

МЕЖДУНАРОДНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
Выпускается с 2004 года

ISSN 2224-168X
ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС: 00802
008022

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

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

Жалдыбин В.В. – кандидат ветеринарных наук, доцент

ЗАМ. ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Гласкович М.А. – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

СЕКРЕТАРЬ:

Стрельчя И.И. – кандидат ветеринарных наук, доцент

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Борисовец Д.С. – кандидат ветеринарных наук, доцент

Шемелева Н.Ю. – кандидат ветеринарных наук, доцент

Каменская Т.Н. – кандидат ветеринарных наук, доцент

Андрусевич А.С. – кандидат ветеринарных наук, доцент

Николаевич Л.Н. – кандидат биологических наук, доцент

Новикова О.Н. – кандидат ветеринарных наук, доцент

Захарик Н.В. – кандидат ветеринарных наук

НАД НОМЕРОМ РАБОТАЛИ:

Ларькова А.Е.

Лукьянова И.А.

Пуцько С.Г.

При использовании авторами материалов журнала «Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария» ссылка на журнал **обязательна**

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);

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

Забережный А.Д. – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН (г. Москва);

Карпенко Л.Ю. – доктор биологических наук, профессор (г. Санкт-Петербург);

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

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

Кучинский М.П. – доктор ветеринарных наук, профессор (г. Минск);

Лысенко А.П. – доктор ветеринарных наук, профессор (г. Минск);

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

Паршин П.А. – доктор ветеринарных наук, профессор (г. Воронеж);

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

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

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

Соляник А.В. – доктор сельскохозяйственных наук, профессор (г. Горки);

Тимошенко В.Н. – доктор сельскохозяйственных наук, профессор (г. Жодино).

Все статьи рецензируются

© «Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария»

СО ДЕР Ж А Н И Е**ЭПИЗООТОЛОГИЯ**

Каяк Ю.А. КОРОНАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ, ВЫЗВАННАЯ ВИРУСОМ SARS-COV-2, У НОРОК. РАСПРОСТРАНЕНИЕ В МИРЕ (ОБЗОР) 3

Красникова Е.Л., Притыченко А.Н., Садовский А.Л., Громов И.Н. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНК ЦИРКОВИРУСА ВТОРОГО ТИПА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ОТ СВИНЕЙ 7

ИММУНОБИОЛОГИЯ

Стрельченя И.И., Полоз С.В., Андруевич А.С. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ СЫВОРОТОК КРОВИ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ CV-1 15

Красочко П.А., Борисовец Д.С., Станкуть А.Э. ЭФФЕКТИВНОСТЬ НАНО- И КОЛЛОИДНЫХ ЧАСТИЦ СЕРЕБРА ПРИ РЕСПИРАТОРНЫХ БОЛЕЗНЯХ ТЕЛЯТ 19

Стрельченя И.И., Полоз С.В., Андруевич А.С. К ВОПРОСУ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЯДК ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ 24

Красочко П.А., Красочко П.П., Колесникович К.В., Иващенко И.А., Прокулевич В.А., Зинченко А.И. ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В РАЗРАБОТКЕ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРИИ (ОБЗОР) 29

ФАРМАКОЛОГИЯ

Николаевич Л.Н., Згировская А.А., Церковский Д.А., Якубовский С.М. ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ МТТ-АНАЛИЗА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ 35

САНИТАРИЯ

Борисевич А.С., Высоцкий А.Э., Лысенко А.П. ДЕЙСТВИЕ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ ТЕОТРОПИНА НА ЭПИЗОТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ 44

Кучинский М.П., Крашевская Т.П., Кучинская Г.М. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ МИКОТОКСИНОВ В РАЦИОНАХ ЖИВОТНЫХ (ОБЗОР) 52

CONTENTS**EPIZOOTOLOGY**

Kayak Yu.A. CORONAVIRUS INFECTION CAUSED BY THE SARS-COV-2 VIRUS IN MINKS. DISTRIBUTION IN THE WORLD (OVERVIEW)

Krasnikova E.L., Pritychenko A.N., Sadovsky A.L., Gromov I.N. IDENTIFICATION OF DNA OF CIRCOVIRUS OF THE SECOND TYPE IN BIOLOGICAL MATERIAL FROM PIGS

IMMUNOBIOLOGY

Strelchenya I.I., Poloz S.V., Andrusovich A.S. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFECTIVENESS OF BLOOD SERA FOR CULTURING THE TRANSPLANTED CELL LINE CV-1

Krasochko P.A., Borisovets D.S., Stankut A.E. EFFECTIVENESS OF NANO- AND COLLOIDAL SILVER PARTICLES IN RESPIRATORY DISEASES OF CALVES

Strelchenya I.I., Poloz S.V., Andrusovich A.S. TO THE QUESTION OF RESTORATION OF CRYOPRESERVED YADK CELL CULTURE FOR OBTAINING IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS

Krasochko P.A., Krasochko P.P., Kolesnikovich K.V., Ivashchenko I.A., Prokulevich V.A., Zinchenko A.I. GENETIC ENGINEERING TECHNOLOGIES IN THE DEVELOPMENT OF BIOLOGICS FOR VETERINARY MEDICINE (REVIEW)

FARMACOLOGY

Nikolaevich L.N., Zgirovskaya A.A., Tserkovsky D.A., Yakubovsky S.M. OPTIMIZATION OF THE CONDITIONS FOR MTT ANALYSIS OF CELL VIABILITY FOR STUDYING THE CYTOTOXIC EFFECTS OF PREPARATIONS ON HUMAN AND ANIMAL CELL LINES

SANITATION

Borisevich A.S., Vysotsky A.E., Lysenko A.P. THE EFFECT OF DISINFECTANT COMPOSITIONS BASED ON THEOTROPIN ON EPIZOOTICALLY SIGNIFICANT MICROORGANISMS

Kuchinsky M.P., Krashevskaya T.P., Kuchinskaya G.M. BIOLOGICAL METHODS FOR REDUCING THE CONTENTS OF MYCOTOXINS IN ANIMAL DIETS (REVIEW)

Компьютерная верстка: ЛУКЬЯНОВА И.А.

Подписано в печать 14.12.2023 г.

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

Уч.-изд. л. , усл. печ. л. 7,0 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.

УДК 636.934.57:578.834.1

Каяк Ю.А., аспирант

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

КОРОНАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ, ВЫЗВАННАЯ ВИРУСОМ SARS-COV-2, У НОРОК. РАСПРОСТРАНЕНИЕ В МИРЕ (ОБЗОР)

Резюме

В статье приведены современные литературные данные по восприимчивости разных видов животных, в т.ч. норок, к коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

Ключевые слова: норки, вирус, COVID-19, SARS-CoV-2, инфекция, ВОЗ, кошки, собаки.

Summary

The article presents modern literature data on the susceptibility of different animal species, incl. minks to the coronavirus infection caused by the SARS-CoV-2 virus.

Keywords: mink, virus, COVID-19, SARS-CoV-2, infection, WHO, VOD, cats, dogs.

Поступила в редакцию 01.09.2023 г.

ВВЕДЕНИЕ

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) оказывает значительное влияние на население во всем мире. С момента регистрации первых случаев заражения человека SARS-CoV-2 до сегодняшнего времени в мире зафиксировано более 690283602 случаев, 6890405 человек погибло. Появляются сведения о том, какое влияние вирус SARS-CoV-2 оказывает на домашних, сельскохозяйственных и диких животных. В результате анализа литературных источников установлено, что домашние кошки и собаки инфицируются SARS-CoV-2, но остаются бессимптомными вирусоносителями, или же у них развиваются легкие клинические признаки заболевания. Новым коронавирусом могут заражаться и другие представители семейства кошачьих (львы и тигры). Норки и хорьки также восприимчивы к заболеванию, причем норки не просто восприимчивы к инфекции: у них развивается смертельное заболевание, и вирус может передаваться от норок к человеку и наоборот [1].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для подготовки статьи использованы и подвергнуты анализу материалы международных научно-практических конференций, научных статей, документы ветеринарного законодательства Республики Беларусь.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В настоящее время в республике имеется семь крупных и около двадцати средних и мелких звероводческих хозяйств, которые выращивают около 1 млн пушных зверей. Промышленное звероводство является весьма перспективной отраслью народного хозяйства и основной базой для меховой промышленности, а также экспорта пушнины. Рентабельность производства пушнины достигает 40 %. Ведение звероводства как успешный бизнес возможно только при условии знания биологических особенностей пушных зверей, соблюдения современных технологий их содержания и кормления, а также при использовании профилактических средств и средств лечения заболеваний инфекционной и незаразной этиологии [2].

В историю XX век вошел как период изучения острых респираторных заболеваний и формирования системы борьбы с вирусами гриппа. В XXI же веке нужна система в отношении особо опасных бета-коронавирусов: тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), тяжелого острого респираторного синдрома 2-го типа (SARS-CoV-2), Ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) [3].

Исходя из быстрого распространения инфекции, большого количества инфицированных и высокого базового показателя репродукции инфекции, можно утвер-

ждать, что эпидемия COVID-19 является более опасной в сравнении с предыдущими вспышками пневмоний, вызванными коронавирусами.

Коронавирусы способны инфицировать человека и некоторых животных, вызывая заболевания дыхательных путей или желудочно-кишечного тракта. В естественных условиях коронавирусы имеют строгую видовую принадлежность. Коронавирусы свиней, к примеру, вызывают заболевания именно у свиней и не опасны для человека. При сочетании определенных факторов коронавирусы животных приобретают способность заражать людей, вызывая заболевание, а в последующем становятся способными передаваться от человека человеку. Это происходит благодаря рекомбинации (реассортации) генетического материала коронавирусов животного и человека [4].

Согласно данным Всемирной организации по охране здоровья животных, норки «заражаются от инфицированных коронавирусом людей». Несмотря на то, что передача коронавируса от животного к человеку возможна, в основном он все же передается между людьми. «Норки могут служить резервуаром для SARS-CoV-2, передавая вирус друг другу и представляя риск в том, что касается передачи вируса от норок человеку. Люди могут затем передавать вирус внутри человеческой популяции. Может происходить также передача от человека норкам» (данные ВОЗ). При этом при передаче между человеком и животными «возможна генетическая модификация вируса». Дания зарегистрировала передачу коронавируса человеку от норки 214 раз. В 12 случаях это была «уникальная разновидность» вируса. Все 12 случаев были выявлены в Северной Ютландии (регион Дании). Клиническая картина у этих пациентов была аналогична той, что и у пациентов с SARS-CoV-2. Как сообщает ВОЗ, «уникальная разновидность» вируса имеет комбинацию мутаций или изменений, которые прежде не наблюдались [5].

Инфицирование норок вирусом было отмечено не только в Дании, но и еще в пяти государствах (Италия, Испания, Нидерланды, Швеция, США). Как сообщает Всемирная организация по охране здоровья животных в опубликованном в Женеве информационном бюллетене, Российской Федерации среди этих стран нет [6].

Отмечается, что коронавирус может передаваться как между животными этого вида, так и от норок к человеку. При этом межвидовое перемещение вируса вызывает у него генетические модификации [7].

С лета и до октября 2020 г. в Дании зарегистрировали 214 случаев заражения человека мутировавшим коронавирусом, передавшимся от норок. Власти страны подчеркнули, что новая форма вируса вызывает слабую выработку антител, что ставит под угрозу усилия по созданию вакцины. Было принято решение уничтожить всех норок в стране – 15–17 млн животных [8].

В Швеции были вспышки COVID-19 на 10 норковых фермах из почти 40 хозяйств. При этом проводить ликвидацию животных там не планируют – в стране практически не осталось диких норок, которые могли бы переносить вирус от фермы к ферме, поэтому проблема считается локализованной [9].

Центр по контролю и профилактике заболеваний США сообщил, что коронавирус обнаружен на 11 норковых фермах. Американская ветеринарная медицинская ассоциация сообщила, что по меньшей мере 8000 норок умерли от инфекции на фермах в Юте. Еще почти 3400 норок погибли в Висконсине. Там заметили, что инфекция, по-видимому, более опасна среди старых норок [10].

В Нидерландах впервые о заболевании норок на двух фермах стало известно в апреле 2020 г. У животных были выявлены симптомы COVID-19, наблюдалась повышенная смертность. При этом в правительстве страны заявили, что норки, вероятнее всего, заразились от человека [11].

В ноябре итальянская организация по защите животных LAV обратилась в Министерство здравоохранения с призывом закрыть все норковые фермы в стране на карантин с января 2021 г., а до этого провести санитарную инспекцию всех этих предприятий. Зоозащитники выяснили, что на норковых фермах не соблюдаются протоколы по биологической безопасности. Сотрудники нарушают правила гигиены и санитарии, а животные содержатся в тесных и грязных клетках: рядом со здоровыми норками содержатся больные. Всего в Италии разведением норок занимаются 8 ферм, где содержится 60 тыс. животных [12].

В июле правительство автономного округа Арагон в Испании проинформировало о намерении уничтожить более 90 тыс. норок, заразившихся COVID-19. Мера была названа превентивной. Происходит ли передача вируса от животных к человеку, установлено не было [13].

Анализ литературных данных показал, что с 23 апреля 2020 г. (впервые была зарегистрирована вспышка SARS-CoV-2 на норковой ферме в Нидерландах) о распространении SARS-CoV-2 на норковых фермах сообщалось из таких стран, как Дания, Канада, Польша, Франция, Греция, Италия, Литва, Нидерланды, Испания, Швеция и США [14]. При этом было установлено, что степень распространения коронавируса SARS-CoV-2 среди норковых ферм составляет от 25 % (290/1147) до 48 % (190/394) [1]. 20,4 % (20/98) норок были положительными в ОТ-ПЦР, 89 % (82/92) были серопозитивными [14].

Ученые все еще сомневаются в том, что животные могут передать вирус человеку, но все-таки возможен обратный процесс.

Наглядный пример – это заражение животных в Гонконге. Кошки и собаки были заражены предположительно от владельцев, у которых был положительный тест на COVID-19. Животные были помещены на карантин и при проведении ПЦР на РНК SARS-CoV-2 дали положительный результат.

Первый случай возможной передачи SARS-CoV-2 от человека к животному – это 17-летний померанский шпиц, помещенный на карантин в Гонконге. Собака неоднократно тестировалась на ОТ-ПЦР на SARS-CoV-2 на низких уровнях в мазках из полости рта и носа (ProMED, 2020 г.). Собака оставалась RT-PCR-положительной в течение 12 дней после удаления из семьи ее владельца, где был подтвержден COVID-19. Секвенирование показало высокую идентичность вируса у собаки и ее владельца, что предполагает распространение вируса от человека к собаке (ProMED, 2020 г.). У данной собаки также были выявлены антитела к SARS-CoV-2. Это, в свою очередь, указывает на то, что произошла активная репликация вируса, а это привело к развитию иммунного ответа (ProMED, 2020 г.). Однако есть данные, что собака умерла через 3 дня после возвращения домой без каких-либо клинических признаков COVID-19. Поскольку посмертное обследование не

проводилось, неизвестно, вызывал ли вирус какие-либо патологические изменения. Причина смерти не была установлена, есть лишь данные, что у собаки были сопутствующие заболевания (ProMED, 2020 г.) [15].

После вышеописанного случая были еще зарегистрированы положительные тесты на новый коронавирус у собак, все они в анамнезе имели контакт с людьми, положительными на COVID-19.

Вторым видом животных, показавших многочисленные положительные результаты при диагностике на COVID-19, а также имевших клинические симптомы заболевания, стала домашняя кошка и ряд других представителей кошачьих (тигры и львы в зоопарке Нью-Йорка). Животные также имели в анамнезе контакт с больными людьми. Основными симптомами болезни у кошачьих было поражение органов дыхания (истечения из носа, ринит, одышка, поверхностное и частое дыхание, изменение типа дыхания с преобладанием брюшного, кашель). В ряде случаев отмечалось расстройство со стороны желудочно-кишечного тракта (диарея) [16].

Китайскими исследователями был проведен эксперимент и доказана передача SARS-CoV-2 от особи к особи внутри популяции кошки домашней. Итальянские ученые исследовали кошек и собак в наиболее пораженных COVID-19 районах Италии и выявили довольно высокий процент животных с антителами к SARS-CoV-2 (собаки – более 30 %, кошки – более 40 % от всех обследованных животных), что говорит о восприимчивости данных видов к новому вирусу. За последние месяцы поступил ряд сообщений о заражении пушных животных на звероводческих фермах, где присутствовал больной персонал (Нидерланды, Дания, Испания). Есть данные о быстрой передаче SARS-CoV-2 в популяции пушных животных. Испанские звероводы сообщают об инфицировании более 80 % поголовья норок на ферме. На сайте Международного эпизоотического бюро (МЭБ) имеются данные о регистрации всех положительных случаев COVID-19 у животных. Тем не менее исследователи начали принимать меры предосторожности против возможности распространения вируса не от животных к людям, а наоборот [1]. Исходя из вышесказанного, вопрос о возможности инфицирования но-

вым типом коронавируса различных животных и их вероятном участии в распространении болезни довольно актуален.

Для изучения возможного инфицирования проводились исследования домашних животных (кошка домашняя, собака, хорь) в Витебской и Минской областях. Клинические и патологоанатомические исследования проводили по общепринятым методикам. Для выявления вируса SARS-CoV-2 в организме животных отбирали пробы биологического материала: смывы (соскобы) со слизистых оболочек носовой полости, ротовой полости (глотки) и прямой кишки. Для выявления РНК вируса проводили полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) наборами для выделения РНК SARS-CoV-2. По результатам проведенных исследований вирус SARS-CoV-2 у домашних животных выделяли как из смывов со слизистой оболочки ротовой полости (глотки), так и со слизистой оболочки прямой кишки, что указывает пути выделения возбудителя из организма. Установлено, что через 2,5–3 месяца после контакта с

инфицированным хозяином и перенесенной болезни вирус не выделялся [1].

