастерелл, сальмонелл, стрептококков и другой секундарной микрофлоры.

Поэтому выявление персистентной вирусной инфекции дает возможность своевременно планировать и контролировать эффективность противозооотических мероприятий, которые за счет предотвращения ущерба, сохранности молодняка и взрослого поголовья КРС могут значительно снизить экономические потери.



а – % хозяйств, в которых получен положительный результат при детекции генома вируса ВД КРС;
б – % положительных проб при детекции генома вируса ВД КРС

Рисунок 6. – Встречаемость ВД КРС среди хозяйств и в исследуемых пробах

ЛИТЕРАТУРА

1. Вирусная диарея – болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота (историческая справка, характеристика возбудителя, особенности эпизоотологии, клиническое проявление и экономическое значение): рекомендации / А. Г. Глотов [и др.]; РАСХН, Сиб. отд-ние, ГНУ ИЭВСиДВ. – Новосибирск, 2006. – 28 с.
2. Воитова, К. В. Диагностика респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции : автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук: 06.02.02 / К. В. Воитова / ИИЦ ГНУ СибНСХБ Россельхозакадемии. – Новосибирск, 2011. – 21 с.
3. Глотов, А. Г. Вирусная диарея – болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота / А. Г. Глотов // Ветеринария. – 2008. – № 6. – С. 56–60.
4. Краснов, В. В. Совершенствование противоэпизоотических мероприятий при вирусно-бактериальных инфекциях крупного рогатого скота в условиях интенсивного молочного скотоводства: автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук : 06.02.02 / В. В. Краснов / ИИЦ ГНУ СибНСХБ Россельхозакадемии. – Новосибирск, 2010. – 23 с.
5. Красочко, П. А. Болезни сельскохозяйственных животных / П. А. Красочко, М. В. Якубовский, А. И. Ятусевич. – Минск, 2005. – 1388 с.
6. Красочко, П. А. Научные основы изучения этиологии, патогенеза и разработка мер борьбы с вирусными инфекциями молодняка крупного рогатого скота. / П. А. Красочко, А. М. Ламан // Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария. – 2006. – № 3. – С. 3–8.
7. Кузьмин, В. А. Инфекционные болезни животных / В. А. Кузьмин, А. С. Алиев, Ю. Ю. Данко. – СПб. : Лань, 2007. – С. 198–202.
8. Курдеко, А. П. Основы ветеринарной медицины. Инфекционные болезни сельскохозяйственных животных / А. П. Курдеко, Г. Ф. Медведев, В. С. Бегунов / УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия. – Горки, 2013. – 54 с.
9. Куриленко, А. Н. Инфекционные болезни молодняка сельскохозяйственных животных / А. Н. Куриленко, В. Л. Крупальник. – М. : Колос, 2000. – 144 с.
10. Стеценко, В. И. Ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по вирусным пневмоэнтеритам молодняка крупного рогатого скота в хозяйствах Украины / В. И. Стеценко, З. Р. Троценко // Ветеринарная медицина 85. – Харьков, 2005. – Т. 2. – С. 1041–1045.
11. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus / W.V. Corapi [et al.] // J Am Vet Med Assoc. – 1990. 196:590-596.
12. Ridpath, J. F. Bovine Viral Diarrhea Virus / J. F. Ridpath // Encyclopedia of Virology / USDA, Ames, IA, USA. – 2008. – P. 374–380.

Понаськов М.А., магистр ветеринарных наук, ассистент

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

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ КРОЛИКОВ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ВАКЦИНЫ «БОЛЬШЕВАК»

Резюме

В статье представлены материалы влияния поливалентной инактивированной культуральной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной инфекции крупного рогатого скота «БольшеВак» на иммуноморфогенез кроликов. Установлено, что двукратная иммунизация с интервалом 21 день позволяет более активно выработать клеточный и гуморальный иммунитет у иммунизированных животных.

Ключевые слова: вакцина, вирусные пневмоэнтериты, иммуноморфогенез, кролики, морфологические исследования.

Summary

The article presents the materials of the effect of polyvalent inactivated culture vaccine against infectious rhinotracheitis, viral diarrhea, parainfluenza-3, respiratory syncytial, rotavirus and coronavirus infection of cattle "BolsheVak" on immunomorphogenesis in rabbits. It was found that double immunization with an interval of 21 days allows for more active development of cellular and humoral immunity in immunized animals.

Keywords: vaccine, viral pneumoenteritis, immunomorphogenesis, rabbits, morphological studies.

Поступила в редакцию 18.10.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на достижения ветеринарной науки и практики, вирусные пневмоэнтериты телят по-прежнему являются одной из самых распространенных и экономически затратных проблем современного животноводства во многих странах мира, в том числе и в Республике Беларусь [3, 11, 13].

Особенно восприимчивы к данной патологии телята неонатального периода. В связи с незрелостью механизмов иммунной защиты и неспецифической резистентности организма вирусные пневмоэнтериты в этот период вызывают тяжелые формы течения болезни, зачастую с летальным исходом [4, 5].

Согласно литературным данным и результатам собственных исследований, основными возбудителями вирусных желудочно-кишечных и респираторных болезней телят являются вирусы инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи крупного рогатого скота, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной инфекций. Данные возбудители вызывают заболевания, которые на крупных молоч-

ных комплексах и фермах протекают в виде ассоциативных инфекций, поражая до 80 % телят и вызывая смертность до 50 % [3, 5, 12].

В промышленном животноводстве для специфической профилактики вирусных респираторно-кишечных болезней телят используются отечественные и зарубежные инактивированные и живые ассоциированные вакцины. Однако их иммуногенность, стоимость и влияние на развитие иммунитета не всегда приносят положительный результат.

В рамках импортозамещения сотрудниками УО ВГАВМ и ОАО «БелВит-унифарм» была разработана поливалентная инактивированная культуральная вакцина против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота «БольшеВак» [2].

Целью исследований являлось изучение влияния поливалентной инактивированной культуральной вакцины «БольшеВак» на иммуноморфогенез у кроликов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения влияния исследуемой вакцины на иммуноморфогенез по принципу условных аналогов было сформировано 3 группы кроликов по 5 голов в каждой. Кроликов 1-й группы иммунизировали исследуемой вакциной однократно внутримышечно во внутреннюю сторону бедра в дозе 2,5 см³, кроликов 2-й группы – двукратно с интервалом 21 сутки. Кроликам контрольной группы вводили изотонический раствор натрия хлорида. Эвтаназию и гистологическое исследование срезов внутренних органов от кроликов всех групп проводили на 10-е, 20-е и 30-е сутки исследования. Убой животных осуществляли согласно требованиям, изложенным в Европейской конвенции по защите домашних животных, а также в методических указаниях по гуманной эвтаназии домашних животных [7, 8, 9, 10].

Исследования проводились в прозектории и лаборатории кафедры патологической анатомии и гистологии УО ВГАВМ. После эвтаназии кроликов трупы вскрывали по методике Г.В. Шора с последующим отбором материала для проведения гистологического исследования. Материалом для морфологических исследований служили кусочки лимфоузлов, селезенки, тимуса, ткань с места введения вакцины. Материал фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина. Все этапы приготовления гистологических препаратов проводили согласно общепринятым методикам [7]. Для обзорного изучения гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

Гистологическое исследование проводили с использованием светового микро-

скопа «Olympus BX51», подключенного к портативному компьютеру с соответствующей программой для проведения морфологического анализа тканей [1, 6].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клиническое состояние подопытных животных в течение всего периода исследований было удовлетворительным. Отклонений основных физиологических функций не наблюдалось.

При гистологическом исследовании *мышечной ткани* с места введения биопрепарата у кроликов 1-й и 2-й групп на 10-е сутки опыта мы наблюдали исчезновение продольной и поперечной исчерченности мышечных волокон, незначительный серозный отек межмышечной ткани, пролиферацию в данную область лимфоцитов и макрофагов (рисунки 1, 2).

У животных 1-й и 2-й групп к концу опыта (30-е сутки) в месте введения препарата отмечались застаревшие участки кровоизлияний, пролифераты из лимфоцитов, макрофагов, фибробластов и формирование коллагеновых волокон. Данные изменения указывают на восстановление ткани, при этом мышечные волокна местами были атрофированы.

У интактных животных мышечные волокна однородные в виде длинных тяжей. Саркоплазма оксифильная, пучки миофибрилл гомогенные, неразличимые. Ядра тонкие, вытянутые, едва различимые. Мышечные волокна плотно прилегают друг к другу, между ними наблюдаются тонкие капилляры. Пучки волокон окружены прослойками перимизия.

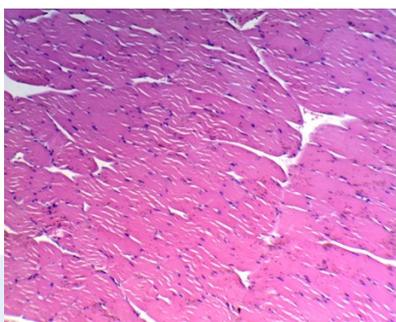


Рисунок 1. – Микрофото. Мышечная ткань у кролика контрольной группы. Гематоксилин-эозин. Ув. x20

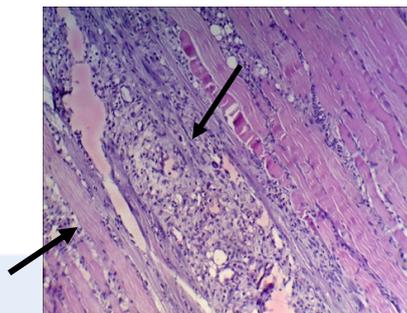


Рисунок 2. – Микрофото. Ткань с места введения вакцины у кролика 2-й группы на 10-е сутки опыта. Стрелками указан лимфоидно-макрофагальный пролиферат. Гематоксилин-эозин. Ув. x20

Регионарные месту введения вакцины лимфатические узлы у кроликов 1-й и 2-й групп после иммунизации вакциной «БольшеВак» макроскопически находились в состоянии серозно-гиперпластического воспаления: узлы увеличены в объеме, упругой консистенции, на разрезе паренхима светло-розового цвета, сочная и выбухала из-под капсулы. Сосуды органа кровенаполнены, ткани пропитаны серозной жидкостью.