В настоящее время единственным в мире зарегистрированным профилактическим препаратом от COVID-19 для животных является разработанная ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» вакцина против коронавирусной инфекции (COVID-19) плотоядных животных сорбированная инактивированная «Карнивак-Ков». Аналогичная вакцина против коронавирусной инфекции плотоядных животных разрабатывается в настоящее время и в Республике Беларусь на базе РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С учетом доказанных фактов передачи вируса SARS-CoV-2 от животных к человеку одним из важнейших путей борьбы с заболеванием является создание средств специфической профилактики коронавирусной инфекции (COVID-19) и для плотоядных животных, что является основной целью наших дальнейших исследований.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Баден, Л. Р. COVID-19 – поиск эффективной терапии / Л. Р. Баден, Е. Ю. Рубин // *J. Medical technology*. – 2020. – 1821 с.
2. Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://lektsii.org/7-38457.html>. – Дата доступа: 16.02.2023.
3. Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/covid-19-etiologya-klinika-lechenie>. <https://lektsii.org/7-38457.html>. – Дата доступа: 16.02.2023.
4. Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.diavax.ru/news/novaya-koronavirusnaya-pnevmoniya-covid-19/>. <https://lektsii.org/7-38457.html>. – Дата доступа: 17.02.2023.
5. Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.kommersant.ru/doc/4564552>. – Дата доступа: 01.03.2023.
6. Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://tass.ru/obschestvo/9938063>. – Дата доступа: 03.03.2023.
7. Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.theguardian.com/environment/2020/nov/09/denmark-drops-plans-for-mass-mink-cull-after-covid-mutation-fears>. – Дата доступа: 28.04.2023.
8. Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.avta.org/javta-news/2020-11-15/sars-cov-2-kills-thousands-minsk-utah>. – Дата доступа: 28.04.2023.
9. Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.rbc.ru/rbcfreeneews/5ea5ce5b9a79472b08cfb79c>. – Дата доступа: 29.04.2023.
10. Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://sev.tv/news/zoozashitniki_italii_prosjat_zakryt_norkovuye_fermy/28886.html. – Дата доступа: 29.04.2023.
13. Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ria.ru/20200716/1574443306.html>. – Дата доступа: 29.04.2023.
14. Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.rbc.ru/society/07/11/2020/5fa68ac99a794779368afa5a>. – Дата доступа: 29.04.2023.
15. Current status of epidemiology, diagnosis, therapeutics, and vaccines for novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) / Ahn DG [et al.] // *J. Microbiol Biotechnol.* – 2020. – Vol. 30 (3). – P. 313–324.
16. Субботина, И. А. COVID-19 в аспектах ветеринарной медицины / И. А. Субботина, И. И. Куприянов // *Ученые записки УО ВГАВМ.* – Т. 56, вып. 3. – 2020. – 54 с.

УДК 619:616.98:578:636.4

Красникова Е.Л., старший научный сотрудник¹
 Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
 Садовский А.Л., ветеринарный врач-консультант
 Громов И.Н., доктор ветеринарных наук, профессор²

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

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

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНК ЦИРКОВИРУСА ВТОРОГО ТИПА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ОТ СВИНЕЙ

Резюме

В статье приводятся данные патологоанатомической картины внутренних органов свиней разного возраста, а также результаты исследования различных биологических жидкостей с целью использования их в диагностике цирковиральной инфекции свиней.

Установлено, что наиболее доступными и информативными биологическими жидкостями являются носовая слизь и сперма. Из фекалий также выделяется геном цирковирала второго типа.

Исследование патологического материала указывает на то, что наибольшее количество геном-эквивалента выделяется от свиней в возрасте 90 дней.

Ключевые слова: ПЦР-диагностика ЦВС, ЦВИ, цирковирала свиней, PRDC.

Summary

The article presents data on the pathoanatomical picture of the internal organs of pigs of different ages, and studies various biological fluids from pigs of different ages with the aim of using them in the diagnosis of pig circovirus infection. It has been established that the most accessible and informative biological fluid is nasal mucus and sperm. The genome of circovirus type 2 is also isolated from feces.

Isolation of the circovirus genome from pathological material indicates that the largest amount of the genome equivalent is isolated from pigs at the age of 90 days.

Keywords: PCR diagnostics of PCV, porcine circovirus, PRDC.

Поступила в редакцию 16.10.2023 г.

ВВЕДЕНИЕ

Цирковирала второго типа (ЦВС-2, PCV2) является первичным патогеном, вызывающим ряд патологий в свиноводстве, характеризующийся разнообразием синдромов, включая синдром мультисистемного послеотъемного истощения, синдром дерматита и нефропатии, респираторный и ряд других. Цирковирала свиней второго типа относится к семейству *Circoviridae* и роду *Circovirus*.

Цирковирусы – это мелкие просторганизованные одноцепочечные вирусы, имеющие сегментированный кольцевой геном.

ЦВС-2 является первичным возбудителем нескольких синдромов, известных под общим названием «болезни, связанные с цирковиралом свиней» (PCVAD, ЦВЗС) [1, 2, 4]. Синдромы, связанные с PCVAD,

являются результатом коинфекции вируса PCV2 и других патогенов, таких как микоплазма и вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней [2, 3, 5].

Инфекция ЦВС-2 присутствует во всех крупных странах с производством свиней, и число выявленных случаев ЦВС быстро растет. В США максимальные потери составляют до 20 долларов на свинью [2, 3, 5].

На сегодняшний день выделяют ЦВС1, ЦВС2 и ЦВС3. Другими известными вирусами этого рода являются цирковирала канареек, цирковирала гусей, цирковирала голубей и т.п. Род *Gyrovirus* отличается тем, что имеет негативный смысловой геном и более крупные вирионы. Цирковирусы специфичны для хозяев, большинство из них являются птичьими или имеют относительно узкий круг хозяев. Некото-

рые виды вызывают истощение лимфоидных органов у инфицированных хозяев, тогда как другие – субклиническую инфекцию [2, 3, 5].

PCV1 и PCV2 имеют небольшой безоболочечный икосаэдрический вирион с одноплеточным кольцевым геномом ДНК, соответственно, они содержат 2 основные открытые рамки считывания (ORF-ORF1 кодирует белки репродукции вируса (Rep), а ORF2 кодирует белок капсида (Cap), который содержит иммунодоминантные антигенные эпитопы ORF1. PCV1 и PCV2 имеют 83%-ную идентичность нуклеотидов и 86%-ную – аминокислот [1, 3, 4].

Цирковирус второго типа наиболее опасен для свиней, т.к. вызывает в стаде цирковиральную инфекцию (ЦВИ), характеризующуюся мультисистемным поражением свиней разного возраста [1, 4]. Согласно проведенным нами ранее исследованиям, заболевание регистрируется в хозяйствах на территории Республики Беларусь [1].

Цель исследования – определить корреляцию выделения ДНК цирковируса свиней второго типа из биологического и патологического материала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор проб производился в хозяйстве, где вакцинация против цирковируса второго типа не проводится. Исследовали биологический материал (сыворотка крови свиней разного возраста, патологический материал от поросят (легкие, почки), аборт-плоды, сперма, носовая слизь). Исследования проводили в полимеразной цепной реакции (ПЦР), учитывались наличие клинической картины у животных, а также патологоанатомические изменения. Группы животных в исследовании:

- свиноматки (от них параллельно отбирали носовую слизь и кровь);
- хряки (параллельно отбирали кровь, сперму, тестикулярную жидкость);
- ремонтные свинки (отбирали кровь);
- свиньи возраста 45, 60, 95, 130–180 дней (прижизненно отбирали носовую слизь, а также патологический материал – кусочки паренхиматозных органов).

Пробоподготовка:

- патологический материал отбирали свежим, на границе здоровой и пораженной ткани. Смесь тканей почек, печени, селе-

зенки и легких измельчали в ступке до гомогенной массы с физраствором, затем центрифугировали при 13000 об/мин. В исследование брали надосадочную жидкость;

- у абортированного плода отбирали участок пуповины, внутригрудную и брюшную жидкости, а также кусочки почек и легких, пробоподготовку проводили аналогично патологическому материалу;

- носовая слизь отбиралась ватными палочками, транспортировалась без транспортной среды в чистых сухих стерильных пробирках, затем центрифугировалась в течение 5 мин при 12000 об/мин;

- сыворотку крови, сперму, тестикулярную жидкость использовали без предварительной подготовки;

- фекалии отбирали из анального прохода с помощью зонда и помещали в чистые стерильные пробирки.

Дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) из материала выделяли набором ДНК/РНК фактор («Ветфактор», Россия) согласно инструкции.

ПЦР проводили на амплификаторе «С 1000 Thermal Cycler» с блоком CFX96 Real Time System, BIO-RAD (США). Для ПЦР использовали набор реагентов для обнаружения возбудителя цирковируса второго типа у свиней методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «PCV-2 PCR REAL-TIME» производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» согласно инструкции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенных исследований нами установлено, что у молодняка наблюдаются признаки респираторной патологии и ММА (метрит-мастит-агалактия) у взрослых животных, а также встречаются аборты, прохолосты у свиноматок.

При патологоанатомическом вскрытии трупа мертворожденного поросенка нами обнаружены кровоизлияния на почках, спавшиеся легкие, небольшое количество транссудата в грудной и брюшной полостях, отек миокарда. Селезенка и печень без изменений (таблица 3).

При осмотре патологического материала от поросят разных возрастных групп нами установлены мелкие точечные крово-

излияния в корковом веществе почек, признаки катаральной и геморрагической пневмонии, поражение каудальных и верхушечных долей легких, в группах 95 и 130 дней

междольковые пространства отечны, увеличена селезенка, у отдельных животных – инфаркты селезенки, жировая дистрофия печени (таблицы 1, 2).

Таблица 1. – Патологоанатомические изменения в легких свиней

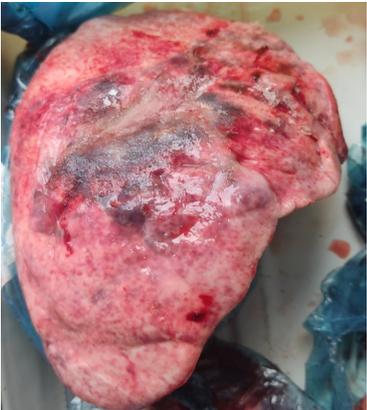
	Описание	Процесс
	<p>Легкие не спавшиеся, форма не изменена. Консистенция тестоватая, цвет серо-розовый, рисунок дольчатого строения нечеткий. Кусочки легких плавают тяжело, полностью погружившись в воду. На поверхности под капсулой имеются множественные очажки размером 3-4 мм темно-красного цвета, четко отграниченные от паренхимы. Кроме того, выявляются обширные подкапсулярные кровоподтеки темно-красного цвета</p>	<p>Выраженный отек легких, кровоизлияния и гематомы в паренхиме. Может быть при вирусных инфекциях (признак сильного кашля)</p>
	<p>Легкие не спавшиеся, форма не изменена. Консистенция передних долей плотная, цвет темно-красный, рисунок дольчатого строения усилен. Кусочки легких тонут в воде. В диафрагмальных долях имеются множественные инкапсулированные очаги размером 1-1,5 см, заполненные серо-желтым сметанообразным содержимым</p>	<p>Гнойно-катаральная, абсцедирующая пневмония</p>
	<p>Каудальные доли легких не спавшиеся, форма не изменена. Цвет темно-красный, консистенция плотная, рисунок дольчатого строения усилен. Кусочки долей легких тонут в воде</p>	<p>Фрагмент диафрагмальной доли легких с признаками катарального воспаления. Может быть признаком многих бактериальных болезней</p>
	<p>Легкие не спавшиеся, форма не изменена. В передних и частично в диафрагмальных долях имеются пораженные дольки темно-красного цвета плотной консистенции. Рисунок долек в них усилен, кусочки тонут в воде. В каудальных долях имеются признаки отека и точечные кровоизлияния</p>	<p>Острая лобулярная катаральная пневмония с локализацией в передних и каудальных долях легких. Отек и точечные кровоизлияния в легких</p>

Таблица 2. – Патологоанатомические изменения в почках и печени свиней

	Описание	Процесс
	<p>Почка увеличена в размере, капсула напряжена, консистенция мягкая, цвет светло-коричневый. Под капсулой имеются множественные уплощенные очажки темно-красного цвета, четко отграниченные от окружающих тканей. Селезенка не увеличена в размере. По ее краям выявляются множественные очаги черно-красного цвета, четко отграниченные, возвышаются над поверхностью органа. На разрезе их периферическая часть темно-красного цвета, центральная – серо-желтого</p>	<p>Смешанные инфаркты в селезенке, зернистая дистрофия почек с точечными подкапсулярными кровоизлияниями</p>
	<p>Селезенка увеличена в размере, края притуплены. Консистенция мягкая. На разрезе цвет темно-красный, рисунок лимфоидных узелков и трабекул стерт, соскоб пульпы тыльной стороной ножа обильный</p>	<p>Септическая селезенка (геморрагический спленит)</p>
		<p>Зернистая дистрофия почки, острая катаральная пневмония, отек легких, смешанные инфаркты в легких</p>

Таблица 3. – Патологоанатомические изменения внутренних органов мертворожденных поросят

	Описание	Процесс
	<p>Легкие спавшиеся, светло-красного цвета, упругой консистенции, рисунок долек нечеткий, кусочки тонут в воде. Отдельные дольки с кровоизлияниями, темно-красного цвета. Миокард красно-коричневого цвета, отечный, рисунок волокнистого строения не заметен</p>	<p>Тотальный ателектаз легких, кровоизлияния. Отек миокарда</p>
		<p>Отек легких</p>
	<p>Легкие спавшиеся, серо-розового цвета, уплотнены, рисунок дольчатого строения усилен. Кусочки легких тонут в воде</p>	<p>Ателектаз, интерстициальная пневмония (начальные стадии)</p>

При постановке ПЦР с ДНК, выделенной из патологического материала с вышеописанной клинической картиной, нами были получены следующие результаты (таблица 4).

Таблица 4. – Сравнительные результаты ПЦР ДНК из патологического материала от свиней с картиной характерной PCVAD

№ п/п	Наименование материала и возраст животных	Результаты	C(t) (пороговый цикл)
1	20 дней	положительно	25,28
2	30 дней	положительно	22,68
3	21-45 дней	положительно	23,17
4	50 дней	положительно	24,09
5	65 дней	положительно	23,46
6	70 дней	положительно	22,69
7	75 дней	положительно	22,80
8	90 дней	положительно	20,64
9	137 дней	положительно	22,83
10	мертворожденный	положительно	21,87
11	семенная жидкость	положительно	22,50
К+			20,56
К-			-

Согласно проведенным ранее исследованиям большинство показателей Ct соответствует 10^{6-7} копий/мл геном-эквивалента, что свидетельствует о наличии инфекционного процесса в организме животного и подтверждает клиническую и патологоанатомическую картину у исследуемых свиней.

Для оценки биологического материала, пригодного для ПЦР диагностики ЦВС-2, нами от двух групп животных отобрана носовая слизь, фекалии и кровь (для работы использовали сыворотку). В каждой группе выделили по 5 животных. Согласно проведенным исследованиям получены следующие результаты (таблица 5).

Таблица 5. – Сравнительные результаты ПЦР различного биологического материала от свиней 90–100 и 120–150 дней

№ п/п	Носовая слизь	C(t) (пороговый цикл)	Фекалии	C(t) (пороговый цикл)	Сыворотка крови	C(t) (пороговый цикл)
свиньи, возраст 90–100 дней						
1	отрицательно	34,39	положительно	27,15	отрицательно	-
2	положительно	29,21	положительно	29,82	отрицательно	-
3	положительно	24,66	положительно	24,60	положительно	29,46
4	положительно	29,16	положительно	22,45	отрицательно	29,36
5	положительно	26,83	положительно	25,37	отрицательно	28,53
свиньи, возраст 120–150 дней						
6	положительно	25,49	положительно	26,50	отрицательно	-
7	положительно	24,99	положительно	29,33	положительно	гемолиз 32,58
8	положительно	30,34	положительно	28,12	положительно	26,75
9	положительно	28,15	положительно	23,25	положительно	31,0
10	положительно	27,77	отрицательно	37,96	положительно	26,30

Нами установлено, что для прижизненной диагностики и оценки ситуации по инфицированности цирковирусом второго типа в хозяйстве подходят все три биологических объекта, однако количество геном-эквивалента в сыворотке крови значительно ниже, чем в носовой слизи и фекалиях. При подсчете среднего арифметического Ct в пробах следует отметить, что в возрасте 90–100 дней количество вирусного генома выше, чем в более старшем возрасте, в фекалиях (25,87 и 29,32 соответственно), тогда как в носовой слизи среднее арифметическое Ct отличается незначительно (28,85 и 27,35 соответственно). В крови прослеживается похожая тенденция (29,11 и 29,15). Следует отметить, что и фекалии, и носовая слизь пригодны для мониторинговых исследований. А при рассмотрении возможности использования биологического материала для диагностики КРЗС (комплекса респираторных заболеваний свиней) носовая слизь имеет преимущества, что связано с тропизмом основных возбудителей.

Кроме того, проведены исследования патологического материала от свиней

разного возраста. Нами установлено, что наибольшее количество вирусного генома обнаружено в патологическом материале от свиней группы 90 дней (Ct 20,64). Однако количество генома и в остальных группах животных свидетельствует о неблагополучии по данной инфекции.

Изучение 14 проб спермы и 2 проб тестикулярной жидкости показало (таблица 6), что в 7 пробах спермы (50 %) и 1 пробе тестикулярной жидкости обнаружен геном цирковируса второго типа. Согласно калибровочным кривым и сравнительной валидации с количественной тест-системой «Real-Time PCR PCV-2» (Корея) на Ct 23 цикле соответствуют 10^6 копий/мл геном-эквивалента вируса, что достаточно для развития инфекционного процесса. Проведенные исследования указывают на то, что в сперме 1 хряка (№ 4) количество геном-эквивалента соответствовало наличию инфекционного процесса в организме (21,43 соответственно), у остальных животных результаты ПЦР свидетельствовали о носительстве данного патогена.

Таблица 6. – Сравнительные результаты ПЦР спермы и тестикулярной жидкости от хряков

№ п/п	Результаты	C(t) (пороговый цикл)
1	положительно	35,03
2	отрицательно	-
3	отрицательно	-
4	положительно	21,23
5	положительно	35,95
6	положительно	33,40
7	положительно	31,42
8	отрицательно	-
9	отрицательно	-
10	отрицательно	-
11	отрицательно	-
12	отрицательно	37,92
13	положительно	33,29
14	положительно	33,86
15	положительно	33,09
16	отрицательно	39,28
К+		10,56
К-		-

Следует предположить, что передача цирковируса второго типа возможна половым путем, и необходимо проводить дополнительные исследования на наличие генома спермы хряков-производителей. Соответственно, сперма также является биологическим объектом для проведения ПЦР-исследования с целью выявления возбудителя цирковируса второго типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цирковирус второго типа выделялся из патологического материала от свиней

всех возрастов, что свидетельствует о циркуляции вируса в хозяйстве.

Изученная нами сложная патолого-анатомическая картина свидетельствует о наличии смешанной инфекции и других патогенов и требует более детального изучения в дальнейшем.

ЦВС-2 выделялся из всех видов биологического материала, используемых в нашем исследовании. Наиболее технологичны и менее инвазивны для прижизненной диагностики ЦВИ второго типа носовая слизь и фекалии.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Красникова, Е. Л. Использование ПЦР реал-тайм в мониторинге патологии свиней, вызванной цирковирусом второго типа / Е. Л. Красникова, А. Л. Садовский // Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария. – 2022. – № 2. – С. 30–34.
2. Brockmeier, S. L. Polymicrobial diseases / S. L. Brockmeier, P. G. Halbur, E. L. Thacker // ASM Press, Washington DC. – 2002. – С. 231–258.
3. Harms, P. A. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection / P. A. Harms, P. G. Halbur, S. D. Sorden // Journal of Swine Health and Production. – 2002. – Т. 10. – №. 1. – С. 27–30.
4. Chae, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases / C. Chae // The Veterinary Journal. – 2005. – Т. 169. – № 3. – С. 326–336.
5. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease / J. Gillespie [et al.] // Journal of veterinary internal medicine. – 2009. – Т. 23. – № 6. – С. 1151–1163.

ВАКЦИНА ИНАКТИВИРОВАННАЯ ЭМУЛЬГИРОВАННАЯ С АДГЕЗИВНЫМИ АНТИГЕНАМИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОЛИБАКТЕРИОЗА ПОРОСЯТ



**ДЛЯ ИММУНИЗАЦИИ
ГЛУБОКО СУПОРОСНЫХ
СВИНОМАТОК И,
ПРИ ПОКАЗАНИЯХ,
ПОРОСЯТ-СОСУНОВ
С 20–30-ДНЕВНОГО
ВОЗРАСТА**

**Штаммы бактерий
ESCHERICHIA COLI
с адгезивными антигенами
F41, K88 (F4), K99 (F5),
987 P (F6), LT-токсоид**

**Защитный титр
колостральных антител
сохраняется у новорожденных
поросят до 30-дневного возраста**



WWW.BIEVM.BY

УДК 619:617.636.087.72:636.2

Стрельчя И.И., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Полоз С.В., кандидат ветеринарных наук, доцент²
Андруевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесского», г. Минск, Республика Беларусь

²РУП «Институт рыбного хозяйства» РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству», г. Минск, Республика Беларусь

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ СЫВОРОТОК КРОВИ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ CV-1

Резюме

Изучена эффективность применения сыворотки крови производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесского», полученной от крупного рогатого скота, для культивирования перевиваемой клеточной линии CV-1 с целью производства вакцин и ветеринарных иммунобиологических препаратов. Полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что для перевиваемой клеточной линии CV-1 применение сыворотки крови крупного рогатого скота производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесского» по своим иммунобиологическим свойствам и качественным характеристикам не уступает эмбриональной сыворотке телят производства SIGMA.

Ключевые слова: сыворотка, культура клеток, пролиферация, фибробласты.

Summary

The effectiveness of using serum produced by the RUP «Institute of Experimental Veterinary Science of S.N. Vysheslesky», obtained from cattle, for culturing the transplanted cell line CV-1 for the purpose of producing vaccines and veterinary immunobiological preparations, was studied. The received results of researches demonstrate that for the intertwined cellular CV-1 line the use of serum of blood of cattle produced by the RUP «Institute of Experimental Veterinary Science of S.N. Vysheslesky» on the immunobiological properties and quality characteristics doesn't concede to embryonic serum of calfs of production SIGMA.

Keywords: serum, cell culture, proliferation, fibroblasts.

Поступила в редакцию 26.10.2023 г.

ВВЕДЕНИЕ

В решении современных теоретических и практических проблем ветеринарной биотехнологии значительное место занимает культивирование клеток животных и человека [8, 4]. Современная ветеринарная вирусология и вся ветеринарная биопромышленность невозможна без широкого использования культур клеток *in vitro*. В связи с этим остается актуальной проблема разработки условий наиболее экономически эффективного их выращивания.

Важнейшей составной частью питательных сред, содержащей факторы роста клеточных популяций, является сыворотка крови животных. Сыворотка является необходимым компонентом большинства питательных сред для культивирования клеток. Она играет роль предохранительного физиологического буфера, участвует в процессах адгезии, распластывания и миграции клеток, является источником питательных

веществ и продолжает оставаться незаменимым компонентом ростовой среды для большинства клеточных и органных культур [5, 11, 13]. Сыворотка крови служит источником защитных веществ, предохраняющих клетки от повреждений.

В состав сыворотки входят факторы роста, которые способствуют клеточной пролиферации, а также факторы адгезии и вещества, обладающие антитрипсиновой активностью, способствующие прикреплению клеток к субстрату. Сыворотка является источником минеральных веществ, липидов и гормонов. Эмбриональная телячья сыворотка по сравнению с сывороткой крупного рогатого скота (КРС) содержит повышенное количество эстрадиола, эстриола и прогестерона.

Значение сыворотки крови для роста клеток, стимулирующих их пролиферацию, являются предметом интереса многих исследователей [1, 2, 7, 10, 12].

Чаще всего в культуральных средах используют эмбриональную сыворотку телят или сыворотку крупного рогатого скота. Из литературных источников [2, 5] следует, что лучшей является эмбриональная телячья сыворотка, но ее широкое использование лимитировано прежде всего дефицитом и высокой стоимостью. Для уменьшения применения дорогостоящей эмбриональной сыворотки при культивировании производственных клеточных линий прибегают к замене ее сывороткой крови взрослого крупного рогатого скота [3, 4, 13], которая является менее дорогостоящей и дефицитной. Поиск более дешевых и доступных ростостимулирующих компонентов перспективен.

Сыворотка играет роль предохранительного физиологического буфера, участвует в процессах адгезии, пролиферации и миграции клеток, является источником питательных веществ [9, 13].

Высокомолекулярные фракции сыворотки служат источником защитных веществ, предохраняющих клетки от повреждений. Сыворотка выполняет ряд других важных функций: стимулирует усвоение регуляторных молекул, воздействуя на клеточную мембрану, участвует в регуляции плотности культуры и контактной ингибиции, стимулирует внутриклеточное содержание критически необходимых для роста клеток питательных компонентов [5].

Одним из важнейших факторов в культивировании клеток остается выбор, состояние и концентрация добавляемой в культуральную среду сыворотки, которая обеспечит длительное культивирование и высокую пролиферативную активность различных клеток животных.

Для культивирования клеток различного происхождения чаще используется эмбриональная сыворотка телят. По сравнению с сыворотками особей различных возрастов она содержит повышенное количество эстрадиола, эстриола и прогестерона, хотя содержание их варьирует в широких пределах от партии к партии. Добавление сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, новорожденных телят при выращивании различных клеток остается неизбежной необходимостью [11]. В связи с этим многие исследователи получают сыворотку из крови взрослого клинически здорового крупного рогатого скота на убойных пунк-

тах, благополучных по инфекционным и паразитарным заболеваниям [11], которая значительно дешевле.

Получение сыворотки крови от взрослых животных и ее переработка проводится в соответствии с регламентом, изложенным в нормативно-технических документах.

Вновь приготовленные серии сыворотки крупного рогатого скота контролируют на отсутствие загрязнения вирусами и бактериями. Для стерилизации сыворотки предложена специальная ультрафиолетовая обработка, которая не ухудшает ее ростовые свойства.

В связи с тем, что одним из основных назначений сыворотки является способствование росту и размножению клеток, необходимым параметром при контроле ее качества является проверка биологических свойств по ростовым свойствам, физико-химический контроль и показатель цитотоксичности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены в отделе культур клеток и питательных сред РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Все работы проводились в боксовом помещении, непосредственно в ламинарном шкафу, с соблюдением всех правил асептики и антисептики, с использованием стерильных материалов и реактивов.

Объектом исследований являлась готовая эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) производства SIGMA и сыворотка крупного рогатого скота, подвергнутая облучению гамма-лучами. Радиационная обработка проводилась на гамма-установке УГУ-420 с использованием закрытых радионуклидных источников гамма-излучения кобальт-60. После стерилизации контрольные флаконы сыворотки выдерживали в термостате в течение 7 дней и проводили контроль сыворотки на отсутствие контаминации микоплазмами, бактериями, грибами путем посева на селективные питательные среды МПА, МПБ, агар Сабуро. Физико-химические показатели, цитотоксичность, ростовые свойства проверяли в соответствии с нормативно-техническими документами ТУ ВУ 600049853.102-2017, а также [6, 14].

Для сравнительной характеристики действия этих сывороток использовали перевиваемую клеточную линию CV-1 (почка обезьяны). В работу брали 5 культуральных флаконов объемом 25 см² с добавлением в ростовую питательную среду ДМЕМ 10 % сыворотки крови КРС и 5 культуральных флаконов объемом 25 см² с ростовой питательной средой ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки телят производства SIGMA. Инкубировали в термостате при температуре (+37,7±1) °С. Ежедневно вели наблюдение за качеством сформирования монослоя визуальным и с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 в фазовом контрасте (объектив ×10) оценивали морфологию клеток. Для определения ростостимулирующей активности сыворотки было проведено 5 последовательных пассажей. Пересев клеток проводили каждые пять суток после формирования 100%-ной конfluenceности монослоя.

Об адгезивных свойствах исследуемой культуры судили по двум показателям: эффективности прикрепления и скорости распластывания клеток. Эффективность прикрепления определяли путем подсчета неприкрепившихся клеток через 24 ч после посева, скорость распластывания культуры – путем подсчета клеток, находящихся в разной степени распластности через 1,5; 3,5 и 24 ч после посева. В указанные сроки клеточный монослой фиксировали и окрашивали гематоксилином. Степень распластывания оценивали визуальным в световом микроскопе по площади, занимаемой клеткой данного субстрата, и ее форме.

Для дезагрегации клеток использовали растворы Версена и трипсина в соотношении 1:4. Удаляли ростовую питательную среду из культуральных флаконов, вносили раствор Версен-трипсина, инкубировали в термостате при температуре (+37,7±1) °С до полного отслоения клеток от стекла. В суспензию клеток вносили ростовую среду, ресуспензировали клетки пипетированием. Для определения жизнеспособности клеток и с целью их подсчета отбирали клеточную суспензию в пенициллиновый флакон, добавляли к ней равный объем 0,1 %-ного раствора трипанового синего, который окрашивает только мертвые клетки (живые остаются неокрашенными). В приготовленной суспензии определяли концентрацию живых клеток путем их под-

счета в камере Горяева. Предварительно необходимо подготовить гемоцитометр, протерев покровное стекло камеры бумажной салфеткой, смоченной в 70%-ном этиловом спирте с целью обезжиривания стекла. Покровное стекло необходимо плотно притереть к предметному стеклу до появления колец Ньютона так, чтобы прикрыть заштрихованные области. Количество живых клеток из расчета на 1,0 см³ среды питательной определяли по формуле 1:

$$x = \frac{A \times 1000 \times 2}{0,9}, \quad (1)$$

где x – количество клеток;

A – среднее арифметическое значение количества клеток трех проб;

1000 – коэффициент пересчета, см³;

2 – коэффициент разведения клеточной культуры красителем;

0,9 – объем счетной камеры Горяева, мм³.

Индекс пролиферации клеток определяли по формуле 2:

$$ИП = \frac{x}{y}, \quad (2)$$

где ИП – индекс пролиферации;

x – количество клеток из расчета на 1,0 см³ среды питательной (или на 1,0 см² рабочей поверхности матраса) после культивирования культуры клеток;

y – количество засеянных клеток из расчета на 1,0 см³ среды питательной (или на 1,0 см² рабочей поверхности матраса).

Сравнительное изучение клеток проводили на одной стадии роста и одинаковой клеточной плотности, на одной и той же среде и субстрате.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При культивировании клеток CV-1 было установлено, что вскоре наблюдаемое уменьшение популяции клеток легко может быть устранено, если для последующего субкультивирования использовать клетки в период логарифмического роста с добавлением 10%-ной сыворотки крупного рогатого скота. Если при первичном культивировании клеток при посеве 5×10^4 клеток/мл логарифмическая фаза роста наступала после лаг-периода, длящегося в течение 24 ч, то клетки, перенесенные из такой культуры в любой период лог-фазы (концентрация не ниже 5×10^4 клеток/мл), сразу

начинали размножаться в субкультуре с логарифмической скоростью. Культура клеток могла длительно поддерживаться в логарифмической фазе роста при периодическом замещении культуральной среды с добавлением сыворотки крупного рогатого скота, чтобы поддерживать концентрацию клеток в пределах 10^5 – 10^6 . Клетки сохраняли стабильность всех биологических свойств в течение всего срока культивирования (количества пассажей). Культура клеток представляла собой гомогенную популяцию фибробластоподобных веретеновидных клеток мультиполярной формы с четкими границами. Ядра овальные, удлинённые, ядрышки крупные, от 1 до 5 штук в ядре. Цитоплазма имела характерную мелкую зернистость. Ядро содержало 1–4 ядрышка. Клетки прозрачные, расположенные параллельными группами в различных направлениях. Хроматин распределен в ядре в виде мелкой зернистости. Отсутствовала грануляция и вакуолизация вокруг ядра. Среднее время генерации (10^5 клеток/мл) в логарифмической фазе роста равнялось 70–80 ч. При пересеве монослой образовывался на 2-3-и сутки роста. На 5-6-е сутки культивирования образовывался монослой клеток с конфлюэнтностью 100 %. Используя стандартные условия культивирования клеток, удавалось поддерживать культуру клеток в состоянии активного размножения на протяжении многих пассажей.

При культивировании клеток с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки клетки также сохраняли морфологическую

стабильность всех биологических свойств в течение всего срока культивирования, показывали высокую пролиферативную активность, на 5-6-е сутки образовывали 100%-ный конфлюэнтный монослой. Клетки обладали высокой адгезивной способностью к субстрату в течении 24–60 ч.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований нами установлено, что клетки данной линии в логарифмической фазе роста с добавлением сыворотки крупного рогатого скота и эмбриональной телячьей сыворотки размножаются с постоянной скоростью при одинаковых условиях выращивания. В ходе проведенных последующих пассажей выявлено, что замещение эмбриональной сыворотки телят производства SIGMA на сыворотку крупного рогатого скота производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» при культивировании перевиваемой клеточной линии CV-1 приводит к результатам, не уступающим по пролиферативной активности и ростообеспечивающей активности. Ее применение показывает высокий индекс пролиферации и не вызывает в тестируемых клетках дегенеративных изменений.

Замещение эмбриональной телячьей сыворотки производства SIGMA на сыворотку крупного рогатого скота позволит значительно удешевить производство ветеринарных иммунобиологических препаратов.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Вечканов, Е. М. *Клеточная инженерия: учеб. пособие* / Е. М. Вечканов, И. А. Сорокина. – Ростов н/Д., 2012. – 136 с.
2. Гурьянов, Н. И. *Качество сыворотки крови крупного рогатого скота* / Н. И. Гурьянов // *Ветеринария*. – 1997. – № 10. – С. 21–22.
3. Гурьянов, Н. И. *Усовершенствование технологий получения сывороток крови кур, бычков, эмбрионов коров и изучение их свойств при культивировании клеток и вирусов* : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Н. И. Гурьянов. – Казань, 1992. – 19 с.
4. Дьяконов, Л. П. *Животная клетка в культуре: методы и применение в биотехнологии* / Л. П. Дьяконов, В. И. Ситьков ; под ред. проф. Дьяконова Л. П., проф. Ситькова В.И. – М. : Компания Спутник+, 2000. – 400 с.
5. Дьяконов, Л. П. *Культуры клеток животных: современные аспекты биотехнологии и взаимодействие клеток с инфекционными патогенами* / Л. П. Дьяконов // *Цитология*. – 1994. – Т. 36. – № 6. – С. 503–504.
6. Колокольцева, Т. Д. *Культуры клеток человека и животных: выделение, культивирование, криоконсервация и контроль* / Т. Д. Колокольцова, И. Н. Сабурова, А. А. Кубатиев // *Патогенез*. – 2015. – Т. 13. – № 2. – С. 50–65.
7. Костина, Г. А. *Сыворотка крови, обработанная полиэтиленгликолем, и ее использование для культивирования клеток* / Г. А. Костина, И. Ф. Радаева // *Биотехнология*. – 2001. – № 6. – С. 31–36.

8. Методы клеточной биологии, используемые в цитокинетике : учеб. пособие / И. Б. Алиева [и др.]. – М., 2010. – 132 с.
9. Опыт создания банка авторских линий перевиваемых клеток и их применение в вирусологической практике / Л. Л. Миронова [и др.] // Биотехнология. – 2000. – № 6. – С. 41–46.
10. Рянский, А. Л. Влияние комбинации сывороток крови различных видов животных на пролиферативную активность культур клеток и репродукцию вирусов / А. Л. Рянский, Н. И. Гурьянов, И. М. Ганиев // Ветеринарная патология. – 2007. – № 1. – С. 181–184.
11. Сергеев, В. А. Вирусы и вирусные вакцины / В. А. Сергеев, Е. А. Непоклонов, Т. И. Алипер. – М. : Библионика, 2007. – 524 с.
12. Фадеев, Ф. А. Возможности использования технологии автоматизированного культивирования при получении клеточных линий для терапевтического применения // Ф. А. Фадеев, Д. В. Луговец, М. В. Улитко // Клеточные технологии – практическому здравоохранению: материалы IV науч.-практ. конф. – Екатеринбург : Вестник уральской медицинской академической науки. – 2015. – С. 57–62.
13. Фреши, Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р. Я. Фреши ; пер. 5-го англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 691 с.
14. Хапчаев, Ю. Х. Разработка методов получения и культивирования первичных и перевиваемых культур клеток животных для производства вирусных вакцин : автореф. дисс. ... д-ра. биол. наук : 03.00.06. / Ю. Х. Хапчаев. – М., 2003. – 47 с.

УДК 619:615.37:612.112

Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор¹
Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент²
Станкуть А.Э., ветврач-исследователь²

¹УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

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

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НАНО- И КОЛЛОИДНЫХ ЧАСТИЦ СЕРЕБРА ПРИ РЕСПИРАТОРНЫХ БОЛЕЗНЯХ ТЕЛЯТ

Резюме

Цель исследований – изучение лечебно-профилактической эффективности комплексного препарата на основе нано- и коллоидных частиц серебра «Наноарговир» для профилактики и терапии респираторных инфекций телят. Установлено, что данный препарат имеет 85–91,7%-ную профилактическую и 88,4–92%-ную лечебную эффективность для телят.

Ключевые слова: наночастицы, коллоидное серебро, пневмоэнтериты, лечебная эффективность, профилактическая эффективность.

Summary

The purpose of the research is to study the therapeutic and prophylactic effectiveness of a complex drug based on nano- and colloidal silver particles «Nanoargovir» for the prevention and treatment of respiratory infections in calves. It was established that this preparation has 85-91.7% preventive and 88.4-92% therapeutic effectiveness for calves.

Keywords: nanoparticles, colloidal silver, pneumoenteritis, therapeutic effectiveness, preventive effectiveness.

Поступила в редакцию 16.11.2023 г.

ВВЕДЕНИЕ

За последнее десятилетие в научно-технических кругах практически всех развитых стран мира наноматериалы и нанотехнологии рассматриваются как факторы, обладающие огромным потенциалом для дальнейшего развития науки и техники. В то же время широкомасштабному их внед-

рению способствует открытие уникальных свойств наночастиц металлов и воздействие их на качество среды обитания человека, сельскохозяйственной продукции, животный и растительный мир. Это связано с особенностью наночастиц и наноматериалов, так как они легче вступают в химические превращения, чем более крупные

объекты того же состава, поэтому они способны образовывать комплексные соединения с неизвестными ранее свойствами. Наночастицы благодаря своим малым размерам легко проникают в организм человека и животных через защитные барьеры (эпителий, слизистые оболочки и т.д.), органы дыхания и желудочно-кишечный тракт [5, 6]. Проведенные исследования биологической активности наночастиц металлов на экспериментальных животных позволили установить, что нанокристаллическое железо и цинк в биотических дозах ускоряют рост животных и птиц, усиливают регенерацию печени после частичной гепатэктомии, ускоряют заживление тканей. В то же время, как показали исследования, биологическая активность наночастиц металлов связана с их физико-химическими свойствами, что позволит в будущем, изменяя свойства наночастиц, достигать высокой биологической активности при минимальных побочных эффектах.