При гистологическом исследовании регионарных месту введения вакцины лимфатических узлов у кроликов 1-й группы на 10-е сутки опыта отмечалось резкое увеличение размеров лимфоидных узелков со слабо выраженным светлым центром. В лимфоузлах кроликов 1-й группы в более поздние сроки наблюдения (20–30-е сутки)

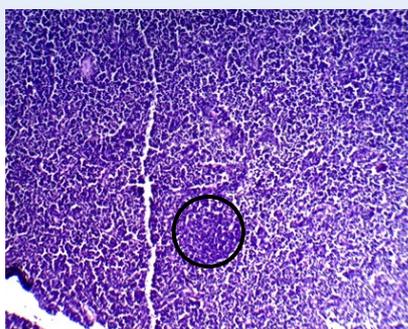


Рисунок 3. – Микрофото. Лимфоузел кролика контрольной группы. Единичный лимфоидный узелок. Гематоксилин-эозин. Ув. х40

Макроскопически тимус у кроликов всех групп был не увеличен в размере, форма не изменена, консистенция упругая, цвет серо-коричневый, рисунок сохранен.

При гистологическом исследовании тимуса кроликов 1-й группы на 10-й день после вакцинации мы наблюдали по сравнению с интактными животными расширение и разрежение коркового вещества долек, нечеткую границу между корковым и мозговым веществом, тимоциты располагались равномерно и плотно. На 20–30-е сутки опыта отмечалось формирование отдельных лимфоидных узелков, а также множественных мелких тимических телец, расположенных преимущественно в мозговом веществе органа.

При гистологическом исследовании тимуса кроликов 2-й группы, на 10-е сутки после ревакцинации отмечалось резкое

после иммунизации отмечались сходные, но менее выраженные морфологические изменения.

В гистологических срезах лимфоузлов кроликов, иммунизированных вакциной «БольшеВак», на 10-й день после ревакцинации выявлялось увеличение количества лимфоидных узелков с массивным светлым центром, по сравнению с животными контрольной группы, и их гиперплазия. Между узелками в паренхиме органа отмечалось незначительное скопление эритроцитов.

К 20–30-м суткам опыта в той же группе животных отмечалось увеличение количества вторичных лимфоидных узелков с хорошо выраженными реактивными центрами.

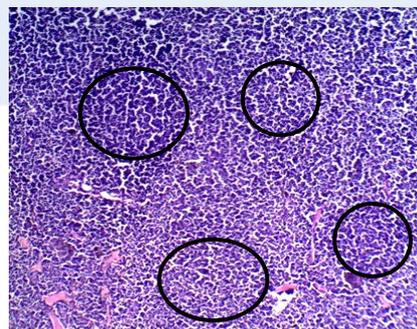


Рисунок 4. – Микрофото. Лимфоузел кролика 2-й группы. 20-е сутки опыта. Формирование множественных узелков. Гематоксилин-эозин. Ув. х40

расширение коркового вещества, нечеткая граница между корковым и мозговым веществом, формирование отдельных узелков, а в мозговом веществе выявлялось множество телец Гассалья разных размеров слоистой структуры. Кровеносные сосуды коркового вещества умеренно наполнены кровью, их окружают малые, средние и единичные большие лимфоциты.

Селезенка у кроликов опытных групп была незначительно увеличена, края закруглены, упругой консистенции, красного цвета, рисунок сглажен, соскоб пульпы незначительный.

При гистологическом исследовании селезенки кроликов 1-й группы на 10-е сутки эксперимента наблюдали единичные, но довольно крупные лимфоидные узелки, многие из которых были с реактивными центрами. Среднее число лимфоидных

узелков в селезенке составляло 2–4. В последующие периоды исследований наблюдалась слабо выраженная гиперплазия узелков.

В гистосрезах селезенки подопытных животных 2-й группы на 10-й день после ревакцинации наблюдалось увеличение количества лимфоидных узелков, как

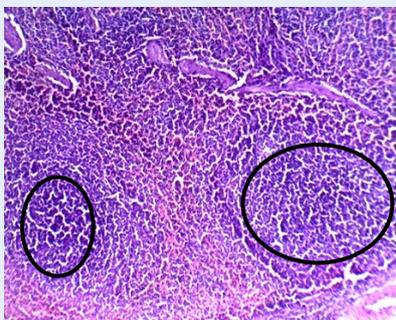


Рисунок 5. – Микрофото. Селезенка кролика 1-й группы на 10-е сутки опыта. Увеличение площади лимфоидных узелков. Гематоксилин-эозин. Ув. х40

В миокарде наблюдалась зернистая дистрофия. Мышца сердца набухшая, дряблая, цвет серый, напоминает ошпаренное кипятком мясо, рисунок волокнистого строения сглажен. Гистологически отмечалась потеря поперечной исчерченности с пикнозом в отдельных ядрах. Межуточная ткань отекая, сосуды расширены, заполнены эритроцитами.

Печень макроскопически была увеличена в размере, неизменной формы, края слегка закруглены, темно-красного цвета, мягкой консистенции, рисунок дольчатого строения на разрезе сглажен.

Гистологически гепатоциты имели выраженный полиморфизм, были набухшие, разных размеров. Цитоплазма клеток мутная, содержала выраженную белковую зернистость, ядра были различной величины. Центральные печеночные вены и прилежащие к ним синусоидные капилляры были расширены и заполнены эритроцитами.

Почки были незначительно увеличены в объеме, форма не изменена, светлорыжевого цвета, упругой консистенции, граница между корковым и мозговым веществом слегка сглажена. При морфологическом исследовании в цитоплазме эпителиальных клеток извитых канальцев почек

первичных, так и вторичных, по сравнению с контрольными животными. На 20-й день после ревакцинации многие лимфоидные узелки были гиперплазированы, их реактивные центры были расширены. В поле зрения микроскопа на 10-й день опыта визуализировалось 4–6, а на 20–30-й день – до 11 лимфоидных узелков.

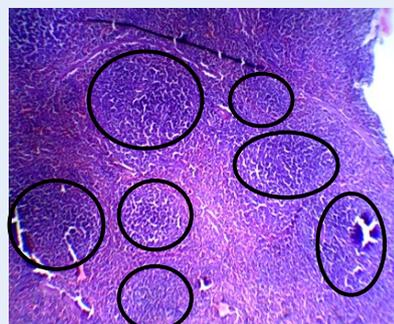


Рисунок 6. – Микрофото. Селезенка кролика 2-й группы на 10-е сутки опыта. Увеличение количества лимфоидных узелков. Гематоксилин-эозин. Ув. х40

выявлялась зернистая дистрофия: цитоплазма эпителия содержала многочисленные гранулы розового цвета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований показали, что представленная поливалентная инактивированная культуральная вакцина против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота «БольшеВак» проявляет выраженное иммуногенное действие. В результате применения вакцины «БольшеВак» в лимфатических узлах и селезенке отмечаются процессы, характеризующиеся увеличением количества и размеров лимфоидных узелков. В тимусе происходит расширение коркового вещества и образование отдельных лимфоидных узелков, формирование тимических телец. В мышечной ткани на месте введения биопрепарата формируется клеточная реакция, состоящая из лимфоцитов и макрофагов. При этом наиболее выраженные иммуноморфологические изменения в органах и тканях выявлялись у кроликов, иммунизированных двукратно с интервалом 21 день.

Таким образом, результаты морфологического исследования позволяют сде-

лать вывод о том, что применение поливалентной инактивированной культуральной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота «БольшеВак» двукратно с интерва-

лом 21 день оказывает стимулирующее влияние на иммунную систему и приводит к существенной иммунологической перестройке организма и созданию напряженного иммунитета у вакцинированных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александровская, О. В. Цитология, гистология и эмбриология / О. В. Александровская, Т. Н. Радостина, Н. А. Козлов. – М. : Агропромиздат, 1987. – 447 с.
2. Красочко, П. А. Подбор инактивированных и адьювантов при конструировании поливалентной вакцины против вирусных пневмоэнтеритов телят / П. А. Красочко, М. А. Понаськов // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины»: науч.-практ. журнал. – Витебск, 2022. – Т. 58, вып. 1. – С. 21–26.
3. Ламан, А. М. Иммунологическая активность трехвалентной инактивированной вакцины против вирусной диареи, рота- и коронавирусной инфекции крупного рогатого скота / А. М. Ламан // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2018. – № 2. – С. 53–57.
4. Лукьянова, И. А. Клинико-патоморфологические особенности течения вирусно-бактериальных респираторно-кишечных инфекций у телят / И. А. Лукьянова, Т. В. Ермакова, В. И. Плешакова // Вестник АГАУ. – 2012. – № 4. – С. 49–51.
5. Малашко, В. В. Иммуноморфогенез у животных после иммунизации трехвалентной инактивированной вакциной против вирусной диареи, рота-, коронавирусной инфекции крупного рогатого скота / В. В. Малашко, П. А. Красочко, А. М. Ламан // Экология и животный мир. – 2009. – № 1. – С. 79–91.
6. Микроскопическая техника : руководство для врачей и лаборантов / Д. С. Саркисов [и др.]. – М. : Медицина, 1996. – 544 с.
7. Отбор образцов для лабораторной диагностики бактериальных и вирусных болезней животных : учеб.-метод. пособие / И. Н. Громов [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2020. – 64 с.
8. Патологическая анатомия и дифференциальная диагностика болезней телят и поросят, протекающих с диарейным синдромом : учеб.-метод. пособие / В. С. Прудников [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2021. – 55 с.
9. Патологическая анатомия и дифференциальная диагностика инфекционных и инвазионных болезней телят и поросят, протекающих с респираторным синдромом : учеб.-метод. пособие / В. С. Прудников [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2019. – 39 с.
10. Полоз, А. И. Методические указания по гуманной эвтаназии животных / А. И. Полоз, А. Ю. Финогенов. – Минск : РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышесского», 2008. – 45 с.
11. Понаськов, М. А. Динамика биохимических показателей крови сухостойных коров, иммунизированных вакциной против вирусных пневмоэнтеритов «БольшеВак» / М. А. Понаськов, П. А. Красочко, И. А. Белко // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: материалы нац. научн.-практ. конф., посвящ. памяти д-ра биол. наук, проф. Е. П. Ващекина, Брянск, 25 янв. 2022 г. / Брянский ГАУ. – Брянск, 2022. – Ч. 1. – С. 151–155.
12. Понаськов, М. А. Влияние вакцины против вирусных пневмоэнтеритов «БольшеВак» на обмен веществ у коров / М. А. Понаськов // Вестник аграрной науки. – 2022. – № 1 (94). – С. 175–181.
13. Понаськов, М. А. Динамика показателей иммунного ответа у коров, иммунизированных вакцинами против инфекционных пневмоэнтеритов / М. А. Понаськов, П. А. Красочко // Проблемы интенсивного развития животноводства и их решение: сборник науч. тр. Междунар. науч.-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. – Брянск : Брянский ГАУ. – 2022. – С. 120–125.

Радивил А.Н., младший научный сотрудник

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

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА «ВИРОКОКЦИД» ПРИ АССОЦИАТИВНЫХ ПАЗАРИТОЗАХ ОВЕЦ

Резюме

В статье представлены исследования по изучению эффективности применения нового комплексного препарата «Вирококцид» при ассоциативных паразитозах овец. Наиболее эффективной схемой лечения ассоциативных паразитозов желудочно-кишечного тракта овец является применение комплексного препарата «Вирококцид» в дозе 100 мг/кг живой массы внутрь один раз в сутки два дня подряд. При его применении овцам побочных явлений, интоксикаций не установлено. Экономическая эффективность применения вирококцида овцам в дозе 100 мг/кг живой массы внутрь двукратно составила 6,3 рубля на 1 рубль затрат.

Ключевые слова: овцы, овцематки, инвазированность, ассоциативные паразитозы, терапевтическая и экономическая эффективность.

Summary

The article presents studies on effectiveness of use of new complex drug «Virococcid» in associative parasitosis of sheep. Most effective regimen for treatment of associative parasitoses of gastrointestinal tract of sheep is use of complex preparation «Virococcid» at a dose of 100 mg/kg of live weight orally once a day for two days in a row. When it is used in sheep, no side effects, intoxications have been established. The economic efficiency of using virococcid to sheep at a dose of 100 mg/kg of live weight twice amounted to 6.3 rubles per 1 ruble of costs.

Keywords: sheep, ewes, infestation, associative parasitosis, therapeutic and economic efficiency.

Поступила в редакцию 19.10.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одной из причин, сдерживающих рост и развитие овцеводства в Республике Беларусь, являются желудочно-кишечные паразитозы. При составлении плана применения препаратов при паразитозах животных необходимо учитывать особенности их кормления и содержания, физиологическое состояние, включая уровень иммунитета, сведения об обмене веществ, возможные патологические процессы в организме, сроки проведения вакцинаций и других ветеринарных мероприятий [5].

При обследовании овец в различных природно-хозяйственных условиях содержания установлено, что одним из самых распространенных кишечных паразитозов у овец всех возрастных групп является смешанная инвазия (стронгилоиды + эймерии; стронгилята + стронгилоиды + эймерии) [2].

В последнее время ученые различных стран стали уделять больше внимания разработке комплексных препаратов, имеющих определенные преимущества перед однокомпонентными средствами борьбы с паразитами. К комплексным препаратам привыкание паразитов развивается медленно либо вообще не происходит. Кроме этого, они имеют, как правило, более широкий спектр действия, более экономичны, при их использовании количество обработок животных сокращается. Нередко субстанции комплексных препаратов усиливают действие друг друга, что в целом повышает эффективность препарата. Введение в состав комплексных препаратов субстанций, обладающих иммуностимулирующим и антиоксидантным действием, также является приоритетом при выборе средств для противопаразитарных мероприятий [1, 4].

Учитывая вышеизложенное, в отделе паразитологии РУП «Институт экспери-

ментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» разработан новый ветеринарный препарат «Вирококцид», в состав которого входят два противопаразитарных компонента – современный кокцидиостатик, антгельминтик, а также янтарная кислота. Действие его направлено сразу на несколько аспектов.

Проведенные исследования по изучению острой и хронической токсичности нового комплексного препарата «Вирококцид» показали, что испытуемый препарат не обладает токсичностью и согласно ГОСТ 12.1.007-76 относится к 4-му классу опасности (вещества малоопасные). Препарат также не обладает тератогенным и эмбриотоксическим действиями, сенсибилизирующей (аллергенной) способностью и раздражающим действием на слизистые оболочки и кожу.

Для молодняка и овцематок, кроме наличия кокцидий, характерно значительное инвазирование нематодами желудочно-кишечного тракта, а для овцематок – и трематодами (фасциолами). Исходя из этого, был подобран отечественный препарат «Вирококцид» и отработана схема его применения при ассоциативных паразитах желудочно-кишечного тракта у данных возрастных групп овец.

Цель работы – изучить эффективность применения нового комплексного

препарата «Вирококцид» при ассоциативных паразитозах овец.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение эффективности препарата «Вирококцид» проводили в овцеводческом хозяйстве республики КФХ «Петровский» Минского района и в отделе паразитологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Исследование инвазирования овец ассоциациями паразитов желудочно-кишечного тракта проводили методом Г.А. Котельникова – В.М. Хренова (1974) – для обнаружения яиц стронгилят, эймерий и стронгилоид.

С целью отработки схемы применения противопаразитарного препарата молодняку и овцематкам будут учитываться данные паразитологического обследования, позволившие установить, что молодняк в возрасте 3-4 месяцев, кроме паразитических простейших, часто инвазирован гельминтами. У овцематок количество сочленов возрастает до 5–6, а интенсивность инвазии снижается.

Схема отработки дозы и кратности применения комплексного препарата широкого спектра действия молодняку при инвазионных болезнях представлена в таблице 1.

Таблица 1. – Схема отработки доз и кратности применения комплексного препарата широкого спектра действия молодняку при инвазионных болезнях

Группа животных	Кол-во голов	Доза препарата, мг/кг	Кратность применения
Опытная группа № 1	6–8	100,0	один раз в сутки однократно
Опытная группа № 2	6–8	50,0/50,0	один раз в сутки два дня подряд
Опытная группа № 3	6–8	100,0/100,0	один раз в сутки два дня подряд
Контрольная группа	6	препарат применяться не будет	

Противопаразитарное действие будем устанавливать путем отбора и исследования проб фекалий на наличие ооцист эймерий и яиц гельминтов на 7-й и 14-й дни после применения препарата.

Схема отработки доз и кратности применения комплексного препарата широкого спектра действия овцематкам при инвазионных болезнях представлена в таблице 2.

Таблица 2. – Схема отработки доз и кратности применения комплексного препарата широкого спектра действия овцематкам при инвазионных болезнях

Группа животных	Кол-во животных, гол.	Доза препарата, мг/кг	Кратность применения
Опытная группа № 1	6	100,0	один раз в сутки однократно
Опытная группа № 2	6	50,0/50,0	один раз в сутки два дня подряд
Опытная группа № 3	6	100,0/100,0	один раз в сутки два дня подряд
Контрольная группа	6	препарат применяться не будет	

Терапевтическую эффективность лечебных мероприятий оценивали по интенсивности выделения ооцист эймерий и яиц нематод с фекалиями до и после применения препарата.

Экономическую эффективность лечебных мероприятий рассчитывали согласно методическим рекомендациям [3].

Статистическую обработку цифровых данных проводили с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2010», Statistica for Windows 10.0 («StatSoftInc.», Талса, США). Оценку различия между выборками по доле (%) ис-

следуемого признака определяли на основе точного критерия Фишера. Количественные показатели представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего значения ($M \pm m$). Различия между изучаемыми параметрами признавались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования по изучению эффективности отечественного комплексного препарата «Вирококцид» приведены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3. – Результаты применения противопаразитарного препарата «Вирококцид» молодняку овец при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта

Группы исследования	Доза, мг/кг	Кол-во, гол.	Инвазированность до применения препарата, %		Инвазированность после применения препарата, %		Кол-во здоровых животных, гол.	Экстенс-эффективность, %
			<i>Eimr.sp.</i> *	<i>Strongyl.</i> **	<i>Eimr.sp.</i>	<i>Strongyl.</i>		
Опытная группа № 1	100,0	6	100,0	100,0	33,33	16,67	4	66,67
Опытная группа № 2	50,0/50,0	6	100,0	100,0	16,67	0	5	83,33
Опытная группа № 3	100,0/100,0	6	100,0	100,0	0	0	6 ⁺	100,0 ⁺
Контрольная группа	-	5	100,0	80,0	100,0	100,0	-	-

Примечание – **Eimr.sp.* – *Eimeria sp.* (ооцисты эймерий); ***Strongyl.* – *Strongyloides papillosus* (яйца стронгилоидесов); ⁺*Fisher exact*, $p < 0,032-0,024$

После применения виорококцида в дозе 100 мг/кг живой массы один раз в сутки однократно экстенсэффективность против эймерий составила 66,67 %, ооцисты эймерий выявлены в двух пробах, яйца стронгилоидесов – в 1-й пробе, экстенсэффективность при стронгилоидозе составила 83,33 %.