Объектами нанотехнологий также являются макроскопические объекты, атомарная структура которых может контролироваться посредством манипуляций отдельными атомами. Нанотехнологии качественно отличаются от дисциплин традиционной направленности, поскольку макроскопические методы работ в рассматриваемом масштабе теряют актуальность, а малоразмерные показатели становятся на первое место [4, 5, 6, 9, 11].

Таким образом, нанотехнологии – термин, означающий междисциплинарную область фундаментальной и прикладной науки и техники, имеющую дело с совокупностью теоретического обоснования, практических методов исследования, анализа и синтеза, а также методов производства и применения продуктов с заданной атомарной структурой путём контролируемого манипулирования отдельными атомами и молекулами.

Известно, что физические свойства многих веществ зависят от размеров образца, а наночастицы веществ часто обладают свойствами, которых вообще нет у образцов этих веществ, имеющих обычные размеры. К примеру, серебро не участвует в большинстве химических реакций [4, 5, 6].

Серебро как микроэлемент в организме животных и человека депонируется

преимущественно в клетках мозга, железах внутренней секреции, печени, почках, костях скелета [1, 14, 15].

Высокая биологическая активность серебра в организме связана с участием в синтезе ферментов и гормонов. В зависимости от концентрации в водных растворах ионы Ag^+ могут как стимулировать, так и ингибировать активность ферментов. Под их влиянием почти в два раза усиливается интенсивность окислительного фосфорилирования в митохондриях головного мозга, увеличивается содержание нуклеиновых кислот, что улучшает снабжение клеток головного мозга кислородом.

При изучении действия препаратов коллоидного серебра на организм человека отмечено их стимулирующее воздействие на функции кроветворения: в крови исчезают молодые формы нейтрофилов, несколько увеличивается количество лимфоцитов и моноцитов, эритроцитов и гемоглобина при замедлении скорости оседания эритроцитов [3, 8, 14, 16].

В последние годы в научной литературе появились сведения об иммуномодулирующих свойствах серебра. Установлено, что в зависимости от концентрации серебро может стимулировать или подавлять фагоцитоз. Под влиянием серебра повышается количество иммуноглобулинов классов А, М, G, увеличивается содержание Т-лимфоцитов.

Таким образом, совокупность изложенных факторов свидетельствует о том, что наноматериалы могут обладать совершенно иными физико-химическими свойствами и биологическим (в том числе токсическим) действием, чем вещества в обычном физико-химическом состоянии, а поэтому они во всех случаях должны быть отнесены к новым видам материалов и продукции, характеристика потенциально-го риска которых для здоровья человека и состояния среды обитания во всех случаях является обязательной.

Наночастицы серебра, как и другие наночастицы, характеризуются уникальными свойствами, связанными с высоким отношением их поверхности к объему, что определяет большую эффективность их действия по сравнению с макрочастицами. Наночастицы серебра, обладая широким спектром высокой антимикробной актив-

ности, во многом лишены недостатков, связанных с проблемой резистентности к ним патогенных микроорганизмов. Чувствительность разных патогенных и непатогенных организмов к серебру неодинакова. Патогенная микробиота намного более чувствительна к ионам серебра, чем непатогенная. Поэтому серебро действует избирательно, в большей степени уничтожая вредные микроорганизмы [2, 7, 10, 12, 17, 18].

Наночастицы серебра проявляют широкий спектр действия не только в отношении патогенных бактерий, подавляя их рост, но и в отношении вирусов и грибов. Существует несколько теорий механизма действия коллоидного серебра на микробные клетки. Наиболее распространенной является адсорбционная теория, согласно которой клетка теряет жизнеспособность в результате взаимодействия электростатических сил, возникающих между клетками бактерий, имеющих отрицательный заряд, и положительно заряженными ионами серебра при адсорбции последних бактериальной клеткой, то есть серебро взаимодействует с пептидогликанами, блокируя их способность передавать кислород внутрь клетки бактерии, что приводит к «удушью» микроорганизма и его гибели. При этом необходимо отметить, что действие серебра специфично не по инфекции (как у β -лактамовых антибиотиков), а по клеточной структуре. Любая клетка без химически устойчивой стенки (такое клеточное строение имеют бактерии и другие организмы без клеточной стенки, например внеклеточные вирусы) подвержена воздействию серебра. Поскольку клетки млекопитающих имеют мембрану совершенно другого типа (не содержащую пептидогликанов), серебро никаким образом на них не действует [3, 7, 10, 12, 17, 18].

Согласно второй теории, механизм действия серебра на клетку заключается в физико-химических процессах: окисления протоплазмы бактерий и ее разрушения кислородом, растворенным в воде, причем серебро играет роль катализатора. Имеются данные, свидетельствующие об образовании комплексов нуклеиновых кислот с тяжелыми металлами, вследствие чего нарушается стабильность ДНК и, соответственно, жизнеспособность бактерий. Высокой реактивной способностью наноча-

стиц серебра объясняют тот факт, что они обладают сильным бактерицидным действием [1, 8, 13].

В связи с вышеизложенным представляется вполне обоснованным использование наночастиц биоэлементов для активизации иммунных и обменных процессов организма при инфекционных заболеваниях животных.

В рамках Государственной программы «Ветпрепараты» разработан препарат на основе нано- и коллоидных частиц серебра «Наноарговир», обладающий противовирусными, антибактериальными и иммуностимулирующими свойствами.

Цель настоящих исследований – изучение лечебно-профилактической эффективности комплексного препарата на основе нано- и коллоидных частиц серебра «Наноарговир» для профилактики и терапии респираторных инфекций телят.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служили нано- и коллоидные частицы серебра, полученные в ГНУ «Институт физики твердого тела и полупроводников» ННЦ НАН Беларуси по материаловедению. Оптимальный размер частиц был выбран в диапазоне 5–50 нм. Суспензия наночастиц была устойчива по отношению к образованию конгломератов и седиментации (оседанию) путем добавления поверхностно активных веществ и водорастворимых полимеров. Также использовалась дисперсионная среда, совместимая с физиологическими жидкостями организма животного.

В основу метода получения коллоидного раствора наночастиц серебра были положены реакции осаждения серебра из нитрата, стабилизация полученных металлических частиц различными добавками. Управление размерами частиц достигалось варьированием концентрации восстановителя, стабилизирующих добавок, а также добавок, влияющих на вязкость раствора. Полученные растворы хранятся без заметной седиментации в течение 2 суток. Увеличить срок хранения до практически неограниченного времени можно, охладив раствор до температуры ниже 3 °С [6].

Изучение лечебной эффективности препарата на основе наночастиц серебра «Наноарговир» проводились на здоровых

телятах и телятах с признаками поражения органов дыхания в ОАО «Возрождение» и СПК «Агротруд» Витебского района Витебской области. Для этого в каждом хозяйстве были сформированы по принципу аналогов по 2 группы телят (20–40 голов) в возрасте от 10 дней до 2 месяцев. Больным телятам опытной группы (ОГ) «Наноарговир» вводился внутримышечно в дозе 3 мл один раз в 3 дня от 3 до 5 раз до выздоровления. Препарат применялся в комплексе с симптоматическими и антибактериальными средствами. Телята контрольной группы (КГ) подвергнуты лечению по схеме, принятой в хозяйстве.

Изучение профилактической эффективности препарата на основе нано- и коллоидных частиц серебра «Наноарговир» проводились в РСКУП «Волковыское» Волковысского района Гродненской области, ОАО «Будславское» Мядельского района Минской области, СХФ «Ханчицы» ОАО ГТФ «Неман» Свислочского района Гродненской области. Для этого в каждом хозяйстве были сформированы по принципу аналогов по 2 группы телят (20–29 голов)

в возрасте от 15 дней до 3 месяцев. Здоровым телятам ОГ вводили препарат «Наноарговир» внутримышечно в дозе 5 мл один раз в день в течение 2–3 дней. Телята КГ подвергались профилактическим обработкам по схемам, принятым в хозяйствах.

Учет эффективности применяемого препарата осуществлялся по количеству больных или выздоровевших телят, длительности болезни, приросту живой массы у опытных и контрольных животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Введение телятам препарата на основе нано- и коллоидных частиц серебра «Наноарговир» для профилактики и терапии респираторных инфекций не оказывало отрицательного действия на организм: на месте введения болезненности и припухлости не отмечалось, поедаемость кормов не изменялась, повышалась продуктивность.

Результаты исследования лечебной эффективности препарата представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Результаты изучения лечебной эффективности комплексного лечебно-профилактического препарата на основе наночастиц серебра «Наноарговир» в хозяйствах Витебского района

Наименование показателя	Единицы измерения	ОАО «Возрождение»		СПК «Агротруд»	
		ОГ	КГ	ОГ	КГ
Количество животных в группе	гол.	25	15	26	16
Выздоровело	гол.	23	6	23	6
	%	92	40	88,4	37,5
Длительность лечения	дней	3,1	7,4	3,6	7,8
Повторно заболело	гол.	2	9	3	10
	%	8	60	11,6	62,5
Пало и вынуждено убито	гол.	0	0	0	0
	%	0	0	0	0

Полученные результаты свидетельствуют о том, что комплексный лечебно-профилактический препарат на основе нано- и коллоидных частиц серебра «Наноарговир» при лечении пневмоэнтеритов телят

имеет 88,4–92%-ную лечебную эффективность.

В таблице 2 приведены результаты изучения профилактической эффективности препарата «Наноарговир».

Таблица 2. – Результаты изучения профилактической эффективности комплексного лечебно-профилактического препарата «Наноагровир» на основе нано- и коллоидных частиц серебра при респираторных инфекциях

Наименование показателя	Единицы измерения	РСКУП «Волковысское»		СХФ «Ханчицы» ОАО ГТФ «Неман»		ОАО «Будславское»	
		ОГ	КГ	ОГ	КГ	ОГ	КГ
Количество животных в группе	гол.	20	20	24	20	29	29
Заболело	гол.	3	10	2	11	5	18
	%	15	50	8,3	55	17,2	62,1
Выздоровело	гол.	3	10	2	11	4	11
	%	15	50	8,3	55	13,8	37,9
Пало и вынуждено убито	гол.	0	0	0	0	1	7
	%	0	0	0	0	3,5	24,1

Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанный комплексный лечебно-профилактический препарат «Наноагровир» имеет 85–91,7%-ную профилактическую эффективность для телят.

ВЫВОДЫ

Комплексный лечебно-профилактический препарат на основе нано- и коллоидных частиц серебра «Наноагровир» имеет 85–91,7%-ную профилактическую и 88,4–92%-ную лечебную эффективность для телят.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Александрова, А. В. Наночастицы серебра в фармакотерапии / А. В. Александрова // Теоретична і експериментальна медицина. – 2016. – № 1(70). – С. 5–8.
2. Антибактериальная активность коллоидного раствора наночастиц серебра / П. А. Красочко [и др.] // The fifth international scientific-practical conference «Global science and innovations 2019: Central Asia». – Kazakhstan, Astana, 18 march 2019. – Astana, 2019. – С. 45–49.
3. Вольский, Н. Н. Иммуномодулирующие свойства препаратов коллоидного серебра / Н. Н. Вольский, В. И. Селедцов, Г. Ю. Любимов // Коллоидное серебро. Физико-химические свойства. Применение в медицине. Препринт № 1 / Институт катализа им. Бореского Г.К. Сиб. отд. РАН. – Новосибирск. – 1992. – С. 31–52.
4. Кобаяси, Н. Введение в нанотехнологию / Н. Кобаяси. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2005. – 134 с.
5. Красочко, П. А. Противовирусные и антибактериальные свойства наночастиц серебра / П. А. Красочко, А. Э. Станкуть // Наше сельское хозяйство. – 2013. – № 3. – С. 64–67.
6. Мосин, О. В. Коллоидное серебро в бионанотехнологии // О. В. Мосин, И. И. Игнатов // Биотехносфера. – 2012. – № 5-6 (23-24). – С. 49–55.
7. Якубовский, М. В. Нанотехнологии в ветеринарной медицине (сообщение первое) / М. В. Якубовский, И. А. Трус // Наше сельское хозяйство. – 2011. – № 1. – С. 26–30.
8. Определение токсического действия препаратов на основе наночастиц цинка и серебра в системе *in vitro* / П. А. Красочко [и др.] // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы: сб. науч. тр. – Ветеринария. – Т. 20. – Гродно, 2013. – С. 130–139.
9. Противовирусные свойства препарата на основе наночастиц серебра / П. А. Красочко [и др.] // Ветеринарна медицина : міжвід. тематичний навук. зб. – Вип. 97. – Харьків, 2013. – С. 526–527.
10. Стабильность наночастиц серебра при различных температурно-временных режимах / Р. Б. Корочкин [и др.] // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2021. – № 2(15). – С. 114–120.
11. Чекман, И. С. Наносеребро: технологии получения, фармакологические свойства, показания к применению / И. С. Чекман // Препараты и технологии. – 2008. – № 5 (51). – С. 32–40.
12. You, C. The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity // C. You [et al.] // Mol. Biol. Rep. – 2012. – Vol. 39. – № 9. – P. 9193–9201.
13. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / A. R. Shahverdi [et al.] // Nanomedicine. – 2007. – Vol. 3. – P. 168–171.
14. Rai, M. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials / M. Rai, A. Yadav, A. Gade // Bio-technol Adv. – 2009. – Vol. 27. – P. 76–83.

УДК 57.085.23:619:615.37

Стрельчяня И.И., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Полоз С.В., кандидат ветеринарных наук, доцент²
Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹

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

²РУП «Институт рыбного хозяйства» РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», г. Минск, Республика Беларусь

К ВОПРОСУ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЯДК ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Резюме

Показано, что криоконсервация клеток является перспективным методом в научных исследованиях. Важно соблюдение всех условий процесса размораживания культур клеток для их использования при изготовлении иммунобиологических препаратов. Установлено, что присутствие характерных признаков расплывания клеток на субстрат в течение первых трех суток после посева свидетельствует о завершении процесса пролиферации сохранившихся после криоконсервации клеток. Оптимальные результаты восстановления культуры клеток ЯДК в цикле замораживания-оттаивания были достигнуты при использовании ростовой питательной среды Игла: ДМЕМ с добавлением 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота и концентрации клеток $2,2 \times 10^6$. При данных условиях и выбранном нами методе замораживания исследуемая культура клеток ЯДК полностью была восстановлена к 5-му дню культивирования. Испытуемая культура клеток в процессе размораживания по мере увеличения продолжительности культивирования не претерпевала генетических изменений, имела свойственную для данной линии фибробластоподобную морфологию и сохраняла свои биологические свойства.

Ключевые слова: культура клеток, гонады козы, сыворотка крупного рогатого скота, криоконсервация, питательная среда, криопротектор.

Summary

Cell cryopreservation has been shown to be a promising method in scientific research. It is important to comply with all conditions for the process of thawing cell cultures for their use in the manufacture of immunobiological preparations. It has been established that the presence of characteristic signs of cells spreading onto the substrate during the first three days after seeding indicates the completion of the process of proliferation of cells preserved after cryopreservation. Optimal results of restoring a nuclear cell culture in a freeze-thaw cycle were achieved using Eagle growth medium: DMEM with the addition of 10 % cattle blood serum and a cell concentration of $2,2 \times 10^6$. Under these conditions and the freezing method we chose, the studied culture of NDC cells was completely restored by the 5th day of cultivation. The tested cell culture, in the process of thawing as the duration of cultivation increased, did not undergo genetic changes, had a fibroblast-like morphology characteristic of this line, and retained its biological properties.

Keywords: cell culture, gonads of goats, bovine serum, cryoconservation, culture medium, cryoprotector.

Поступила в редакцию 10.11.2023 г.

ВВЕДЕНИЕ

Метод культур клеток является уникальным и вместе с тем широко применяется в настоящее время как в практических, так и в научных исследованиях. Широкое внедрение метода культур клеток в вирусологию для репродукции вирусов или при изготовлении иммунобиологических компонентов диагностических препаратов требует разработки способов длительного сохранения клеточных линий. Актуальной задачей биотехнологии клеточных культур является необходимость создания запасов полноценного экспериментального матери-

ала для научных и клинических исследований в области медицины и ветеринарии [1, 8].

Техника культивирования клеток и тканей постоянно меняется, а многие методические приемы систематически модернизируются, одновременно с этим совершенствуются методы контроля клеточных культур. Диплоидные и перевиваемые линии клеток в лабораторных условиях используются на протяжении длительного времени, однако поддержание их путем непрерывного пассирования представляет определенные трудности.

В настоящее время криоконсервация является способом, который дает возможность обеспечить длительное сохранение клеток животных, в то время как поддержание культур клеток их постоянным пассированием связано с опасностью потери ценных биологических свойств и контаминации посторонними агентами. Поэтому существенным моментом работы с культурой клеток является предупреждение потери клеточных линий путем их консервации [5, 7]. Одной из актуальных задач современной науки является разработка способов длительного консервирования биологических объектов путем их глубокого замораживания. На сохранность криоконсервируемых клеток влияет большое количество факторов, действию которых они подвергаются в процессе замораживания.

Для обеспечения максимальной сохранности клеточных культур разработано различное количество протоколов криоконсервирования, учитывающих индивидуальные особенности различных видов и типов клеток [3, 4]. Однако даже при оптимальных условиях криоконсервирования в сохранившихся клетках обнаруживаются повреждения, которые существенно снижают биологические свойства культур клеток.

Актуальным остается вопрос оптимизации условий криоконсервации и восстановления клеток животных и человека после оттаивания с максимальным процентом жизнеспособности [7]. Оптимальное замораживание клеток для сохранения максимальной жизнеспособности при восстановлении после размораживания зависит от минимизации образования внутриклеточных кристаллов льда, а также предотвращения образования очагов высокой концентрации солей, возникающих при замораживании внутриклеточной воды. Это достигается: 1) путем медленного замораживания, так, чтобы позволить воде покинуть клетку, но не настолько медленно, чтобы спровоцировать рост ледяных кристаллов; 2) путем использования криопротекторов для уменьшения содержания воды; 3) путем хранения клеток при самой низкой температуре; 4) путем быстрого размораживания, чтобы максимально снизить рост кристаллов льда и появление градиента солей, образующегося в процессе таяния остаточного внутриклеточного льда [8].

Способность клеток к выживанию в цикле замораживания-оттаивания зависит не только от влияния защитных сред и температурных режимов при криовоздействиях, но и от подготовки клеток перед замораживанием, концентрации клеток перед замораживанием, а также условий внешней среды после замораживания [2, 6].