При применении виорококцида в дозе 50 мг/кг живой массы один раз в сутки два дня подряд экстенсэффективность против эймерий составила 83,33 %, только у одного животного (16,67 %) были обнаружены единичные ооцисты эймерий, яйца стронгилоидесов в пробах не выявлены.

Установлено, что в результате применения комплексного препарата «Вирококцид» внутрь в дозе 100 мг/кг живой массы один раз в сутки два дня подряд экстенсэффективность при эймериозах молодняка составила 100 %, при стронгилоидозе – 100,0 %.

Заражение ягнят группы контроля оставалось на высоком уровне – 100 %.

Для выяснения, является ли достоверно значимым различие результатов схем лечения, использовали точный критерий

Фишера. Чем меньше расчетный уровень значимости (p), вычисленный по точному критерию Фишера, тем различие между сравниваемыми группами более статистически значимо.

Установлено, что наиболее эффективными схемами лечения являются результаты лечения 3-й опытной группы (Fisher exact, $p \leq 0,032-0,024$). Различие между схемами лечения 1-й и 2-й опытной групп не достоверно (Fisher exact, $p \leq 0,355$).

Таблица 4. – Результаты применения противопаразитарного препарата «Вирококцид» овцематкам при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта

Группы исследования	Доза, мг/кг	Кол-во, голов	Инвазированность до применения препарата, %			Инвазированность после применения препарата, %			Кол-во здоровых животных, голов	Экстенсэффективность, %
			<i>Eimr. sp.</i>	<i>Nematodir. sp.</i>	<i>F. Hepatica</i>	<i>Eimr. sp.</i>	<i>Nematodir. sp.</i>	<i>F. Hepatica</i>		
Опытная группа № 1	100,0	5	100,0	100,0	80	0	40,0	20	3	60,0
Опытная группа № 2	50,0/ 50,0	5	100,0	100,0	60	0	20	20	3	60,0
Опытная группа № 3	100,0/ 100,0	5	100,0	100,0	60	0	0	0	5 ⁺	100,0 ⁺
Контрольная группа	-	5	100,0	80,0	60	100,0	80,0	60,0	-	-

Примечание – **Eimr. sp.* – *Eimeria sp.* (ооцисты эймерий); ***Nematodir. sp.* – *Nematodirus sp.* (яйца нематодир); ****F. hepatica* – *Fasciola hepatica* (яйца фасциол); ⁺Fisher exact, $p \leq 0,021-0,020$

После применения виорококцида в дозе 100 мг/кг живой массы один раз в сутки однократно экстенсэффективность против эймерий составила 100 %, яйца нематодир выявлены в двух пробах, яйца фасциол – в одной пробе, экстенсэффективность при нематодирозе составила 60,0 %, при фасцилезе – 80,0 %.

При применении виорококцида в дозе 50 мг/кг живой массы один раз в сутки два дня подряд экстенсэффективность против эймерий составила 100 %, против нематодир – 80,0 %, против фасциол – 80 %. У одной овцематки в пробах фекалий были обнаружены единичные яйца фасциол, у второй – яйца нематодир.

Установлено, что в результате применения комплексного препарата «Вирококцид» внутрь в дозе 100 мг/кг живой массы один раз в сутки два дня подряд ооцист эймерий, яиц нематод и фасциол в пробах выявлено не было. Экстенсэффективность составила 100 %.

Заражение животных группы контроля оставалось на прежнем уровне.

Установлено, что наиболее эффективными схемами лечения являются результаты 3-й опытной группы (Fisher exact, $p \leq 0,021-0,020$).

Таким образом, наиболее эффективной схемой лечения ассоциативных паразитозов желудочно-кишечного тракта овец

является применение комплексного препарата «Вирококцид» в дозе 100 мг/кг живой массы внутрь один раз в сутки два дня подряд. При его применении овцам побочных явлений, интоксикаций не установлено.

Экономическая эффективность применения вирококцида овцам в дозе 100 мг/кг живой массы внутрь двукратно составила 6,3 рубля на 1 рубль затрат.

Применение нового комплексного препарата при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта овец является экономически выгодным ветеринарным мероприятием.

ВЫВОДЫ

1. Отработана доза и схема применения противопаразитарного препарата «Вирококцид» против простейших и гельминтов у молодняка и взрослых овец (овцематки).

2. Вирококцид показал значимую терапевтическую эффективность (100 %) в дозе 100 мг/кг живой массы один раз в сутки в течение 2 дней подряд (*Fisher exact*, $p \leq 0,032-0,024$; $p \leq 0,021-0,020$). При его применении овцам побочных явлений, интоксикаций не установлено.

3. Экономическая эффективность применения вирококцида овцам в дозе 100 мг/кг живой массы внутрь двукратно составила 6,3 рубля на 1 рубль затрат.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вербицкая, Л. А. Влияние антигельминтиков и кишечных стронгилят на паразитозные отношения и качество продуктов убоя овец : автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук : 03.02.11 ; 06.02.05 / Л. А. Вербицкая ; Витеб. гос. акад. ветеринар. медицины. – Витебск, 2012. – 26 с.

2. Дударчук, А. Н. Изменение клеточного иммунитета овец на фоне применения нового комплексного препарата «Вирококцид» / А. Н. Дударчук // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2020. – № 3 (38). – С. 43–46.

3. Методика определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий / Витеб. гос. акад. ветеринар. медицины ; сост. Н. С. Безбородкин. – Витебск : [б. и.], 2000. – 12 с.

4. Шунько, Л. А. Применение иммуностимуляторов при ассоциативных легочных и желудочно-кишечных стронгилятозах овец / Л. А. Шунько // Ветеринарная наука – производству : межведомств. сб. / Белорус. науч.-исслед. ин-т эксперим. ветеринарии им. С.Н. Вышелесского. – Минск, 1991. – Вып. 29. – С. 120–122.

5. Якубовский, М. В. Новые препараты против паразитарных болезней животных / М. В. Якубовский // Белорусское сельское хозяйство. – 2004. – № 5. – С. 23–24.



**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 паразитами

УДК 619.616.61724.8.559.59

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-2-52-57>

Мамадуллаев Г.Х., доктор ветеринарных наук

Элмуродов Б.А., доктор ветеринарных наук

Джураев О.А., кандидат ветеринарных наук

Джуракулов О.К., докторант

Файзиев У.М., стажер-исследователь

Научно-исследовательский институт ветеринарии Республики Узбекистан, г. Самарканд

РИФИЗОСТРЕП – НОВЫЙ КОМБИНИРОВАННЫЙ ПРЕПАРАТ ПРОТИВ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА

Резюме

В статье представлены результаты лабораторных испытаний нового противотуберкулёзного препарата «Рифизостреп» в организме экспериментально зараженных микобактериями туберкулёза бычьего и человеческого видов у 27 морских свинок. Установлено, что препарат «Рифизостреп» в организме морских свинок в дозе 10 мг/кг обладает достаточной бактерицидной активностью против микобактерий туберкулёза видов *M. bovis* и *M. tuberculosis*.

Ключевые слова: рифизостреп, препарат, антимикробный, микобактерия, туберкулёз, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, бактериологический, бактерицид, бактериостатик, штамм, резистентность, чувствительность.

Summary

The article presents the results of in vivo laboratory tests of a new «Rifizostrep» anti-TB drug. «Rifizostrep» in the organism of experimentally infected 27 guinea pigs. It is obtained that the preparation «Rifizostrep» in organism of guinea pigs at 10 mg/kg dose has sufficient antimicrobial activity against mycobacterium a tuberculosis of type *M. bovis* and *M. tuberculosis*.

Keywords: rifizostrep, drug, against-microbes mycobacterium, tuberculosis, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, bacteriological, bactericid, strain, resistance, sensivity.

Поступила в редакцию 11.11.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулёз – хроническое инфекционное антропоозоонозное заболевание, поражающее более 55 видов сельскохозяйственных животных, диких и пушных зверей, 25 видов птицы. Туберкулёз распространён также среди людей. Виды *M. tuberculosis* и *M. bovis* представляют наибольшую угрозу для здоровья человека. Человек заражается туберкулёзом бычьего вида преимущественно через сырое молоко и молочные продукты, а также при постоянном контакте с больным скотом. В зависимости от цивилизованности и развитости страны возбудителем туберкулёза бычьего вида люди заражаются в до 35 % случаев. По всему миру только от туберкулёза крупного рогатого скота наносится экономический ущерб в размере 2 миллионов долларов в год.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в мире более 2 млрд населения инфицированы микобактериями туберкулёза. Ежегодно 8–10 млн человек заболевают туберкулёзом, более 3 млн умирает от этой болезни, в том числе 900000 женщин и более 300000 детей. Подсчитано, что каждую неделю умирает от туберкулёза 57 тысяч человек. Согласно веб-сайтам ВОЗ, туберкулёз в настоящее время является самой смертельной болезнью в мире. Только в 2017 году туберкулёзом заразились 10 млн человек и умерло 1,6 млн человек (источник: <https://mir24.tv>).