Целью нашей работы явилось изучение восстановления перевиваемой линии ЯДК (гонады козы) после замораживания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в отделе культур клеток и питательных сред РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Испытуемая культура клеток сначала была нами криоконсервирована. Культура клеток ЯДК (гонады козы) замораживалась на поздней логарифмической (предконфлюентной) фазе роста, так как именно в этой фазе клетки наиболее жизнеспособны в концентрации $2,5 \times 10^6$. Заморозку проводили на питательной среде Игла: ДМЕМ с добавлением 50 % сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС). В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (10 %), который вводили медленно по каплям в течение 2 мин. Далее клеточную суспензию вносили в специальные стерильные криопробирки, которые затем помещали на 2 ч в холодильник при температуре 4 °С, после чего переносили на 2 ч в морозильную камеру при температуре минус 20 °С, а затем – на 2 ч в низкотемпературный холодильник с температурой минус 86 °С. После этого криопробирки переносили в сосуды Дьюара с жидким азотом с температурой минус 196 °С.

Для оптимального восстановления жизнеспособности клеток необходима высокая скорость их размораживания.

С целью разморозки замороженных образцов перевиваемой культуры клеток ЯДК (гонады козы), криоампулы извлекали и быстро помещали их в теплую водяную баню с температурой +37 °С, постоянно встряхивая 20–60 с, пока клеточная суспензия полностью не оттает. Затем погружали ампулы в 70%-ный этанол при комнатной температуре на 10 с. Далее вскрывали ампулу и переносили ее содержимое в культуральный флакон объемом 175 см³. Для выращивания использовали ростовую

питательную среду Игла: ДМЕМ с добавлением 20%-ной сыворотки КРС и антибиотиков (канамицина сульфата, стрептомицина сульфата и бензилпенициллина натриевой соли) по 100 Ед/мл. Смену среды проводили через 12 и 24 ч после размораживания. В течение следующих 3-4 дней смену среды делали по 20–30 % объема ростовой среды Игла: ДМЕМ, в течение следующих 3-4 дней – до 50–60 %. Свежую ростовую среду непосредственно перед работой прогревали до температуры +37 °С. Посевная концентрация клеток, а также условия культивирования в первые часы в значительной степени определяют оптимальные параметры для процессов пролиферации и максимального накопления клеток.

Известно, что начальным этапом характеристики восстановления криоконсервированных культур является их адгезия к субстрату. Это необходимое условие, которое также отражает функциональное состояние клеток.

Начальным этапом наших исследований восстановления после криоконсервации перевиваемой линии ЯДК было определение начальной адгезии и жизнеспособности клеток.

После размораживания важным этапом явилось определение концентрации сохранившихся клеток, для чего использовали тест с трипановым синим. Живые клетки непроницаемы для данного красителя, мертвые же проницаемы и окрашиваются. Для оценки выхода жизнеспособных клеток используют тест на исключение красителя. Количество живых и мертвых клеток подсчитывают в камере Горяева.

Количество живых клеток из расчета на 1,0 см³ среды питательной определяют по формуле 1:

$$x = \frac{A \times 1000 \times 2}{0,9}, \quad (1)$$

где x – количество клеток;
 A – среднее арифметическое значение количества клеток трех проб;
 1000 – коэффициент пересчета, см³;
 2 – коэффициент разведения клеточной культуры красителем;
 0,9 – объем счетной камеры Горяева, мм³.

Индекс пролиферации клеток определяют по формуле 2:

$$ИП = \frac{x}{y}, \quad (2)$$

где $ИП$ – индекс пролиферации;
 x – количество клеток из расчета на 1,0 см³ среды питательной (или на 1,0 см² рабочей поверхности матраца) после культивирования культуры клеток;

y – количество засеянных клеток из расчета на 1,0 см³ среды питательной (или на 1,0 см² рабочей поверхности матраца).

Сравнительное изучение клеток проводилось на одной стадии роста и одинаковой клеточной плотности, на одной и той же среде, и субстрате.

Контроль микробиологической стерильности клеточной суспензии на отсутствие бактерий, грибов проводили путем посева на селективные питательные среды МПА (мясопептонный агар), МПБ (мясопептонный бульон), тиогликолевая среда. Для этого в стерильных условиях пипеткой в пробирки вносили по 0,5 мл клеточной суспензии и инкубировали при температуре +37 °С для выявления грамположительных и грамотрицательных бактерий. Учет результатов контроля на стерильность проводили путем микроскопических исследований всех посевов через 14 суток после внесения клеточного материала для контроля. Для выявления грибов использовали плотную питательную среду Сабуро. Вносили по 0,2 мл суспензии клеток в пробирки. Инкубировали при температуре 22 °С. Учет результатов контроля на наличие грибов проводили путем макро- и микроскопических исследований через 24 ч. Скорость и качество формирования монослоя определяли на 1-, 2-, 3-, 4-, 5-е сутки визуально и с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100 в фазовом контрасте (объектив ×10).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Первостепенно оценивали физиологическое состояние и рост клеток, их морфофункциональные свойства. На 1-е сутки лаг-фазы, которая длится от 2 до 24 ч, наблюдали прикрепление клеток к субстрату и их начальный рост. При просмотре культуральных флаконов под микроскопом установлено, что конфлюэнтность монослоя составляла 20 % (рисунок 1).

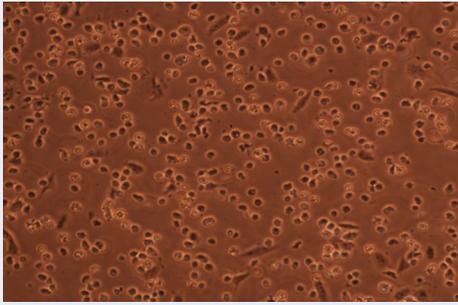


Рисунок 1. – Клеточный монослой перевиваемой культура клеток ЯДК через 12–24 ч культивирования (объектив ×10)

На 2-е сутки степень расплывания монослоя удвоилась, так как это период самого быстрого роста и размножения, когда число клеток возросло во времени по экспоненте. При просмотре культуральных флаконов под микроскопом установлено, что клеточный монослой составил 40 % конфлюэнтности (рисунок 2).

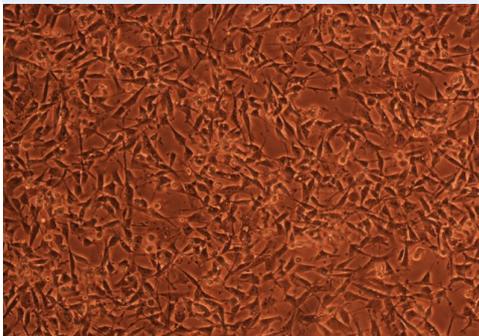


Рисунок 2. – Перевиваемая культура клеток ЯДК на 2-е сутки (объектив ×10)

На 3-и сутки (период стационарной фазы), через 48–72 ч культивирования, клеточный монослой составил 80 % конфлюэнтности (рисунок 3).



Рисунок 3. – Перевиваемая культура клеток ЯДК на 3-и сутки (объектив ×10)

Нами установлено, что продолжительность пребывания культуры в стационарной фазе роста является самостоятельным фактором контроля скорости размножения клеток, действие которого проявляется независимо от плотности клеточной популяции.

При просмотре культуральных флаконов под микроскопом на 4-е и 5-е сутки наблюдали выравнивание клеточного монослоя (рисунки 4 и 5). При этом на 5-е сутки происходило повышение плотности клеточной популяции. Перевиваемая клеточная линия ЯДК имела типичную для данной линии фибробластоподобную морфологию, клетки приобрели выраженную веретенообразную, вытянутую форму с прозрачной цитоплазмой и сохраняли стабильность своих биологических свойств в течение всего срока культивирования.



Рисунок 4. – Клеточный монослой перевиваемой культуры клеток ЯДК на 4-е сутки культивирования (объектив ×10)



Рисунок 5. – Клеточный монослой перевиваемой культуры клеток ЯДК на 5-е сутки культивирования (объектив ×10)

Результаты исследований показали, что на 5-е сутки скорость роста культуры клеток ЯДК (гонады козы) замедлилась и количество клеток в культуре достигло насыщения (конечная плотность клеток). Культивируемые клетки полностью покрыли поверхность культурального флакона, достигнув 100%-ной конfluence.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами установлено, что наличие характерных признаков распластывания клеток на субстрате в течение первых трех суток после посева свидетельствует о завершении процесса пролиферации сохранившихся после криоконсервации клеток. Оптимальные результаты восстановления культуры клеток ЯДК в цикле замораживания-оттаивания были достигнуты при использовании ростовой питательной среды Игла: ДМЕМ с добавлением 20 % сыворотки крови крупного рогатого скота и кон-

центрации клеток $2,5 \times 10^6$. При данных условиях и выбранном нами методе замораживания исследуемая культура клеток ЯДК (гонады козы) полностью была восстановлена к 5-му дню культивирования. Испытуемая культура клеток в процессе размораживания по мере увеличения продолжительности культивирования соответствовала своим паспортным данным (видовая принадлежность донора), по истории происхождения, не претерпевала генетических изменений, имела свойственную для данной линии фибробластоподобную морфологию и сохранила свои биологические свойства.

Таким образом, криоконсервация клеток является перспективным в научных исследованиях методом. Важным является соблюдение всех условий процесса размораживания культур клеток для их использования при изготовлении иммунобиологических препаратов.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Блажевич, О. В. *Культивирование клеток: курс лекций* / О. В. Блажевич. – Минск : БГУ, 2004. – 78 с.
2. Горохова, Н. А. *Криоконсервация культивированных фибробластоподобных клеток шляхом повільного заморожування і вітрифікації : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.19* / Н. А. Горохова. – ИПКиК НАНУ. – 2005. – 26 с.
3. *Криоконсервирование клеточных суспензий : сб. науч. тр. ; под общ. ред. А. А. Цуцаевой.* – К. : Наук. думка, 1983. – 240 с.
4. *Методы культивирования клеток: сб. науч. тр. ; под ред. Г. П. Пинаева.* – Л. : Наука, 1988. – 319 с.
5. Стегній, Б. Т. *Біологічні властивості і проблемі стабілізації культур клітин, які використовуються в біотехнології : автореф. дис. ... д-ра ветеринар. наук : 16.00.03* / Б. Т. Стегній. – ЕКВМУААН, 1995. – 40 с.
6. Фрешни, Р. Я. *Культура животных клеток: практическое руководство* / Р. Я. Фрешни ; пер. 5-го англ. изд. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 691 с.
7. Фуллер, Б. *Криоконсервирование для создания банка клеток: современные концепции на рубеже XXI столетия* / Б. Фуллер, К. Грин, В. И. Грищенко // *Проблемы криобиологии.* – 2003. – № 2. – С. 62–83.
8. Spier, R. *Continuous cell lines as substrates for biologicals: report of a joint meeting of WHO, IABS (cell Culture Committee Subsection), and ESACT* / R. Spier // *Mol. Biother.* – 1988. – V. 1, № 2. – P. 114–115.

наша продукция



УДК 619:616.98:578.822.2:615.37

Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор¹**Красочко П.П.**, доктор биологических наук, доцент¹**Колесникович К.В.**, аспирант¹**Иващенко И.А.**, аспирант¹**Прокулевич В.А.**, доктор биологических наук, профессор²**Зинченко А.И.**, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси³¹УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь²Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь³ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В РАЗРАБОТКЕ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРИИ (ОБЗОР)

Резюме

Анализ литературных источников, имеющих в открытой печати, показал, что генная инженерия является одним из наиболее перспективных направлений в области создания ряда противовирусных препаратов для ветеринарии. Использование технологий генной инженерии в разработке эффективных средств контроля вирусных инфекций животных является актуальным направлением для научного сообщества, так как позволит предотвратить развитие заболеваний в животноводческих комплексах и сохранить здоровье стада.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, рекомбинантные вакцины, вакцинация, инфекционные болезни, генная инженерия.

Summary

An analysis of literary sources available in the open press showed that genetic engineering is one of the most promising areas in the field of creating a number of antiviral drugs for veterinary medicine. The use of genetic engineering technologies in the development of effective means of controlling animal viral infections is a relevant area for the scientific community, as it will prevent the development of diseases in livestock farms and preserve the health of the herd.

Keywords: cattle, recombinant vaccines, vaccination, infectious diseases, genetic engineering.

Поступила в редакцию 02.10.2023 г.

В настоящее время благодаря усилиям ветеринарной службы и результатам научных исследований ученых эпизоотическая ситуация по инфекционным болезням в Республике Беларусь в целом остается стабильной [6]. Во многом этому способствует иммунопрофилактика животных, которая считается наиболее эффективным и экономически выгодным способом решения проблемы, особенно у молодняка [2]. Вакцинация позволяет сократить потребление ветеринарных препаратов, например антибиотиков, что приводит к уменьшению экологических последствий, побочных эффектов и нахождения их остатков в пищевых продуктах животного происхождения [20]. Профилактические ветеринарные вакцины играют важную роль в борьбе со многими инфекционными вирусными заболе-

ваниями, поражающими домашний скот [17]. Эффективность вакцинации обеспечивается безопасностью соответствующих вакцин, их способностью формировать напряженный иммунитет и генерировать продолжительную иммунологическую память. Последние достижения биотехнологии, иммунологии, молекулярной биологии и других дисциплин позволили усовершенствовать технологию разработки вакцин [9]. Новые подходы в разработке биопрепаратов позволили создать рекомбинантные, субъединичные, синтетические пептидные вакцины, вакцины на основе вирусоподобных и «репликонных» частиц, ДНК- и мРНК-вакцины. Это новое поколение иммунных препаратов, которые отличаются от традиционных вакцин большей безопасностью при введении, отсут-

ствием вредного воздействия из-за нежелательных антигенных материалов и репликации в организме, простотой производства и экономичностью. Немаловажным аспектом является и стоимость данных вакцин, которая значительно ниже за счет снижения себестоимости монокомпонентов вакцин, отсутствия издержек транспортировки и налоговых пошлин, возможности быстрого заказа препаратов и квалифицированной сервисной поддержкой от собственного производителя.

Следует отметить, что большинство ветеринарных вакцин – это корпускулярные вакцины, относящиеся к 1-му поколению (1st generation) (инактивированные (убитые) либо живые аттенуированные вакцины), которые требуют содержания адъювантов и многократного введения для индукции достаточного иммунитета и могут иметь потенциальный риск патогенности, при котором живые ослабленные вакцины возвращаются к своей вирулентности [20]. Таким образом, профилактика, основанная на использовании альтернативных вакцин следующих поколений для борьбы с инфек-

ционными заболеваниями животных, остается актуальной темой изучения для научного сообщества и ветеринарных специалистов [18].

Цель исследования – обзор литературных источников, касающихся применения генно-инженерных технологий в борьбе с инфекционными заболеваниями животных.

Вакцины, созданные на основе генной инженерии, – это новое поколение иммунных препаратов, которые позволяют значительно повысить эффективность вакцинации за счет снижения заболеваемости, падежа и выбраковки молодняка, снизить необходимость в проведении ветеринарно-санитарных мероприятий и получить в итоге значительный экономический эффект. Данные вакцины превосходят своей профилактической эффективностью при более низкой стоимости одной дозы и курса иммунизации, что увеличивает их конкурентоспособность.

В таблице 1 отображен перечень вакцин, конструируемых на основе генетической рекомбинации.

Таблица 1. – Классификация вакцин 2-го и 3-го поколения

2-е поколение / 2 nd generation	Рекомбинантные вакцины / Recombinant vaccines
	Субъединичные вакцины / Subunit vaccines
3-е поколение / 3 rd generation	Вакцины на основе вирусоподобных частиц / Virus-like particle-based vaccines
	Синтетические пептидные вакцины / Synthetic peptide vaccines
	Вакцины, содержащие «репликонные» частицы / Vaccines containing «replicon» particles
	ДНК-вакцины / DNA-vaccines
	мРНК-вакцины / mRNA-vaccines

Рекомбинантные векторные вакцины. Данный вид вакцин получают стандартными генно-инженерными методами. В качестве векторов используют живые аттенуированные вирусы, бактерии, дрожжи или эукариотические клетки, в которые встраивают ген, кодирующий образование протективного антигена возбудителя, против которого будет направлена вакцина. В качестве носителя бактериального вектора используют БЦЖ, *Vibrio cholera*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* [4]. В настоящее время *E. coli* широко используется для экспрессии белка в

качестве гетерологичного хозяина помимо ограничения в форме выхода, посттрансляционной модификации и фолдинга экспрессируемых рекомбинантных белков [19]. В ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» проведены исследования по конструированию рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента белка F1 респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота (КРС) путем создания новой плазмиды, несущей ген F1, кодирующий белок F вируса для конструирования и изготовления новых поливалентных вакцин. В качестве носителей вирусных векторов

используют вирусы осповакцины, бакуловирусы, аттенуированные аденовирусы [21]. Возможность встраивать относительно большие фрагменты чужеродной ДНК, легкость манипуляции с последовательностью генов, регуляция уровня экспрессии целевых генов путем подбора промоторов и количества копий обуславливают широкое распространение векторов в экспрессионных системах [15]. Использование векторов является удобным инструментом для получения рекомбинантных белков в ходе выполнения научно-исследовательских работ и рамках промышленного производства [10]. Накопление рекомбинантных белков в микробных клетках превышает их накопление в культуре клеток в 50–100 раз и способствует удешевлению себестоимости изготовления монокомпонентов вирусов при производстве противовирусных вакцин за счет их накопления реакторным способом. С помощью генной инженерии был создан вирус коровьей оспы, экспрессирующий гликопротеин вируса бешенства. Ярким примером рекомбинантной вакцины, созданной с помощью вируса оспы коров, а именно штамма «Копенгаген» в качестве вектора-носителя для внедрения чужеродного гена, является антирабическая живая рекомбинантная вакцина с названием VRG (The vaccinia-rabies glycoprotein). Титр вируса составлял 10^8 БОЕ на дозу [8]. Рядом исследований было установлено, что вакцина стабильна и безопасна для целевых и нецелевых животных, и ее успешно применили в качестве вакцины-приманки в обширных испытаниях в открытом поле [13]. Использование вируса осповакцины в качестве вектора для вакцинации привнесло ряд преимуществ: способность размножаться в клетках животных многих видов, экспрессировать несколько генов, индуцировать гуморальный и клеточный иммунитет, термостабильность, экономичное производство и легкость применения. Выявленные ранее недостатки у вируса осповакцины, связанные с реактогенностью, были устранены с помощью генетических манипуляций. Возможность включения нескольких генов, кодирующих соответствующие иммуногены, дают возможность вакцинировать животных одновременно против нескольких вирусных болезней [14]. Также существует ряд профилактических препара-

тов из рекомбинантного штамма вируса осповакцины, содержащего гены, кодирующие поверхностные гликопротеиды вирусов гриппа, бешенства, болезни Ауески, инфекционного ринотрахеита КРС [5]. В Нидерландах при помощи генной инженерии проводилось ослабление герпесвируса *Suid 1* – возбудителя болезни Ауески свиней. Полученный вакцинный вирус был успешно использован для искоренения болезни в стране [17].

Генная инженерия также позволила разработать мультивалентные и бивалентные вакцины. При этом использовался вирус герпеса индейки (HVT), защищающий цыплят от вируса болезни Марека, вызываемого родственным герпесвирусом *Gallid herpesvirus 2*, от вируса инфекционной бурсальной болезни, вируса болезни Ньюкасла, вируса инфекционного ларинготрахеита и вируса гриппа А [13]. Последний пример мультивалентной вакцины основан на аттенуированном миксомавирусе, который экспрессирует ген капсидного белка калицивирусного вируса геморрагической болезни кроликов, предупреждающей развитие миксоматоза и геморрагической болезни кроликов.

Другая весьма успешная вакцинная платформа основана на вирусе канарской оспы. Примеры коммерчески зарегистрированных вакцин – это вакцины для защиты лошадей от гриппа и вируса Западного Нила, кошек – от бешенства и вируса кошачьего лейкоза, а также собак и хорьков – от вируса собачьей чумы [13].

Субъединичные вакцины представляют особый интерес, поскольку они могут быть использованы для устранения многих осложнений, связанных с применением имеющихся в настоящее время инактивированных либо живых аттенуированных вирусных вакцин [12]. Эти вакцины не содержат живых компонентов патогена, они состоят из одной или нескольких субъединиц белков, которые могут вырабатывать протективный иммунитет против вирусов [11]. Многообещающими являются субъединичные вакцины, полученные как с использованием белков-носителей, так и на основе вирусоподобных частиц [7]. Субъединичные вакцины безопасны, стабильны, не содержат дополнительных балластных белков и нуклеиновых кислот, ко-

торые могут вызвать нежелательные побочные реакции при вакцинации. Могут быть получены с использованием рекомбинантных экспрессирующих хозяев, которые предлагают такие преимущества, как высокий выход, быстрое производство, масштабируемость и сниженные трудозатраты [13]. Примерами данного типа вакцин являются субъединичная вакцина против вируса ньюкаслской болезни (NDV) с использованием гена гемагглютинин-нейраминидазы (HN), субъединичная вакцина против вируса ящура с использованием гена VP-1, субъединичная вакцина против цирковируса свиней типа 2 (PCV-2) на основе открытой рамки считывания-2 (коммерциализированная) и субъединичная вакцина против японского энцефалита на основе белка оболочки ргМ и Е.

Вакцины на основе вирусоподобных частиц. Вирусоподобные частицы – это пустые частицы вирусов, состоящие из основных структурных белков, имитирующие организацию и конформацию нативных вирусов. На сегодняшний день сконструированы вакцины против ВИЧ и коронавируса, которые вызывают образование вируснейтрализующих антител и стимулируют Т-клеточный цитотоксический иммунитет. Создание представленных вакцин является перспективным направлением, так как сохраняется конформационная структура эпитопов, что имеет значение для иммуногенности вакцин; кроме того, отсутствует риск получения вирулентных ревертантов, что имеет место при применении живых аттенуированных вакцин [11].

Синтетические пептидные вакцины – препараты, содержащие синтезированные или выделенные нуклеиновые кислоты или полипептидные последовательности, образующие антигенные детерминанты, распознаваемые нейтрализующими антителами. Основные компоненты таких вакцин – антиген, высокомолекулярный носитель и адъювант [3]. Целесообразность использования адъюванта в вакцинах заключается в повышении иммуногенности вакцин, изменении характера иммунного ответа, снижении количества антигена, необходимого для успешной иммунизации, уменьшении кратности введения вакцины и повышении интенсивности иммунного ответа у животных [1].

ДНК-вакцины созданы на основе технологии, при которой накопление протективного антигена происходит в организме вакцинируемого. При этом ДНК конструкция, которая кодирует синтез протективного антигена, встраивается в вектор, в качестве которого выступают плазмиды, фаги, вирусы, липосомы, эукариотические клетки. Вектор со встроенной ДНК вводится в организм вакцинируемого, в котором происходит наработка протективного антигена. ДНК-вакцины формируют более слабый иммунный ответ по сравнению с цельновирионными, поэтому для повышения их иммуногенности включают иммуностимулирующие нуклеотидные последовательности в конструкцию ДНК, адъюванты либо усовершенствованные методы доставки, в частности с использованием липосом [11]. Технологии на основе рекомбинантной ДНК продвинули стратегию вакцинации дальше, когда антигены экспрессируются в векторных вирусах, и создали аттенуированные вирусы и бактерии [16].

Вакцины на основе мРНК получают путем транскрипции *in vitro* из линейной ДНК-матрицы, в качестве которой выступает плаزمид, с использованием различных РНК-полимераз бактериофагов. При использовании мРНК не возникает трудностей с иммунным ответом на вектор, который часто препятствует повторному введению других вакцин. Также мРНК не может интегрироваться в геном клетки организма. В настоящее время зарегистрированы две вакцины на основе генно-инженерных РНК-вирусов, которые основаны на использовании генно-инженерных вирусов диареи бычьего вируса (BVDV). Первая вакцина содержит два генно-инженерных возбудителя вирусной диареи (ВД), которые защищают крупный рогатый скот от ВД I и II типов. Вторая вакцина содержит аттенуированный вирус ВД, который экспрессирует белок Е2 вируса классической чумы свиней [13].

В настоящее время в Европе зарегистрировано большое количество генно-инженерных вирусных вакцин. К ним также относятся иммуногенные композиции, содержащие так называемые «репликонные» частицы вируса, которые кодируют антиген другого вируса. Частицы реплика-

на фенотипически напоминают вирусы, от которых они произошли, но лишены гена, необходимого для производства частиц-потомков. Эти частицы способны инфицировать клетки-мишени вакцинированного животного, но не могут распространяться из исходного места заражения. Благодаря этой способности частицы репликаона сочетают в себе эффективность живых вакцин и безопасность инактивированных. Примером служат вакцины на основе репликационных частиц, нацеленные на вирус эпидемической диареи свиней и вирус птичьего гриппа [13].

Следует отметить достижения белорусских ученых, которые ведут работу в области терапии вирусных инфекций животных в Белорусском государственном университете. На данный момент проводится конструирование линейки противовирусных препаратов – рекомбинантных видоспецифичных α - и γ -интерферонов для лечения вирусных инфекций животных. В основе сконструированных штаммов-продуцентов *E. coli* лежит внесение плазмиды с генами бычьего, собачьего, птичьего, овечьего, собачьего α - и γ -интерферона в бактерии по методике, разработанной В.А. Прокулевичем и М.И. Потаповичем. В данной организации проводятся исследования по созданию рекомбинантного штамма-продуцента синтетического полиэпитопного белка, а также разработки технологий культивирования, рефолдинга и очистки действующих веществ, что в итоге должно привести к получению очищенных субстанций; подобрать дополнительные противовирусные иммуномодулирующие ингредиенты препарата и создать высокоэффективный лечебно-профилактический видоспе-

цифический ветеринарный препарат для борьбы с различными формами вируса диареи КРС.

Подводя итог, следует отметить, что при современной технологии введения животноводства заболеваемость животных вирусными инфекциями остается весомой проблемой для сельскохозяйственного комплекса страны. Применение антибиотиков для лечения вирусных заболеваний неэффективно, так как они не оказывают воздействия на вирусы, однако поражают патогенную и нормофлору кишечника, что ведет к ряду негативных последствий для организма. Однако благодаря достижениям современной иммунологии, молекулярной биологии, вирусологии и генетики стал доступен переход от фундаментальных исследований к разработке и применению новых видов конкурентоспособной биотехнологической продукции на основе рекомбинантных и оригинальных технологий, обеспечивающих получение товарных форм с повышенной эффективностью и стабильностью, что является импортозамещающей и экспортоориентированной биотехнологической продукцией, востребованной сельскохозяйственной отраслью экономики страны. Каждая группа рассмотренных препаратов имеет свои преимущества по сравнению с общепринятыми средствами и способна вызвать широкий интерес в научных кругах.

Приведенные в настоящем обзоре данные свидетельствуют о перспективности использования генно-инженерных технологий в повышении эффективности методов борьбы с инфекционными болезнями животных.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Авдеева, Ж. И. Вакцины с адьювантами. Доклинические исследования / Ж. И. Авдеева, Н. А. Алпатова, В. П. Бондарев // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2015. – № 1. – С. 15–20.
2. Алпатова, Н. А. Иммунный ответ при иммунизации противовирусными вакцинами / Н. А. Алпатова, Ж. И. Авдеева, Л. А. Гайдерова // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2020. – № 20(1). – С. 21–29. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-21-29>.
3. Барышникова, М. А. Оценка противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов для создания модели противомеланомной вакцины / М. А. Барышникова, А. А. Рудакова, З. С. Соколова // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2019. – № 18(4). – С. 76–81. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2019-18-4-76-81>.
4. Беликова, Ю. А. Современные вакцины и коронавирусные инфекции / Ю. А. Беликова, Ю. В. Самсонов, Е. В. Абакушина // *Research'n Practical Medicine Journal*. – 2020. – № 7(4). – С. 135–154. <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2020-7-4-11>.

5. Генно-инженерные вакцины [Электронный ресурс] / РГАУ-МСХ зооинженерный факультет. – Режим доступа: <http://www.activestudy.info/genno-inzhenernye-vakciny>. – Дата доступа: 05.09.2023.
6. Диагностика, лечение, профилактика и меры борьбы с респираторными болезнями молодняка крупного рогатого скота инфекционной этиологии : рекомендации / Н. В. Сеница [и др.] ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины, кафедра эпизоотологии и инфекционных болезней. – Витебск : ВГАВМ, 2019. – 55 с.
7. Кондакова, О. А. Вакцины против ротавируса: новые стратегии и разработки / О. А. Кондакова, Н. А. Никитин, Е. А. Трифонова // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 2017. – № 72(4). – С. 199–208.
8. Красочко, П. П. Принципы конструирования рекомбинантных противовирусных вакцин и их использование в ветеринарной медицине / П. П. Красочко, Т. К. Бычкова, К. В. Колесникович // Место и роль аграрной науки в обеспечении продовольственной безопасности страны : сб. материалов Междунар. науч. Конф. (9 декабря 2022 г.) / Смоленск : ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА : в 5 т. – Т 2. – Смоленск : Смоленская ГСХА, 2022. – С. 103-108.
9. Мякиньюва Л. Л. Современные проблемы, вызовы и перспективные направления в области вакцинологии / Л. Л. Мякиньюва, О. В. Букач, А. В. Логунова // Инноватика и экспертиза : науч. тр. – 2015. № 1(14). – С. 96–109.
10. Хайруллин, Р. Ф. Экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli* : учеб. пособие / Р. Ф. Хайруллин, Р. Г. Киямова, А. А. Ризванов. – Казань : Изд-во Казан. ун-та, 2018. – 142 с.
11. Яговкин Э.А., Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Соловьев М.Ю., и др. Состояние и перспективы разработки вакцин для специфической профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016;15(4):74–82. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-4-74-82>.
12. Bayne A-CV, Boltz D, Owen C, Betz Y, Maia G, Azadi P, et al. (2013) Vaccination against Influenza with Recombinant Hemagglutinin Expressed by *Schizochytrium* sp. Confers Protective Immunity. *PLoS ONE* 8(4): e61790. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061790>
13. Ramezanpour B, de Foucauld J, Kortekaas J. Emergency deployment of genetically engineered veterinary vaccines in Europe. *Vaccine*. 2016 Jun 24;34(30):3435-40. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.05.013. Epub 2016 May 18. PMID: 27208587.
14. Ewer KJ, Lambe T, Rollier CS, Spencer AJ, Hill AV, Dorrell L. Viral vectors as vaccine platforms: from immunogenicity to impact. *Curr Opin Immunol*. 2016 Aug;41:47-54. doi: 10.1016/j.coi.2016.05.014. Epub 2016 Jun 7. PMID: 27286566.
15. Gu, P., Yang, F., Su, T. et al. A rapid and reliable strategy for chromosomal integration of gene (s) with multiple copies. *Sci Rep* 5, 9684 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep09684>
16. Panchavarnam S, Kollanoor RJ, Mulloorpeedikayil RG, Mohaideenpitchai MM, Palraj MK, Muthumariyapan S. Development of recombinant major capsid protein Vaccine and assessment of its efficacy against SRDV in similar damselfish (*Pomacentrus similis*). *Fish Shellfish Immunol*. 2023 Oct;141:109035. doi: 10.1016/j.fsi.2023.109035. Epub 2023 Sep 1. PMID: 37659655.
17. Ping Y. Lye, Eiji Kotani & Mervyn W.O. Liew. (2023) Progress and challenges in production of recombinant Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase subunit vaccine. *Process Biochemistry* 132, pages 263-277.
18. Rodrigues Rodrigues R, Freitas Motta J, Alves Ferreira MR, Moreira Júnior C, Ferreira Alves ML, Costa AV, Andrade Bilhalva M, Amaral Donassolo R, Cancela Galvão C, Silva Martins FM, Masiero Salvarani F, Rochedo Conceição F. Immunization of sheep with a recombinant vaccine containing immunogenic nontoxic domains of *Clostridium perfringens* alpha and beta toxins. *Microb Pathog*. 2023 Sep;182:106269. doi: 10.1016/j.micpath.2023.106269. Epub 2023 Jul 28. PMID: 37516212.
19. Sastry M, Zhang B, Chen M, Joyce MG, Kong WP, Chuang GY, Ko K, Kumar A, Silacci C, Thom M, Salazar AM, Corti D, Lanzavecchia A, Taylor G, Mascola JR, Graham BS, Kwong PD. Adjuvants and the vaccine response to the DS-Cav1-stabilized fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus. *PLoS One*. 2017 Oct 26;12(10):e0186854. doi: 10.1371/journal.pone.0186854. PMID: 29073183; PMCID: PMC5658087.
20. Shin MK, Yoo HS. Animal vaccines based on orally presented yeast recombinants. *Vaccine*. 2013 Sep 13;31(40):4287-92. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.07.029. Epub 2013 Jul 24. PMID: 23891501.
21. Zhang X, Cui H, Zhang W, Li Z, Gao J. Engineered tumor cell-derived vaccines against cancer: The art of combating poison with poison. *Bioact Mater*. 2022 Oct 26;22:491-517. doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.10.016. PMID: 36330160; PMCID: PMC9619151.

Николаевич Л.Н., кандидат биологических наук, доцент¹
 Згировская А.А., кандидат биологических наук¹
 Церковский Д.А., кандидат медицинских наук, доцент²
 Якубовский С.М., научный сотрудник¹

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

²РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, г. Минск, Республика Беларусь

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ МТТ-АНАЛИЗА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Резюме

МТТ-анализ клеточной метаболической активности широко используется в исследованиях цитотоксичности *in vitro*. В этой статье мы представляем собственные данные вместе с критической оценкой научной литературы для обоснованности и обсуждения применимости и потенциальных ограничений анализа МТТ.

Ключевые слова: МТТ-анализ, клеточный метаболизм, жизнеспособность клеток, цитотоксичность, клеточная линия карциномы гортани человека Hep2, клеточная линия почки африканской зеленой мартышки Vero, оптическая плотность (ОП).

Summary

The MTT assay for cellular metabolic activity is widely used *in vitro*. This paper presents our own data and critical assessment of the literature data is carried out. The applicability and potential limitations of the MTT assay are discussed.

Keywords: MTT assay, cellular metabolism, cell viability, cytotoxicity, human laryngeal carcinoma cell line Hep2, African green monkey kidney cell line Vero, optical density (OD).

Поступила в редакцию 12.12.2023 г.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время как альтернативная замена использования моделей на животных широко применяются методы *in vitro* [1]. Методы определения жизнеспособности клеток могут быть классифицированы по различным категориям, а именно методы исключения красителей (краситель трипановый синий) (I); методы, основанные на метаболической активности (II); анализ количества АТФ (III); анализы с использованием сульфородамина В (IV); анализ жизнеспособности по маркерам протеазы (V); клоногенный анализ (VI); анализы пролиферации клеток по синтезу ДНК (VII) и микроспектроскопия комбинационного рассеяния (VIII) [2]. Наиболее распространенным в лабораторной практике методом

определения жизнеспособности клеток, включенном в большинство протоколов молекулярной биологии и медицины, является МТТ-анализ [3, 4], который относится ко II группе методов в приведенной выше классификации.

Реагент МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид) представляет собой соль монотетразолия, состоящую из положительно заряженного ядра четвертичного тетразольного кольца, содержащего четыре атома азота, окруженного тремя ароматическими кольцами, включая два фенильных фрагмента и одно тиазолильное кольцо. Восстановление МТТ приводит к разрушению основного тетразольного кольца и образованию фиолетово-синей водонерастворимой молеку-

лы, называемой формазаном [5]. Реагент МТТ может проходить через клеточную мембрану, а также внутреннюю мембрану митохондрий жизнеспособных клеток предположительно благодаря своему положительному заряду [5], а также липофильной структуре [6] и восстанавливается до формазана [5]. Хромогенная природа этой окислительно-восстановительной химической реакции обеспечивает колориметрическое измерение внутриклеточного образования формазана, на основе которого T. Mosmann разработал анализ МТТ в 1983 г. [7], который имеет широкое применение в качестве анализа метаболической активности клеток. Анализ МТТ обычно проводят после нескольких часов инкубации клеток с МТТ. Полученный водонерастворимый формазан затем растворяют в растворителе, таком как диметилсульфоксид (ДМСО). Впоследствии снижение светопропускания за счет поглощения и других механизмов гомогенизированного раствора МТТ-формазана измеряется с помощью устройства для считывания микропланшетов с точки зрения его оптической плотности (ОП) на длине волны, которую формазан, полученный из МТТ, поглощает больше всего в диапазоне 490–570 нм. Значения ОП отражают концентрацию формазана и, следовательно, внутриклеточное снижение МТТ. Внутриклеточное снижение МТТ может быть опосредовано ферментами оксидоредуктазой и дегидрогеназой, а также донорами электронов (в основном НАД(Ф)Н) на разных стадиях гликолитического пути к митохондриальной цепи переноса электронов [5]. Пока место образования формазана и его внутриклеточный транспорт остаются спорными.

На общедоступном ресурсе Pub Med часто встречаются статьи, в которых описано, что местами восстановления и образования осадка формазана являются митохондрии, а митохондриальная сукцинатдегидрогеназа жизнеспособных клеток восстанавливает МТТ до формазана [8] и может локализоваться в липидных каплях клеток [9]. В литературе обоснована роль митохондрий в снижении МТТ [10]. Внутриклеточные гранулы формазана также определялись в различных органеллах, а именно в эндоплазматическом ретикулуме, плазматических мембранах [5], ядре и лизосо-

мах [8]. Эти наблюдения позволяют предположить, что анализ МТТ – это больше чем просто представление митохондриальной активности [8]. Некоторые исследователи выявили факторы, ограничивающие применение метода МТТ [6–8], которые необходимо учитывать при разработке, проведении, анализе и интерпретации результатов данного анализа. Обычно упускаемые из виду мешающие переменные включают количество посеянных клеток, концентрацию реагента МТТ, добавленного к клеткам, время инкубации клеток с МТТ, тип культуральной среды, удаление супернатанта клеток после инкубации МТТ, длину волны, при которой измеряется оптическая плотность. В этих параметрах также существуют несоответствия, которые затрудняют сравнение измеренных значений ОП в разных исследованиях. Восстановление красителя зависит прежде всего от клеточного метаболизма; иногда это отражает жизнеспособность клеток, но смешивание переменных приводит к неточности анализа.