Действующими рекомендациями борьба с заболеванием ведётся только санитарным путем: положительно реагирующий на туберкулин крупный рогатый скот, независимо от породы, возраста,

плодовитости или продуктивности, отправляют на убой. При каждой туберкулинизации повторяется выделение положительно реагирующих на туберкулин животных, в результате чего теряется большое количество племенного и продуктивного скота.

Следовательно, можно сохранить поголовье скота в хозяйстве, применяя метод химиофилактики для защиты условно здорового поголовья скота. Инкубационный период возбудителя туберкулёза составляет до 35 дней. В начальной стадии заражения, т.е. в инкубационном или латентном периоде болезни, молодняк крупного рогатого скота обычно не реагирует на туберкулин. Организм таких животных начинает реагировать на аллерген после родов или в период лактации, поэтому своевременное проведение химиофилактики против туберкулёза служит важным средством в сохранении большого количества племенного, продуктивного убойного скота [5], [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В лаборатории по изучению туберкулёза Узбекского НИИ ветеринарии разработан новый комбинированный препарат «Рифизостреп» с целью совершенствования методов и средств борьбы с туберкулёзом животных. Разработан технологический регламент производства препарата.

Компоненты препарата, входящие в состав рифизострепа, пропорциональны пролонгации (удлинению периода действия) и синергизму (усилению эффекта одного препарата другим). Это сочетание придает туберкулостатическому препарату новую характерную черту и повышает его бактерицидную активность.

Действие препарата «Рифизостреп» на микобактерии туберкулёза изучено на организме 27 морских свинок, зараженных штаммами *M. bovis* и *M. tuberculosis*.

Перед экспериментом всех животных исследовали аллергически на туберкулёз. С этой целью использовали диагностикум «ППД туберкулин для аллергической диагностики туберкулёза у млекопитающих» (серия 3) производства «ВИТИБИОВЕТ» (ГОСТ 28346332-01:2019).

Подопытных животных заразили под кожу бедра штаммами *M. bovis* и *M. tuberculosis* (таблица 1).

Для сравнения эффективности препарата по отношению к возбудителям туберкулёза (*M. tuberculosis* 7880) после заражения трём морским свинкам в качестве контроля вводили препарат «Изониазид» перорально.

С учетом инкубационного периода развития микобактерий в живом организме через 25 дней после заражения подопытным животным вводили препарат «Рифизостреп» подкожно 1 раз в каждые 5 дней в течении 65 дней.

После заражения морским свинкам V группы изониазид применяли перорально в каждые 5 день 1 раз в дозе 10 мг/кг. Контрольным группам животных препарат не применяли.

Независимо от инъекции препарата «Рифизостреп» один раз в месяц всех морских свинок внутривожно аллергически проверяли ППД-туберкулином в дозе 0,1 мл/25 ТБ. Опыты продолжались 90 дней, по окончании срока наблюдения животных опытных и контрольных групп умерщвляли с целью дальнейших патологоанатомических и гистологических исследований.

Индекс зараженности туберкулёзом у экспериментальных животных (селезеночный индекс) определяли по методу Р. Войтека (1967):

$$ИЗ = (ЖМ \times 100\%) : МС,$$
 где ИЗ – индекс зараженности; МС – масса селезенки; ЖМ – живая масса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ССЛЕДОВАНИЙ

Для изучения специфической антибактериальной активности препарата «Рифизостреп» против возбудителей микобактерий туберкулёза все морские свинки перед началом эксперимента подверглись прижизненному тестированию на туберкулёз аллергическим способом. По результатам исследований ни у одного животного не установлена положительная туберкулиновая реакция.

Затем морских свинок всех опытных, контрольных и сравнительной групп заразили вирулентными микобактериями туберкулёза штаммов *M. bovis* 8-03 и *M. tuberculosis* 7880 подкожно в дозе 0,03 мг/кг (таблица 1).

Таблица 1. – Схема испытаний и результаты экспериментов препарата «Рифизостреп»

Вид животного	Группа	Кол-во гол.	Название штамма	Способ введения	Результат пат. анатом. исследования	Бакт. исследование
Морские свинки	I опытная	9	<i>M. bovis</i> 8-03	рифизостреп, парентерально	-----	-----
Морские свинки	II контрольная	3	<i>M. bovis</i> 8-03	контроль, без препарата	+++	+++
Морские свинки	III опытная	9	<i>M. tuberculosis</i> 7880	рифизостреп парентерально	-----	-----
Морские свинки	IV контрольная	3	<i>M. tuberculosis</i> 7880	контроль, без препарата	+++	+++
Морские свинки, сравнительная группа	V сравнительная	3	<i>M. tuberculosis</i> 7880	изониазид, Per os	--+	--+

Примечание – «+» установлен туберкулёз; «-» туберкулёз не выявлен

Через 25 дней после заражения I и III опытными группам животных препарат «Рифизостреп» вводили подкожно 1 раз в сутки каждые 5 дней до завершения эксперимента.

Морским свинкам II и IV контрольных групп по 3 головы препарат не применяли.

Для сравнения противотуберкулёзной эффективности препарата «Рифизостреп» на возбудителей туберкулёза морским свинкам V группы в количестве 3 голов применяли препарат «Изониазид» (ГИНК) в дозе 10 мг/кг Per os, после заражения штаммом *M. tuberculosis* 7880.

После заражения всех животных, независимо от применённых препаратов, исследовали на туберкулёз аллергическим методом. В результате на месте инъекции туберкулина в коже у всех морских свинок образовалась небольшая папула. Размер папул был более выражен у морских свинок контрольных групп.

По окончании эксперимента все животные опытной и контрольной групп были умерщвлены и патологоанатомически исследованы. Во внутренних органах экспериментальных животных выявлены следующие патологические изменения: при

вскрытии I опытной группы морских свинок из 9 голов, получавших рифизостреп, выявлено, что на месте заражения образовался узел соединительно-тканного характера размером с горошину. На разрезе узла гной не обнаружен. Легкие светлорозового цвета с хорошо сохранившейся структурой, на одной из долей обнаружены 4 мелких, размером с просо, очажка, на разрезе которых также не были обнаружены некротическая масса и гной. Печень – без изменений, желчный пузырь заполнен жидкостью, объем селезенки незначительно увеличен. Другие изменения не установлены (рисунок 1).

В сердце, почках и желудочно-кишечном тракте патологические изменения выявлены не были. Аналогичные изменения наблюдались и во внутренних органах остальных морских свинок. Селезеночный индекс (индекс зараженности) в среднем по группе составил 1,02 %.

При патологоанатомическом исследовании морских свинок II контрольной группы, зараженных штаммом *M. bovis* 8-03, выявлена генерализованная форма типичного туберкулёза (рисунок 2). Селезеночный индекс составил 3,5 %.



Рисунок 1. – Внутренние органы морских свинок опытной группы, получавших рифизостреп после заражения туберкулёзом

Патологоанатомическое вскрытие животных III группы, получавших рифизостреп, через 25 дней после заражения *M. tuberculosis*, штамм № 7880, выявило следующее: в легких наблюдались очаговые кровоизлияния, других изменений нет.

Сердце и селезенка без изменений, края хорошо начерчены; печень без изменений; желчный пузырь переполнен желчью; почки без изменений, капсула незначительно отслоена, кровоточивость, границы четкие.

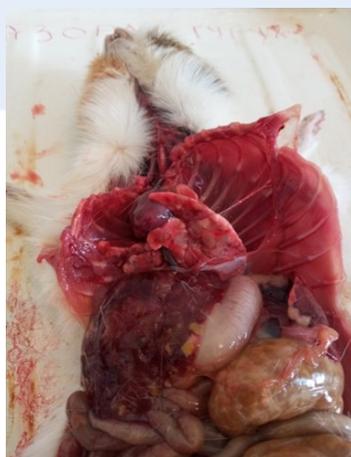


Рисунок 2. – Легкие и печень морских свинок контрольной группы (*M. bovis*), не получавших препарат

Рисунок 3. – Селезенка морской свинки контрольной группы (*M. tuberculosis*), не получавшей препарат

Патологоанатомические изменения в желудочно-кишечном тракте не выявлены. Аналогичные изменения наблюдались и во внутренних органах остальных морских свинок. Индекс пораженности составил 1,2 %.

У морских свинок IV контрольной группы, зараженных штаммом *M. tuberculosis* № 7880, при патологоанатомическом вскрытии выявлены следующие изменения: на месте заражения образовался некротический мешочек беловато-желтого цве-

та размером 2–3 см. Легкие увеличены в объеме, отечны, имеются множественные очаги казеозного некроза размером с просяное зерно. Сердце увеличено в размерах, имеются очаги кровоизлияний, наблюдается гиперемия. Печень темно-красного цвета, объем увеличен в 3 раза, отмечаются многочисленные кровоизлияния, паренхима на поперечном разрезе полностью покрыта очагами казеозно-некротической массы, желчный пузырь переполнен. Поверхность селезенки выпуклая,

увеличена объеме в 4–5 раз (рисунок 3), подвержена диффузному казеозному некрозу. В почках и желудочно-кишечном тракте патологический процесс не установлен. Индекс пораженности составил 3,7 %.

При вскрытии морских свинок сравнительной группы, получавших изониазид, после заражения штаммом *M. tuberculosis* № 7880 выявлено следующее: у первого животного в легких, сердце, селезенке, почках и желудочно-кишечном тракте патологические изменения не установили. Печень темно-красного цвета, имеется несколько очагов некроза желтовато-белого цвета размером с просыное зерно.

У второго животного объем легких увеличен, левая доля геморрагически воспалена, имеется затвердевший некротический очаг размером с просыное зерно, на поперечном срезе обнаружена казеозная масса. В остальных внутренних органах и лимфатических узлах какие-либо патологические процессы не выявлены.

У третьего животного в легких образовался некротический очаг размером с

просыное зерно. Печень слегка увеличена, имеется несколько очагов некроза размером с просыное зерно. Объем селезенки несколько увеличен (рисунок 4), в остальных внутренних органах и тканях патологические изменения не выявлены. Индекс пораженности составил 1,7 %.



Рисунок 4. – Селезенка морской свинки контрольной группы (*M. tuberculosis*), не получавшей препарат

Таблица 2. – Индекс пораженности селезенки у экспериментальных животных

Вид животного	Группа	Кол-во гол.	Доза препарата, мг/кг	Название штамма	Индекс селезенки, %
Морские свинки	I опытная	9	10	<i>M. bovis</i> 8–03	1,04
Морские свинки	II контрольная	3	-	<i>M. bovis</i> 8–03	3,5
Морские свинки	III опытная	9	10	<i>M. tuberculosis</i>	1,2
Морские свинки	IV контрольная	3	-	<i>M. tuberculosis</i>	3,7
Морские свинки	V – сравнительная, изониазид	3	10	<i>M. tuberculosis</i>	1,7

Таким образом, результаты эксперимента, проведенного на морских свинках, показывают, что животные, получавшие препарат, не заболели туберкулёзом. Инфицирование и заболевание были установлены при вскрытии животных контрольной

группы, не получавших препарат «Рифизостреп». У них обнаружена генерализованная форма туберкулёза с казеозным распадом, были поражены паренхиматозные органы (легкие, печень, почки, селезенка).

ВЫВОДЫ

1. На основании испытания препарата «Рифизостреп» против возбудителей микобактерий туберкулёза установлено, что препарат обладает высокой бактериостатической и бактерицидной активностью.

2. У зараженных туберкулёзом морских свинок после применения препарата «Рифизостреп» установлено, что в организме животных туберкулёз не развивается.

3. В организме морских свинок контрольной группы, зараженных возбудителями туберкулёза, но не получивших препарат, наблюдалось выраженное развитие

типичного туберкулёза во внутренних органах.

4. Показатели индекса поражённости органов у контрольных групп была выше в 2–3 раза, чем в опытных группах, получавших препарат.

5. При проведении экспериментальных исследований установлено, что препарат «Рифизостреп», в сравнении с изониазидом, проявляет ярко выраженную антимикробную активность, что открывает перспективы продолжения исследований в данном направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Закон Республики Узбекистан «О защите населения от туберкулёза» от 11.05.2001 г. № 215–11. – 6 л.
2. Антибиотики, сульфаниламиды и нитрофураны в ветеринарии / В. Ф. Ковалев [и др.] / М. : ВО «АГРОПРОМИЗДАТ», 1988. – 222 с.
3. Гарифуллин, З. Р. Материалы юбилейной сессии, посвященной 80-летию ЦНИИТ РАМН, 75-летию со дня рождения акад. РАМН А. Г. Хоменко. – М., 2001. – С. 113–114.
4. Донченко, Х. А. Использование средств и методов диагностики и профилактики туберкулёза крупного рогатого скота : автореф. дис. ... д-ра ветеринар. наук / Х. А. Донченко. – Новосибирск, 2008. – 36 с.
5. Донченко, Н. А. Роль туберкулостатических препаратов в системе противотуберкулезных мероприятий / Н. А. Донченко, А. С. Донченко, А. А. Колосов // Современное состояние и актуальные проблемы развитие ветеринарной науки и практики : материалы Междунар. науч. практ. конф., посв. 100-летию КазНИВИ. – Алматы, 2005. – С. 144–145.
6. Жумаиш, А. С. Меры борьбы и профилактики туберкулёза КРС в мелкофермерских и крестьянских хозяйствах // Роль ветеринарной науки в развитии животноводства : Материалы междунар. науч.-произв. конф. / КазНИВИ. – Алматы, 2000. – С. 103–104.
7. Лысенко, А. П. Разработка и внедрение новых методов диагностики и профилактики туберкулёза в Республике Беларусь / А. П. Лысенко, А. Е. Высоцкий, Т. Н. Агеева // Ветеринарная патология. – 2004. – № 1–2. – С. 41–43.
8. Лечение туберкулёза: рекомендации для национальных программ / ВОЗ – Женева, 1998. – 77 с.
9. Лысенко, А. П. Разработка и внедрение новых методов диагностики и профилактики туберкулёза в Республике Беларусь / А. П. Лысенко, А. Е. Высоцкий, Т. Н. Агеева // Ветеринарная патология. – 2004. – № 1–2. – С. 41–43.
10. Финкель, Э. А. Биологический метод исследования при туберкулёзе / Э. А. Финкель, Л. В. Михайлова. – Фрунзе : Кыргызстан, 1976. – С. 118–149.
11. Яценко, Т. Н. Руководство по лабораторным исследованиям по туберкулёзу / Т. Н. Яценко, И. С. Мечева. – М. : Медицина, 1973.

наша продукция



УДК 636.4; 636.082

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-2-58-63>

Богданович Д.М., кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству», г. Жодино

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО БИОФИЗИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА КАЧЕСТВО СПЕРМЫ ХРЯКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Резюме

Двукратная комплексная биофизическая обработка с интервалом 5 мин с длительностью воздействия 90 с с определенными частотами: волны КВЧ (удельная мощность потока 0,5–1 мВт/см², 53 ГГц – 1 линия поглощения кислорода, 150 ГГц – 1 линия поглощения монооксида азота), магнитные волны (24 мТс) и ИК-лазер (импульсный режим с тактовой частотой 10 кГц) сводит к минимуму снижение подвижности спермиев в процессе хранения до 50 % (разница с контролем составляет 10 п.п.), увеличивает целостность мембран клеток спермиев на 7 %. Применение способа интенсификации двигательной активности и укрепления морфологической целостности спермиев путем комплексного биофизического воздействия на биоматериал хряков-производителей обеспечивает увеличение оплодотворяемости на 20 п.п по отношению к контролю и 10–20 п.п. к аналогам из других опытных групп, общего количества родившихся поросят на 10 и 1,5–8,0 %, живых – на 11,0 и 5,0–9,0 % по отношению к контролю и другим опытным группам.

Ключевые слова: хряки, сперма, поддерживающая среда, обработка, качество спермы.

Summary

Studies have found that twice with an interval of 5 min. with a duration of exposure of 90 seconds, a complex biophysical effect with certain frequencies: EHF waves (specific flux power 0.5–1 MW/cm², 53 Ghz – 1 oxygen absorption line, 150 Ghz – 1 nitrogen monoxide absorption line), magnetic waves (24 mTs) and an IR laser (pulse-the operating mode with a clock frequency of 10 kHz) allows minimizing the decrease in sperm motility during storage up to 50 % (the difference with the control is 10 p.p.), increasing the degree of integrity of sperm cell membranes by 7 %. The use of the method of intensification of motor activity and strengthening the morphological integrity of sperm through a complex biophysical effect on the biomaterial of boars-producers significantly contributes to an increase in fertilization by 10–20 pp compared with the control and 10–20 pp compared with analogues from other experimental groups, the total number of piglets born by 10 and 1,5–8,0 %, live – by 11.0 and 5,0–9,0 % in comparison with sows from the control and other experimental groups, respectively.

Keywords: boars, sperm, supportive environment, processing, sperm quality.

Поступила в редакцию 05.12.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

В условиях интенсивного развития животноводства биотехнология искусственного осеменения приобретает большое значение. От качества спермы зависит результат искусственного осеменения – оплодотворяемость маток. Получение от высококлассных производителей максимального количества полноценной спермопродукции позволяет снизить затраты технологии искусственного осеменения, шире использовать улучшателей и тем самым повысить эффективность ведения отрасли в целом [2, 4, 7]. Поэтому в последнее время все больший интерес у исследователей вызывают различные методы стимуляции половой функции производителей с целью улучшения качественных и количественных показателей спермы и ее оплодотворя-

ющей способности [5]. В их числе – стимуляция препаратами стероидной природы, а также гормонами, повышение воспроизводительной функции производителей путем изменения режимов содержания [8] и кормления, использование биостимуляторов, биологически активных веществ, витаминов и минералов, применение электростимуляторов, воздействие ультразвуком и др. на биологически активные точки [1, 3, 6].

Цель исследований – разработать биотехнологические методы подготовки спермы в технологии искусственного осеменения свиней, позволяющие длительное время сохранить высокую биологическую полноценность и оплодотворяющую способность половых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разработка методики приготовления поддерживающей среды (далее – ПС) при

центрифугировании эякулята на основе применения БАВ осуществлялась по следующей схеме (таблицы 1 и 2).