Механизм, лежащий в основе анализа, также до конца не изучен. До сих пор существуют разногласия и неопределенности по некоторым аспектам: например, какие дополнительные органеллы, ферменты и молекулы участвуют в восстановлении МТТ, происхождение внеклеточных кристаллов формазана, цитотоксический эффект самого реагента МТТ и то, как результаты анализа отражают жизнеспособность клеток, метаболическую активность и/или токсичность тестируемых веществ [7].

Общеизвестно, что МТТ-анализ включает превращение водорастворимого желтого красителя [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид], который при восстановлении дегидрогеназой и восстановителями, присутствующими в метаболически активных клетках, дает нерастворимый в воде пурпурный формазан [7]. Химическая структура МТТ и формазана показаны на рисунке 1.

Восстановление МТТ приводит к разрушению основного тетразольного кольца и образованию формазана. Липидорастворимый продукт формазан может быть экстрагирован органическими растворителями и оценен с помощью спектрофотометрии.

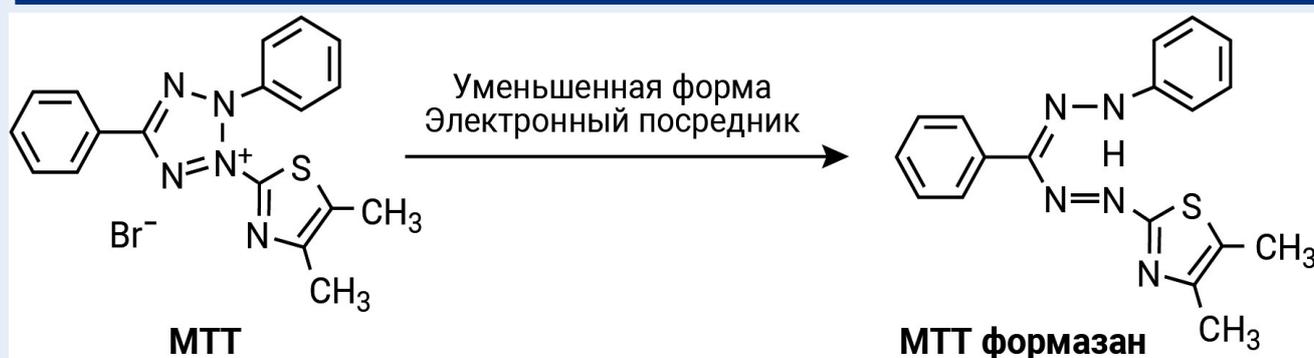


Рисунок 1. – Восстановление МТТ в формазан

Метод с самого начала подразумевался в качестве анализа жизнеспособности культивируемых клеток [8]. К факторам, влияющим на окончательные измерения оптической плотности (ОП) в анализе МТТ, относятся концентрация реагента МТТ и его доля, которая фактически попадает в клетку, клеточная метаболическая активность (которая сильно зависит от множества переменных, включая обработку клеток, биологическое действие культуральной среды, плотность клеток и сопротивление клеточного метаболизма из-за токсические эффекты МТТ), количество клеток, время экстракции кристаллов формазана (что может препятствовать дальнейшему усвоению МТТ), химическое вмешательство, такое как абиотическое снижение МТТ культуральной средой, тестируемое вещество или высвобождение клеточного содержимого, оптическое вмешательство со стороны всех фоновые компоненты, время инкубации клеток с реагентом МТТ и/или тестируемой обработкой и, в конечном счете, оптические измерения.

Цель исследования – разработать протокол МТТ-анализа для оценки жизнеспособности опухолевых клеток карциномы гортани человека Hep2 и нормальных клеток почки африканской зеленой мартышки Vero, основанный на их метаболической активности с учетом основных параметров (количество посеянных клеток, плотность посева, инкубационный период, состав среды, условия культивирования, количество реагента МТТ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены в лаборатории биотехнологии отдела вирусных ин-

фекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского» на клетках линии Hep2 (аденокарцинома гортани человека) и Vero (почка африканской зеленой мартышки), которые приобретены из коллекции клеточных культур человека и животных РНПЦ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ.

В работе использовали следующие реактивы: бессывороточная среда RPMI 1640 (Gibco), эмбриональная телячья сыворотка (FBS) (Gibco), 0,25%-ный раствор трипсина-ЭДТА (Gibco), диметилсульфоксид (ДМСО) (Sigma-Aldrich), МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (Sigma-Aldrich), 0,4%-ный раствор трипанового синего (Sigma-Aldrich) и оборудование: спектрофотометр STAT 21 при длине волны 492/630 нм, ламинарный бокс II класса биобезопасности (LAMSYSTEMS), CO₂-инкубатор (Galaxy 170R New Brunswick an Eppendorf company), микроскоп инвертированный (Primo Vert Plus, Carl Zeiss).

На первом этапе проводили исследования по определению логарифмической фазы роста клеток в полной ростовой среде RPMI 1640 (Biosera, Франция) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Caricogn, Польша) при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ для уточнения времени удвоения используемых в работе клеточных линий с целью выбора времени адаптации, необходимого для адгезии, и последующей инкубации веществ без посева. Для процедуры снятия клеточного монослоя применялся метод трипсинизации с последующей оценкой жизнеспособности клеток методом исключения раствора трипанового синего. Для подсчета коли-

чества клеток в суспензии готовили смесь из 10 мкл полученных при снятии монослоя клеток и 10 мкл раствора трипанового синего. В течение нескольких минут смесь вводили в камеру Горяева и подсчитывали количество неокрашенных (живые клетки) и окрашенных в синий цвет (мертвые клетки). Оценивали долю жизнеспособных клеток и концентрацию клеток в суспензии. Исходная концентрация клеток составила 240000 кл/мл.

На втором этапе работы подбирали оптимальное количество клеток на лунку в полной ростовой среде для адгезии клеток ко дну планшета. В лунки вносили по 100 мкл суспензии клеток Her2 и Vero. В вертикальные и горизонтальные дорожки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл полной культуральной среды. В качестве нулевого контроля использовали полную питательную среду для каждой посевной концентрации. Планшет помещали в CO₂ инкубатор и клетки культивировали 24, 48, 72 и 96 ч без смены среды. Конфлюэнтность монослоя клеточных популяций Her2 и Vero контролировали при помощи световой микроскопии.

По истечении времени инкубации клеток в каждую лунку планшета вносили стерильный раствор МТТ-реагента, приготовленный из расчета 5 мг/мл, с последующей инкубацией в течение 4 ч при температуре 37 °С в инкубаторе CO₂. В итоге содержание МТТ реагента (мкг) в лунках составило 50; 25; 12,5; 6,25; 1,56 мкг/лунку.

Затем аккуратно удаляли надосадочную жидкость из лунок и образовавшиеся внутриклеточные фиолетовые кристаллы формазана салюбилизировали добавлением раствора ДМСО в объеме 150 мкл на лунку в течение 30 мин при температуре 37 °С в CO₂-инкубаторе. Для полноты растворения энергично пипетировали. Затем измеряли поглощение света с длиной волны 492/630 нм в каждой лунке в блоке ОП (оптическая плотность) на иммуноферментном планшетном анализаторе Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США) с предварительным встряхиванием.

Статистическую обработку данных проводили с использованием линейного регрессионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведены исследования по определению оптимальной плотности клеток, времени культивирования, концентрации МТТ-реагента и времени инкубации МТТ в массовом анализе МТТ на клеточных линиях аденокарциномы гортани (Her2) и почки африканской зеленой мартышки (Vero). В ходе изучения времени удвоения клеточной культуры аденокарциномы гортани и почки африканской зеленой мартышки было показано, что через 5 ч после культивирования клеток наблюдалась частичная адгезия клеток ко дну культурального флакона. Через 24 ч инкубации наблюдалось удвоение клеток, в связи с чем данное время было выбрано для дальнейших исследований как необходимое для адаптации – первичной адгезии и нормализации жизнедеятельности и роста. При этом было показано, что максимум абсорбции при конверсии МТТ-реагента в формазан клетками линии Her2 и Vero при использовании в качестве салюбилизатора раствора ДМСО приходится на 492 нм. Данная длина волны была выбрана для регистрации оптической плотности в последующих исследованиях. В качестве референтской была выбрана длина волны 630 нм. Автоматическое отсечение данного показателя при расчетах позволяет не использовать отрицательный контроль (среда без клеток).

Для выбора оптимальной концентрации клеток для пассажа было посеяно различное количество клеток в каждую лунку 96-луночного планшета, время культивирования клеточных популяций Her2 и Vero составило 24, 48, 72, 96 ч перед добавлением МТТ.

Данные, представленные на рисунках 1 и 2, отражают динамику зависимости оптической плотности клеток линии Her2 и Vero 3-го пассажа от концентрации клеток в суспензии и времени инкубации. Показано, что линейный участок кривой зависимости оптической плотности при конверсии МТТ в формазан от количества жизнеспособных клеток в популяции Her2 начинается в среднем при 20 тыс. клеток в лунке (рисунок 2). Выявлено, что ОП зависит от количества/плотности посева клеток, концентрации МТТ и времени инкубации клеток. ОП меняется с увеличением количества/плотности посева клеток.

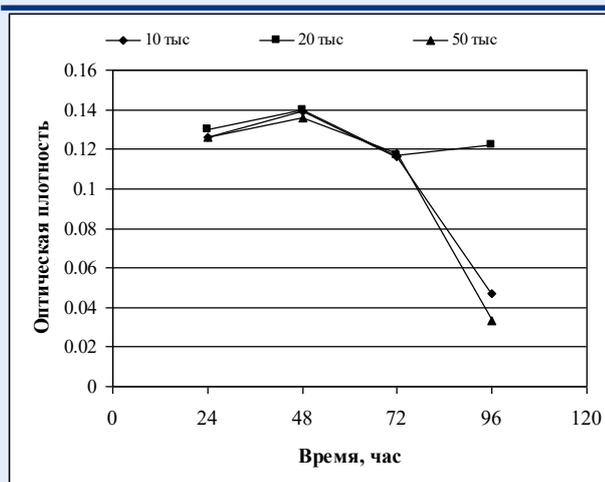


Рисунок 2. – Динамика зависимости оптической плотности клеток линии Hep2 3 пассажа от концентрации клеток в суспензии и времени инкубации

В то же время линейный участок кривой зависимости оптической плотности при конверсии МТТ в формазан от количества жизнеспособных клеток Vero начинается при 25 тыс. клеток в лунке при инкубации 48 ч (рисунок 3).

Следовательно, такие параметры, как концентрация клеток на лунку 96-луночного планшета для клеток Hep2 составляет 20 тыс., а клеток Vero – 25 тыс., и одинаковый период культивирования в течение 48 ч рекомендуются для проведения исследований на цитотоксичность тестируемых веществ *in vitro* анализом МТТ.

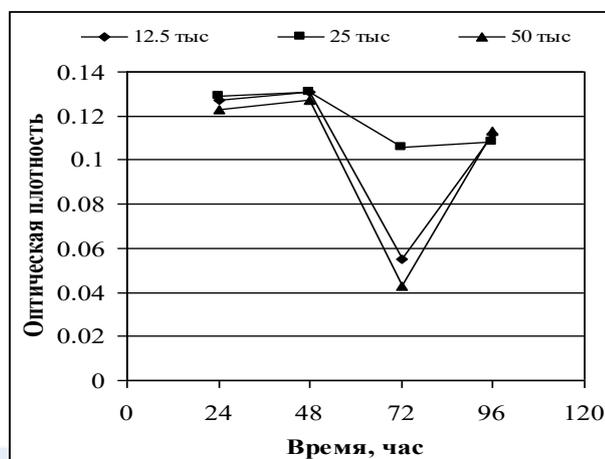


Рисунок 3. – Динамика зависимости оптической плотности клеток линии VERO 3 пассажа от концентрации клеток в суспензии и времени инкубации

Как показывают данные, полученные на клеточной линии Hep2 независимо от концентрации МТТ и времени инкубации МТТ, увеличение количества посева клеток увеличивает ОП. Это логически понятно, поскольку увеличение количества клеток увеличивает общий уровень продуцируемого формазана клеточной популяцией и, следовательно, измеряемую ОП, как показано в других исследованиях [17, 18]. Тот факт, что уровни ОП в отсутствие МТТ не менялись с увеличением количества клеток, показывает, что это не связано с оптическими эффектами увеличения количества клеток.

Результаты анализа МТТ на клетках и Vero с применением диапазона концентраций МТТ реагента (25 мкг, 12,5 мкг и 6,25 мкг на лунку) показали, что увеличение концентрации МТТ до 25 мкг на лунку вызывало увеличение уровня ОП независимо от количества клеток и момента времени измерения (рисунок 4).

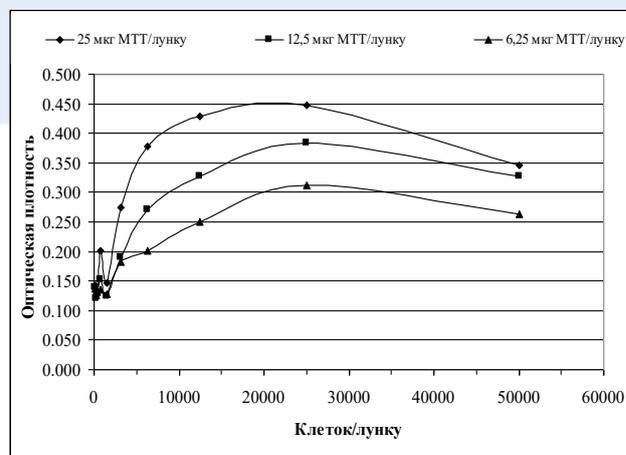


Рисунок 4. – Влияние количества клеток Vero в лунке на образование формазана, оцениваемое по результатам измерения оптической плотности, при различных концентрациях МТТ

Однако при большем количестве клеток и в более длительные моменты времени разница ОП между концентрациями МТТ более очевидна. Увеличение концентрации МТТ не приводило к дальнейшему увеличению уровней ОП независимо от количества клеток и момента времени измерения. Вероятным объяснением этих наблюдений является ускорение гибели клеток, вызванной МТТ, при более высо-

ких концентрациях МТТ реагента. Другими словами, выше определенного уровня концентрации МТТ ускоренная скорость гибели клеток находится на уровне, который не позволяет клеткам снижать МТТ в такой степени, как при более низких концентрациях МТТ. Следовательно, концентрация МТТ, при которой образуется максимальный уровень формазана до гибели клеток, индуцированной МТТ, должна быть выбрана как оптимальная концентрация МТТ для каждого конкретного типа клеток, количества клеток и времени инкубации.

Чтобы определить переменные, которые потенциально могут повлиять на измерения объемного МТТ-анализа, мы изучили ОП (в частности, уменьшенную интенсивность пропускания света при освещении образца с полосой пропускания 492 нм в зависимости от количества клеток, концентрации МТТ и времени инкубации клеток с реагентом МТТ на клеточной популяции линии Нер2 (рисунок 5). ОП клеток измеряли через 4 ч после добавления МТТ в концентрациях 5 мкг, 15 мкг и 25 мкг на лунку.

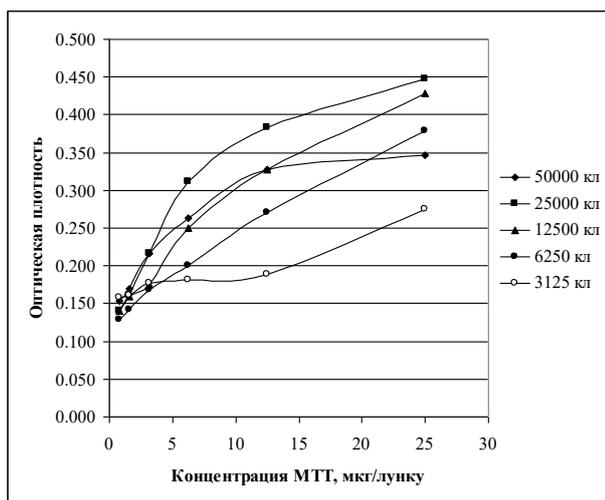


Рисунок 5. – Зависимость образования формазана от количества клеток Нер2 в лунке при различных концентрациях МТТ

Наблюдаемое увеличение ОП также может быть результатом увеличения плотности клеток, а не их количества как такового, учитывая, что пространственная близость клеток друг к другу может влиять на межклеточную коммуникацию и, следова-

тельно, изменять метаболическое поведение клеток [11]. Другими словами, с увеличением количества клеток не только увеличивается сумма уровней формазана, продуцируемого клетками, но и более высокая плотность клеток может также изменить уровень формазана в каждой отдельной клетке за счет изменения природы межклеточной передачи сигналов и, следовательно, ферментативной активности клеток. Однако это не просто вытекает из наших данных и должно быть подтверждено путем сравнения уровней ОП различных популяций клеток с одинаковым количеством клеток, различающихся пролиферативным потенциалом деления.

Следует отметить, что влияние увеличения количества клеток на ОП неодинаково в зависимости от различных концентраций МТТ и времени инкубации. Даже при одинаковой концентрации МТТ и времени инкубации величина этого эффекта не остается постоянной по мере увеличения числа клеток. Исследования других авторов также показали, что ОП не всегда является линейной функцией количества клеток, и эта функция варьирует в зависимости от типа клеток [12], количества клеток [12, 13], pH [12] и формазана [13]. В целом эти результаты позволяют заключить, что перед применением МТТ-анализа для оценки жизнеспособности клеток необходимо провести эксперименты по строгому протоколу, чтобы определить, как вышеупомянутые параметры влияют на взаимосвязь между измеренной ОП и количеством клеток.

На концентрацию формазана, вырабатываемую клеточной популяцией, влияет не только количество жизнеспособных клеток, но и другие факторы, связанные с тестируемыми веществами или состоянием клеток, а именно различное количество поглощения МТТ [14] и изменения метаболической активности клеток [15]. Другими словами, суммарный эффект всех изученных факторов, а не только одного из них, определяет уровень снижения МТТ, последующую выработку формазана и, наконец, измеренную ОП. Например, в работе М. Ghasemi et al. [16] показано, что измерение уровней ОП в разные моменты времени (2, 3 и 4 ч) после инкубации клеток РС-3 (простата человека) с МТТ в условиях

независимо от концентрации МТТ, количества посева клеток и увеличения времени инкубации МТТ увеличивает уровни ОП, что предположительно представляет собой снижение МТТ и формазана. Однако при отсутствии клеток уровни ОП были одинаковыми в разное время инкубации независимо от концентрации МТТ. Кроме того, максимально возможный уровень снижения МТТ достигается через 3 ч инкубации при 20000 клеток РС-3 на лунку 96-луночного планшета с 0,3 и 0,4 мг/мл МТТ. Однако при более низких уровнях количества клеток и/или концентрации МТТ максимальный (насыщающий) уровень его снижения не достигается вплоть до 4 ч инкубации МТТ. Следовательно, момент времени насыщения зависит от количества засеянных клеток и концентрации МТТ реагента [12]. Достижение уровня плато ОП после определенного времени инкубации клеток с МТТ может быть связано с уменьшением клетками всего доступного реагента МТТ или затруднением дальнейшего поглощения МТТ при появлении определенного количества кристаллов формазана на поверхности клеток [9, 10]. Другой причиной может быть цитотоксический эффект реагента МТТ. Показано, что внутриклеточный метаболизм МТТ постепенно вызывает повреждение митохондрий, нарушение нормального клеточного метаболизма и, наконец, апоптоз клеток [17]. Зависимая от времени потеря целостности мембраны в результате экзоцитоза формазана также является одним из механизмов гибели клеток после инкубации МТТ [18]. Тот факт, что насыщение уровней ОП происходит раньше при более высокой концентрации МТТ и большем количестве клеток, позволяет предположить, что более высокая концентрация МТТ и/или большее количество клеток потенциально ускоряют достижение уровня насыщения при снижении МТТ.