Таблица 1. – Состав поддерживающей среды

Группа	Состав поддерживающей среды
Контрольная	не добавлялась
1 опытная	100 мл ГХЦС-среды + 0,1 г крезацин + 0,3 г BSA
2 опытная	100 мл ГХЦС-среды +0,2 крезацин+ 0,3 г BSA
3 опытная	100 мл ГХЦС-среды +0,3 г крезацин + 0,3 г BSA
4 опытная	100 мл ГХЦС-среды +0,1 г крезацин + 0,6 г BSA
5 опытная	100 мл ГХЦС-среды +0,2 крезацин+ 0,6 г BSA
6 опытная	100 мл ГХЦС-среды +0,3 г крезацин + 0,6 г BSA
7 опытная	100 мл ГХЦС-среды +0,1 г крезацин + 1,0 г BSA
8 опытная	100 мл ГХЦС-среды +0,2 крезацин+ 1,0 г BSA
9 опытная	100 мл ГХЦС-среды +0,3 г крезацин + 1,0 г BSA

Таблица 2. – Состав поддерживающей среды

Группа	Состав поддерживающей среды
Контрольная	не добавлялась
1 опытная	100 мл дистиллированной воды + 0,1 г крезацин + 0,3 г BSA
2 опытная	100 мл дистиллированной воды +0,2 крезацин+ 0,3 г BSA
3 опытная	100 мл дистиллированной воды +0,3 г крезацин + 0,3 г BSA
4 опытная	100 мл дистиллированной воды +0,1 г крезацин + 0,6 г BSA
5 опытная	100 мл дистиллированной воды +0,2 крезацин+ 0,6 г BSA
6 опытная	100 мл дистиллированной воды +0,3 г крезацин + 0,6 г BSA
7 опытная	100 мл дистиллированной воды +0,1 г крезацин + 1,0 г BSA
8 опытная	100 мл дистиллированной воды +0,2 крезацин+ 1,0 г BSA
9 опытная	100 мл дистиллированной воды +0,3 г крезацин + 1,0 г BSA

На первом этапе исследований проведен сравнительный эксперимент, во время которого свежеполученные неразбавленные эякуляты разделялись на 10 равных частей и разбавлялись согласно схеме 1 перед центрифугированием (первый опыт) и после (второй опыт). Центрифугирование проводилось в конических пробирках Eppendorf в течение 5 мин при 1500 об/мин. По окончании готовый центрифугат выдерживался в течение 1 ч при комнатной температуре и затем разбавлялся стандартной ГХЦС-средой до нужной концентрации спермиев (3 млн/мл).

На следующем этапе исследований проведен сравнительный эксперимент, во

время которого свежеполученные неразбавленные эякуляты разделялись на 10 равных частей и разбавлялись согласно схеме 2. Центрифугирование проводилось в конических пробирках Eppendorf в трех сравнительных режимах: в течение 5 мин при 1500 об/мин, в течение 10 мин при 1500 об/мин и в течение 3 мин при 2000 об/мин. По окончании готовый центрифугат разбавлялся ПС, выдерживался в течение 1 ч при комнатной температуре и затем разбавлялся стандартной ГХЦС-средой до нужной концентрации спермиев (3 млн/мл).

Во время всех экспериментов оценка спермы проводилась в несколько эта-

пов: 1 – свежеполученная, 2 – после центрифугирования, разбавления ПС и 1 ч хранения, 3 – разбавленная ГХЦС-средой и хранившаяся 24; 48 и 72 часа хранения при температуре 16–18 °С.

Для изучения оплодотворяющей способности спермы в зависимости от состава ПС и режимов центрифугирования было сформировано 3 группы свиноматок по 30 голов в каждой, которых осеменили спермой хряков, обработанной согласно разработанному методу. Изучались следующие показатели:

- оплодотворяемость после первого осеменения, %;
- количество поросят на опорос, всего, гол.;
- масса гнезда в 21 день.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка методики проводилась с помощью экспериментального прибора, позволяющего за счет наличия излучателей магнитных, лазерных и КВЧ-волн осуществлять комплексное биофизическое воздействие с определенными частотами: волны КВЧ (удельная мощность потока 0,5–1 мВт/см², 53 ГГц – 1 линия поглощения кислорода, 150 ГГц – 1 линия поглощения монооксида азота), магнитные волны (8 и 24 мТс) и ИК-лазер (импульсный режим с тактовой частотой 10 кГц).

Результаты изучения подвижности спермы хряков-производителей при разных вариантах обработки отражены в таблице 3.

Таблица 3. – Динамика двигательной активности половых гамет хряков-производителей при разных вариантах биофизического воздействия

Группа	Количество эякулятов	Подвижность, баллы	
		время хранения, ч	
		1	24
Контроль	22	6,6±0,14	5,5±0,11
1 опытная	22	7,2±0,16**	6,5±0,16***
2 опытная	22	7,2±0,13**	6,4±0,17***
3 опытная	22	7,5±0,11***	7,0±0,14***

Примечание – здесь и далее * $P < 0,05$, 0,02; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Установлено, что однократное применение комплексного биофизического воздействия (крайне высокочастотное излучение совместно с магнитным полем и лазерным излучением (удельная мощность потока 0,5–1 мВт/см², 53 ГГц – 1 линия поглощения кислорода, 150 ГГц – 1 линия поглощения монооксида азота), магнитные

волны (8 и 24 мТс) и ИК-лазер (импульсный режим с тактовой частотой 10 кГц) позволило получить более высокие результаты двигательной активности половых гамет хряков спустя 24 ч хранения разбавленных эякулятов: разница с контрольной группой составила 1,5 балла, с остальными опытными группами – 0,5–0,6 балла.

Таблица 4. – Взаимосвязь осмотического давления и различных вариантов биофизического воздействия

Группа	Количество эякулятов	Осмотическое давление, мОсм/л	
		время хранения, ч	
		1	24
Контроль	22	306,0±0,85	328,0±0,96
1 опытная	22	312,0±0,96***	314,0±0,85
2 опытная	22	305,0±0,84	310,0±0,86
3 опытная	22	309,0±0,78*	312,0±0,95

Анализируя опытные данные таблицы 4, можно отметить увеличение осмотического давления в течение 24 ч хранения в эякулятах контрольной группы на 7 %.

В то же время в пробах опытных групп изучаемый показатель находился на сравнительно одинаковом уровне 310 мОсм/л, что может свидетельствовать

о положительном воздействии биофизической обработки на гомеостаз среды в спермиях.

Результаты изучения двигательной активности половых гамет хряков-производителей отражены в таблице 5.

Таблица 5. – Динамика двигательной активности половых гамет хряков-производителей при комплексном биофизическом воздействии

Группа	Количество эякулятов	Подвижность при хранении, балл			
		1 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль	40	6,6±0,23	5,9±0,30	4,6±0,30	2,7±0,29
1 опытная	40	6,0±0,24	5,2±0,32	5,0±0,39	2,6±0,28
2 опытная	40	5,8±0,28*	5,5±0,24	4,7±0,26	3,3±0,27
3 опытная	40	5,9±0,13*	5,3±0,16	5,0±0,31	2,9±0,26
4 опытная	40	6,3±0,10	6,0±0,21	5,4±0,21*	3,3±0,25
5 опытная	40	6,8±0,11	6,6±0,18	5,5±0,28*	3,4±0,24

Биофизическая стимуляция спермы хряков оказывает благоприятное воздействие на двигательную активность половых клеток. Так, спустя 24 ч хранения подвижность находилась на уровне 5,2–5,5 баллов в первой, второй и третьей опытных группах, 6,0 и 6,6 балла – в четвертой и пятой, соответственно. В контроле отмечено 5,9 балла.

После 48 ч хранения минимальное значение указанного показателя выявлено в контрольной группе – 4,6 балла, максимальное – в пятой опытной группе (5,5 балла).

При 72 ч хранения минимальное значение двигательной активности спермиев также отмечено в контрольной группе – 2,7 балла, максимальное – в пятой опытной группе (3,4 балла).

За 72 ч хранения отмечено снижение значения в контроле на 60 %, а в опытных группах – на 57; 56; 49; 48 и 50 %, соответственно.

Таким образом, комплексное биофизическое воздействие на биоматериал хряков-производителей позволяет минимизировать снижение подвижности спермиев в течение хранения на 10 п.п. – до 50 % – в 3, 4 и 5 опытных группах в сравнении с контролем (60 %).

В результате анализа полученных данных установлено, что схема воздействия, применяемая в 1 и 2 опытных группах, не оказала влияния на целостность мембран гамет (снижение сохранности на 28 и 10 %, соответственно), в эякулятах 3

опытной группы позволила замедлить процесс деструкции, а в 4 и 5 опытной группах – на 6,9 и 7,1 % соответственно повысить степень целостности мембран клеток спермиев.

Ненормально сформированный хвостик не допускает прогрессирующего движения половых гамет и может затруднить их проникновение в маточную трубу, не говоря уже о возможности пенетрации яйцеклетки. При оценке спермопроб установлено минимальное количество клеток с указанной патологией.

Таким образом, комплексное биофизическое воздействие на биоматериал хряков-производителей способствует сохранению высокой биологической полноценности половых клеток в течение длительного хранения разбавленных эякулятов. Кроме того, разработанная схема стимуляции оказывает положительное влияние на целостность клеток.

Анализируя опытные данные, можно отметить увеличение осмотического давления в течение 72 ч хранения во всех группах. В то же время минимальная дельта значений выявлена в эякулятах 5 опытной группы, что может свидетельствовать о положительном воздействии на гомеостаз среды в спермиях.

В результате опыта выявлены изменения двигательной активности и целостности цитоплазматических мембран половых гамет при комплексном биофизическом воздействии на биоматериал хряков-производителей. Установлено, что дву-

кратное с интервалом 5 мин и длительностью 90 с комплексное биофизическое воздействие с определенными частотами: волны КВЧ (удельная мощность потока 0,5–1 мВт/см², 53 ГГц – 1 линия поглощения кислорода, 150 ГГц – 1 линия поглощения монооксида азота), магнитные волны (8 и 24 мТс) и ИК-лазер (импульсный режим с тактовой частотой 10 кГц) позволяет минимизировать снижение подвижности спермиев в течение хранения до 50 (разница с

контролем составляет 10 п.п.), повысить степень целостности мембран клеток спермиев на 7 %, сократить разницу осмотического давления до 30 мОсм/л.

Проведя анализ полученных данных, можно отметить, что в контрольной и 1 опытной группах оплодотворяемость составила 70 %, общее число поросят – 11,1–11,3 гол., живых – 10,6–10,8 гол. (таблица 6).

Таблица 6. – Оплодотворяющая способность половых гамет при комплексном биофизическом воздействии на сперму хряков-производителей

Группа	Свиноматки, гол.		Оплодотворяемость, %	Многоплодие, гол.	
	покрыто	опоросилось		всего	живых
Контроль	20	14	70	11,1±0,27	10,6±0,20
1 опытная	20	14	70	11,3±0,24	10,8±0,21
2 опытная	20	15	75	11,6±0,29	11,2±0,17*
3 опытная	20	16	80	11,2±0,19	10,8±0,20
4 опытная	20	16	80	12,0±0,20*	11,2±0,15*
5 опытная	20	18	90	12,2±0,17**	11,8±0,13***

Установлено увеличение показателей репродукции во 2–4 опытных группах: оплодотворяемость повысилась на 5–10 %, общее число поросят – на 0,3–0,7 гол., живых – на 0,4–1,2 гол. соответственно.

У животных 5 опытной группы установлены наибольшие значения изучаемых показателей: оплодотворяемость возросла до 90 %, многоплодие – до 12,2 и 11,8 гол. соответственно.

Таким образом, комплексное биофизическое воздействие с определенными частотами: волны КВЧ (удельная мощность потока 0,5–1 мВт/см², 53 ГГц – 1 линия поглощения кислорода, 150 ГГц – 1 линия поглощения монооксида азота), магнитные волны (8 и 24 мТс) и ИК-лазер (импульсный режим с тактовой частотой 10 кГц) двукратно с интервалом 5 мин и длительностью воздействия 90 с достоверно способствует повышению оплодотворяемости на 20 п.п. в сравнении с контролем и 10–20 п.п. в сравнении с аналогами из других опытных групп, общего числа родившихся поросят на 10 и 1,5–8,0 %, живых – на 11,0 и 5,0–9,0 % в сравнении с свиноматками из контрольной и остальных опытных групп соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что двукратное с интервалом 5 мин с длительностью воздействия 90 с комплексное биофизическое воздействие с определенными частотами: волны КВЧ (удельная мощность потока 0,5–1 мВт/см², 53 ГГц – 1 линия поглощения кислорода, 150 ГГц – 1 линия поглощения монооксида азота), магнитные волны (24 мТс) и ИК-лазер (импульсный режим с тактовой частотой 10 кГц) позволяет минимизировать снижение подвижности спермиев в течение хранения до 50 % (разница с контролем составляет 10 п.п.), повысить степень целостности мембран клеток спермиев на 7 %, сократить разницу осмотического давления до 30 мОсм/л. Отмечено, что использование метода интенсификации двигательной активности и укрепления морфологической целостности спермиев путем комплексного биофизического воздействия на биоматериал хряков-производителей достоверно способствует повышению оплодотворяемости на 20 п.п. в сравнении с контролем и 10–20 п.п. в сравнении с аналогами из других опытных групп, общего числа родившихся поросят на 10 и 1,5–8,0 %, живых – на 11,0 и 5,0–9,0 % в сравнении со свиноматками из контрольной и остальных опытных групп, соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние разных сочетаний санирующих препаратов в разбавителе на качественные показатели спермы хряков-производителей / О. И. Суббот // *Аспекты животноводства и производства продуктов питания: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 110-й годовщине со дня рождения П. Е. Ладана.* – 2018. – С. 156–162.

2. Влияние разных сочетаний санирующих препаратов в разбавителе на качественные показатели спермы хряков-производителей / О. И. Суббот // *Социально-экономические и экологические аспекты развития Прикаспийского региона: материалы Междунар. науч.-практ. конф.* – 2019. – С. 243–246.

3. Гливанская, О. И. Влияние санирующих препаратов широкого спектра действия на подвижность спермы хряков-производителей / О. И. Гливанская // *Зоотехническая наука Беларуси.* 2016. – Т. 51. – № 1. – С. 43–47.

4. Зависимость качественных показателей спермы хряков от состава разбавителя / О. И. Суббот // *Инновационное развитие аграрно-пищевых технологий : материалы Междунар. науч.-практ. конф. ; под общ. ред. И. Ф. Горлова.* – 2020. – С. 73–77.

5. Зависимость качества спермы хряков от состава разбавителя / Суббот О. И. // *Научное обеспечение устойчивого развития агропромышленного комплекса : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной памяти академика РАН В. П. Зволинского и 30-летию создания ФГБНУ «ПАНЦ РАН» / Прикаспийский аграрный федеральный научный центр РАН.* – Солонное Займище, 2021. – С. 1510–1514.

6. Повышение половой активности хряков-производителей / О. И. Суббот // *Проблемы интенсивного развития животноводства и их решение: сб. науч. тр. Междунар. науч.-практ. студенческой конф.* – 2020. – С. 259–263.

7. Технология применения биостимуляторов нового поколения для повышения репродуктивных качеств различных половозрастных групп свиней: мет. рек. / Д. М. Богданович, А. И. Будевич, О. И. Гливанская ; Нац. акад. наук Беларуси, Науч.-практический центр Нац. акад. наук Беларуси по животноводству. – Жодино, 2016. – 11 с.

8. An endocrinological study of the influence of spring and autumn photoperiods on puberty in boars: *World Conf. Hronobiol and Chronother., Ferrara, Sept. 6 – 10, 1995 / Andersson H., Forsberg M. // Biol. Rhythm Res.* – 1995. – 26, № 4. – P. 361–362.

ВАКЦИНА ИНАКТИВИРОВАННАЯ ЭМУЛЬГИРОВАННАЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОЛИБАКТЕРИОЗА (ЭШЕРИХИОЗА)



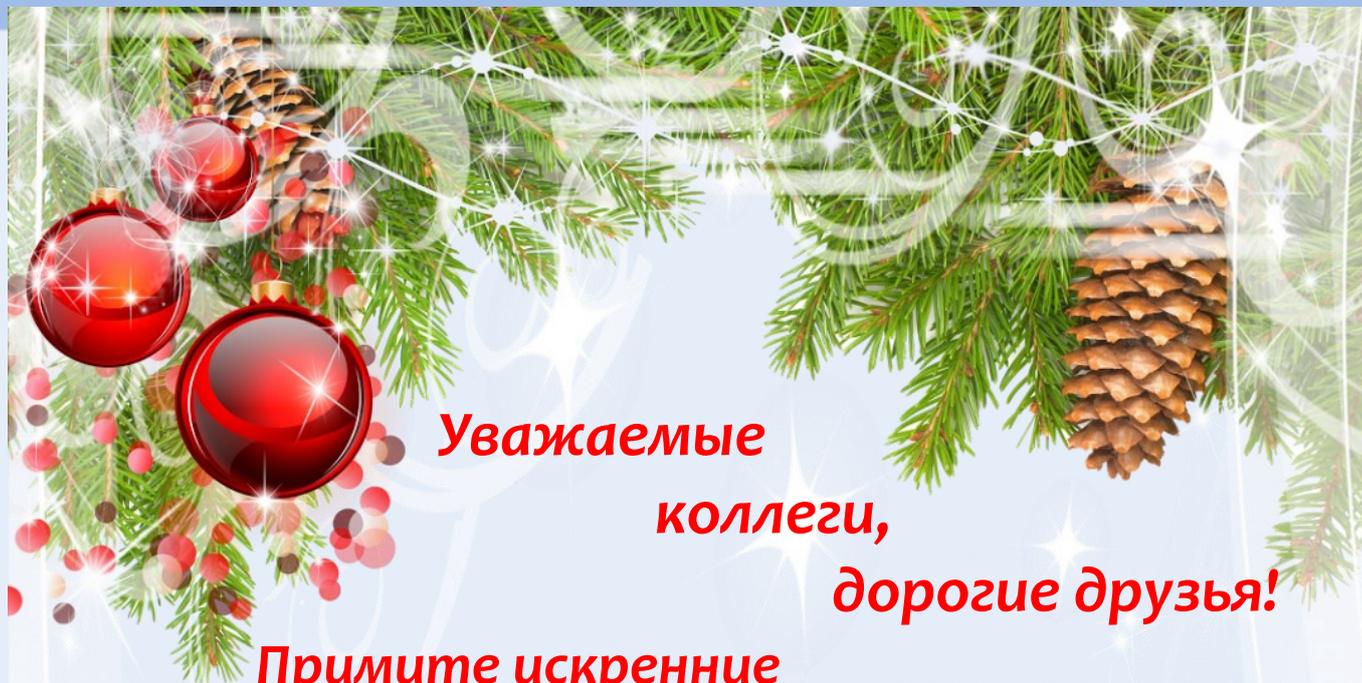
КОЛИТОКС-ЛТ

WWW.BIEVM.BY

► для иммунизации глубокостельных коров, нетелей и телят в неблагополучных и угрожаемых по колибактериозу и клебсиеллезу хозяйствах

► изготовлена из штаммов бактерий *Escherichia coli* с адгезивными антигенами F41, K88 (F4), K99 (F5), A20 (F17); *Klebsiella pneumoniae*; рекомбинантной субъединицы В термолabileного токсина *Escherichia coli*; масляного адьюванта

► адгезивные антигены и термолabileный энтеротоксин *E. coli* имеют белковую природу и обладают высокой иммуногенной активностью



**Уважаемые
коллеги,
дорогие друзья!
Примите искренние
поздравления
с Новым 2023 годом!**

Пусть этот год станет стартовой площадкой для новых взлётов, достижений, открытий и побед! Пусть в новом году любое начинание будет обречено на неоспоримый успех, а планы легко и точно реализуются в конкретные дела и мероприятия.

Огромного вам заряда бодрости, железного здоровья, душевного покоя и оптимизма!