Таким образом, более высокая плотность клеток и их близость друг к другу могут повысить метаболическую активность клеток. Тестируемые лекарственные вещества также могут изменить момент времени насыщения и/или уровень насыщения и таким образом потенциально исказить сравнительный анализ между различными состояниями клеток.

Поскольку культуральные среды обеспечивают питательные вещества для роста, пролиферации и метаболизма клеток, то их состав и наличие или отсутствие сыворотки могут влиять на результаты анализа МТТ, биологическое поведение клеток, уровень метаболической активности и, следовательно, на снижение МТТ.

Чтобы выяснить, как влияние сывороточного голодания на метаболическую активность клеток будет отражаться на измерениях анализа МТТ, мы сравнили литературные данные анализа МТТ между клетками, выращенными в бессывороточной и содержащей сыворотку средах [16].

Данные литературы свидетельствуют о том, что большинство клеток, которым не хватало сыворотки в течение 26 ч, имели круглую морфологию (некоторые с пузырьками) по сравнению с нормальной формой веретена большинства клеток, получавших сыворотку, в то время как веретенообразная форма клеток РС-3 (простата человека) может указывать на жизнеспособность и прикрепление, круглая форма указывает на отслоение клеток и может быть морфологическим индикатором апоптоза клеток [18, 19]. Однако гибель клеток представляет собой поэтапный процесс, который обычно занимает несколько часов [18], и клетки круглой формы могут находиться на разных стадиях клеточной гибели, тогда как на более ранних стадиях они все еще демонстрируют некоторый уровень метаболической активности, о чем свидетельствует образование формазана в этих клетках.

Следует также отметить, что компоненты, присутствующие в культуральной среде, потенциально могут повлиять на результаты анализа МТТ. Вероятно, это может возникнуть из-за оптических помех (поглощение или рассеяние света), химических реакций (абиотическое восстановление МТТ) и биологического воздействия на жизнеспособность, рост и метаболическую активность клеток, которые, следовательно, могут повлиять на общий уровень снижения МТТ. Некоторыми авторами было показано, что МТТ сам по себе не оказывает оптического влияния на результаты анализа [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературы и собственные данные свидетельствуют о том, что измерения параметров МТТ являются результатом сложного процесса, зависящего от многих из вышеупомянутых факторов, и поэтому оптимизация анализа и рациональная интерпретация данных необходимы для предотвращения ошибочных выводов о таких переменных, как жизнеспособность клеток, токсичность тестируемого вещества или состояние клеточного метаболизма.

Наши результаты указывают на необходимость оптимизации таких параметров, как количество клеток, условия культивирования, концентрация МТТ и время инкубации МТТ для каждой клеточной линии, условий эксперимента. Оптимальные значения этих параметров достигаются, когда анализ может оптимально выявить различия между различными клеточными популяциями, позволяя клеткам проявлять максимальную способность к снижению МТТ, но не вызывать значительного уровня токсичности клеток перед измерениями анализа. Именно в таких оптимальных условиях значения ОП можно применять в качестве приблизительной оценки среднего уровня снижения МТТ в каждой популяции клеток. Однако уровень

ОП не является простым представлением только одного параметра, такого как жизнеспособность клеток, пролиферация клеток или метаболическая активность, а представляет собой сумму многих факторов на уровне отдельных клеток и клеточных популяций, а также других клеточных факторов, таких как фаза роста клеток, скорость поглощения МТТ и экстружии формазана, на которые потенциально может влиять тестируемое вещество или культуральная среда.

В ходе исследований нами разработан протокол для проведения МТТ-анализа на клетках аденокарциномы гортани Hep2 и почки африканской зеленой мартышки Vero, который включает рекомендуемые оптимальные условия, а именно число высеваемых клеток Hep2 в лунку составляет 20 тыс. клеток, а Vero – 25 тыс. клеток; время адаптации клеток для адгезии и нормализации процесса пролиферации составляет 48 ч; оптимальная концентрация МТТ – 25 мкг на лунку 96-луночного планшета; оптимальное время инкубации реагента МТТ с клетками – 4 ч при температуре 37 °С и 5 % CO₂; оптимальные длины волн для проведения МТТ-теста: 492 нм – для регистрации абсорбции формазана и 630 нм – для отсекающего фонового сигнала.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Выбор оптимального метода детекции жизнеспособности клеточных культур для тестов на пролиферативную активность и цитотоксичность / А. Н. Афанасьева [и др.] // *Лабораторные животные для научных исследований*. – 2021. – № 2. – С. 16–24.
2. Adan, A. *Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays* / A. Adan, Y. Kiraz, Y. Baran // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 17, № 14. – P. 1213–1221.
3. Sylvester, P. W. *Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability* / P. W. Sylvester // *Drug Design and Discovery*. – 2011. – Vol. 716. – P. 157–168.
4. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств / Е. М. Трещалина [и др.] // *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А. Н. Миронова. Ч. 1.* – М.: Гриф и К, 2012. – С. 640–654.
5. Berridge, M. V. *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction* / M. V. Berridge, P. M. Herst, A. S. Tan // *Biotechnol. Annu. Rev.* – 2005. – № 11. – P. 127–152.
6. Stockert, J. C. *Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives* / J. C. Stockert, R. W. Horobin, L. L. Colombo // *Acta Histochem.* – 2018. – Vol. 120. – P. 159–167.
7. Mosmann, T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays* / T. Mosmann // *Immunol. Methods.* – 1983. – Vol. 65. – P. 55–63.
8. Angius, F. *Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair* / F. Angius, A. Floris // *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA.* – 2015. – Vol. 29, № 2. – P. 314–319.
9. *MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets* / J. C. Stockert, [et al.] // *Acta Histochem.* – 2012. – Vol. 114, № 8. – P. 785–796.
10. *Disruption of functional activity of mitochondria during MTT assay of viability of cultured neurons* / A. M. Surin [et al.] // *Biochemistry.* – 2017. – Vol. 82. – P. 737–749.

11. Karp, G. *Cell signaling and signal transduction: Communication between cells* / G. Karp, P. van der Geer // *Cell and Molecular Biology. Concepts Exp.* – 2005. – Vol. 6. – P. 608–609.
12. *Considerations and Technical Pitfalls in the Employment of the MTT Assay to Evaluate Photosensitizers for Photodynamic Therapy* / E. Carreco [et al.] // *Appl. Sci.* – 2021. – Vol. 11. – P. 2603.
13. Koyanagi, M. *A comparative study of colorimetric cell proliferation assays in immune cells* / M. Koyanagi, S. Kawakabe, Y. Arimura // *Cytotechnology* 2015. – Vol. 68. – P. 1489–1498.
14. *Localization of MTT formazan in lipid droplets. An alternative hypothesis about the nature of formazan granules and aggregates* / G. Diaz [et al.] // *Eur. J. Histochem.* – 2007. – Vol. 51. – P. 213–218.
15. *Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods* / L. Tang [et al.] // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2018. – Vol. 37. – P. 1–15.
16. *The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis* / M. Ghasemi [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – P. 12827.
17. *Biomechanical stimulation effects on the metabolism of adipocyte* / L. M. Moldovan [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2020. – Vol. 235. – P. 8702–8713.
18. Elmore, S. *Apoptosis: A review of programmed cell death* // *Toxicol. Pathol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 495–516.
19. *Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death* / G. Kroemer [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2009. – Vol. 16. – P. 3–11.

ТРИКЛАМИЗОЛ
противопаразитарный препарат

ПРИМЕНЯЮТ
при ассоциативных
гельминтозах крупного
рогатого скота и
диких парнокопытных
животных групповым
способом с кормом или
подкормкой однократно

СОДЕРЖИТ
триклабендазол,
албендазол,
левамизола
гидрохлорид,
лактозу

WWW.BIEVM.BY

УДК 619:614.48

Борисевич А.С., аспирант¹

Высоцкий А.Э., кандидат ветеринарных наук, доцент²

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор²

¹УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

²УП «НИИ БИОФАРМ», Минский филиал, г. Минск, Республика Беларусь

ДЕЙСТВИЕ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ ТЕОТРОПИНА НА ЭПИЗООТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Резюме

Композиции теотропина и четвертичных аммониевых соединений оказывали выраженное действие на эпизоотически значимые виды бактерий и грибов при концентрации теотропина 0,2–0,5 % (в зависимости от вида), причем эффективность действия не снижала органическая защита. Композиция теотропина, четвертичного аммониевого соединения и поверхностно-активного вещества (ПАВ) в 2%-ной концентрации при кратковременном контакте (до 30 минут) бактериостатически действовала на *Mycobacterium bovis*, а в 3%-ной концентрации обеспечивала их инактивацию на поверхностях с органической защитой 88,8 % популяции.

Тенденция роста резистентности микрофлоры к 1%-ным композициям на основе теотропина нарастала медленнее, чем к хлорсодержащему дезинфектанту, но этот эффект проявлялся в меньшей степени при использовании 0,5%-ного рабочего раствора.

Оптимальный вариант дезинфицирующей композиции на основе теотропина может быть использован в качестве нового дезинфицирующего средства для объектов ветеринарного надзора.

Ключевые слова: теотропин, четвертичные аммониевые соединения (ЧАС), антимикробная активность, микобактерии туберкулеза, рост резистентности микрофлоры к дезинфектантам.

Summary

The compositions of theotropin and quaternary ammonium compounds had a pronounced effect on epizootically significant species of bacteria and fungi at a concentration of theotropin of 0,2–0,5 % (depending on the species), and the effectiveness of the action was not reduced by organic protection. The composition of theotropin, quaternary ammonium compound and surfactant in 2 % concentration with short-term contact (up to 30 min) bacteriostatically acted on *Mycobacterium bovis*, and in 3 % concentration ensured their inactivation on surfaces with organic protection 88,8 % of the population.

The tendency of microflora resistance to 1 % theotropin-based compositions increased more slowly than to a chlorine-containing disinfectant, but this effect was manifested to a lesser extent when using 0,5 % working solution.

The optimal variant of the disinfectant composition based on theotropin can be used as a new disinfectant for veterinary surveillance facilities.

Keywords: theotropin, quaternary ammonium compounds, antimicrobial activity, mycobacterium tuberculosis, increased resistance of microflora to disinfectants.

Поступила в редакцию 28.07.2023 г.

ВВЕДЕНИЕ

Интенсификация производства продуктов животноводства вызывает необходимость постоянной санации среды обитания животных. За технологический цикл происходит более чем стократный рост микробной популяции преимущественно представителей семейства *Enterobacteriaceae* – родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, а также родов *Staphylococcus*, *Bacillus* и др., при этом бактериальная обсемененность поверхностей и воздуха достигает несколько миллионов КОЕ/см² (см³)

[1]. В связи с этим дезинфекция – ключевое звено профилактических мероприятий при получении продуктов животноводства. Большинство дезинфицирующих средств для ветеринарии обладают широким диапазоном и уничтожает вирусы, бактерии, грибы, а некоторые препараты – яйца гельминтов и ооцисты эймерий. Однако практика ведения промышленного животноводства и птицеводства показывает, что длительное применение одних и тех же дезинфектантов вызывает появление устойчивой микрофлоры [2, 3]. Кроме того, многие ак-

тивно действующие вещества (АДВ), такие как формальдегид, глутаровый альдегид, гидроокись натрия, хлорсодержащие соединения, представляют угрозу здоровью животных и загрязняют внешнюю среду [2, 3]. Ротация антимикробных средств с малотоксичными АДВ предупреждает появление резистентной микрофлоры [4], но для этого необходим постоянный поиск соответствующих АДВ для создания эффективных дезинфицирующих композиций.

Перспективным АДВ является теотропин, который стабилен, хорошо растворим в воде (до 50 %). Показатель водородных ионов (рН) 10%-ного раствора теотропина – 9,3–9,5, что облегчает его применение на загрязненных навозом поверхностях, имеющих щелочную реакцию. Теотропин обладает антикоррозионными свойствами и не обесцвечивает окрашенные поверхности. Антимикробная активность теотропина невысока – в концентрации 0,5–0,75 % он действует бактериостатически, в 1%-ной концентрации проявляется бактерицидное действие, но через 16–18 ч экспозиции [5]. Это вызывает необходимость создания композиций с добавлением к теотропину веществ, усиливающих бактерицидную активность, разрушающих органические загрязнения и биопленки микроорганизмов, но существенно не повышающие токсичность препарата.

Цель исследования – изучение действия композиций теотропина, четвертичных аммониевых соединений и некоторых вспомогательных веществ на эпизоотически значимые микроорганизмы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella dublin*, *Pasteurella multocida* А выращивали на Brain Heart Infusion Agar, *Trichophyton verrucosum* ТФ130 – на среде Сабуро, *Mycobacterium bovis* № 8 – на среде Гельберга.

Исследовали композиции № 1–5 с разным содержанием теотропина, ЧАС, головной фракции этилового спирта и диметилсульфоксида.

На водопроводной воде готовили разведения вариантов дезинфектантов (0,25 %, 0,5 %, 1 %, 3 %), а также растворы с удвоенной концентрацией.

Для диффузионного теста чашки с питательной средой засеивали микроорганизмами. В слое среды вырезали по 4 лунки, в которые вносили по 100,0 мкл разведений каждой композиции. Через 20–22 ч инкубирования при температуре 37 °С определяли размеры зон его задержки.

Trichophyton verrucosum выращивали на среде Сабуро 2 недели при комнатной температуре, микобактерии – 22–32 дня при температуре 37 °С.

Для суспензионного теста *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* суспендировали (5 единиц по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича) в изотоническом растворе с 20 % сыворотки крови крупного рогатого скота и добавляли варианты композиций до 0,2 %, 0,4 %, 0,8 %, 1 %. Через 10 и 30 минут проводили посев на Brain Heart Infusion Agar по 50,0 мкл суспензий с дезинфектантами. Через 18–20 ч инкубирования при температуре 37 °С учитывали результаты.

Для изучения действия на тест-микроорганизмы, находящиеся на поверхностях с органической защитой, использовали стерильные керамические плитки (5×5 см = 25 см²), на которые наносили по 1,0 мл суспензии *Staph. aureus* (5 единиц по стандарту мутности). Подсохшие инфицированные поверхности покрывали 20%-ной сывороткой крови крупного рогатого скота. После подсушивания на поверхности наносили растворы композиций из расчета 0,5 л/м² (1,25 мл на плитку) и 0,75 л/м² (1,875 мл на плитку). Контрольный тест-объект обрабатывали стерильной водой. Через 30 минут на все поверхности наносили по 1,0 мл стерильной воды, стерильными тампонами делали смывы и посева на Brain Heart Infusion Agar.

Для изучения действия дезинфектантов на микобактерии на 0,9%-ном растворе хлорида натрия с 20 % сыворотки крови крупного рогатого скота готовили суспензию *Mycobacterium bovis* 8 (1 мг/мл), затем смешивали с равными объемами дезинфектантов (составы № 2, № 4, № 5 в конечной концентрации 1,5 %, 2 %, 3 %, 4 %). Через 30 минут инкубирования при комнатной температуре смеси сеяли (по 0,3 мл) на пробирки со средой Гельберга. Посевы инкубировали при температуре 37 °С 32 дня.

Для изучения действия дезинфектантов на микобактерии туберкулеза, находящиеся на поверхности с органической защитой, суспензией *Mycobacterium bovis* 8 (1,0 мг/мл) контаминировали керамические плитки (25,0 см², по 1,0 мл). После подсушивания поверхности покрывали (по 1,0 мл) 20%-ной сывороткой крови крупного рогатого скота. На высохшие поверхности наносили растворы композиции № 5 и контрольного хлорсодержащего дезинфектанта «Профит» (1,5 %, 2 %, 3 %) из расчета 0,75 л/м² (1,875 мл на плитку). Через 30 минут делали смывы стерильным 0,9%-ным раствором хлорида натрия и посеив на среду Гельберга. Посевы инкубировали при температуре 37 °С до 31 дня.

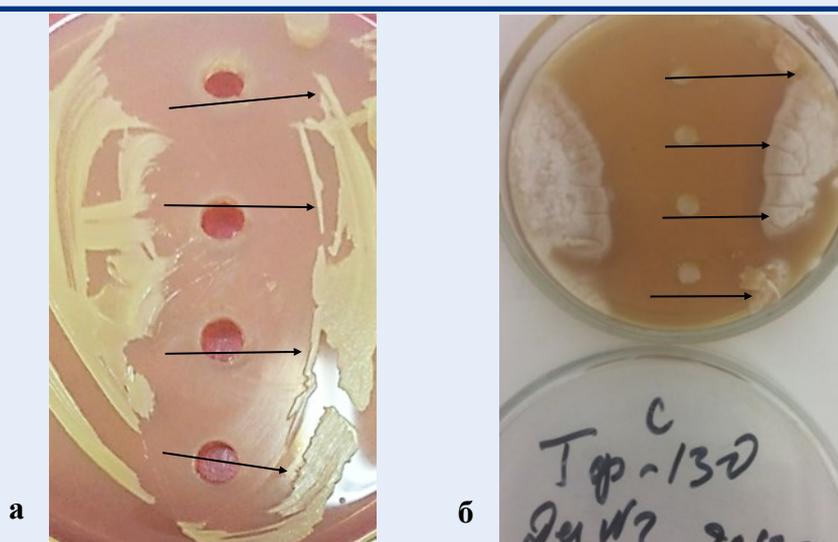
Развитие резистентности *Staphylococcus aureus* к дезинфицирующим композициям изучали путем проведения пассажей в диффузионном тесте, делая пересевы с границ зоны задержки роста.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На I этапе сравнили эффективность 4 композиций (таблицы 1, 2). Установлено, что они оказывали выраженное действие на эпизоотически значимые виды бактерий, вызывая образование зон задержки их роста. При суммировании размеров таких зон (таблица 2) стало заметно, что большей активностью обладала композиция № 2 (таблица 2, рисунок 1).

Таблица 1. – Действие 4 вариантов композиций на основе теотропина в диффузионном тесте на эпизоотически значимые виды бактерий (диаметры зон задержки роста в мм)

Концентрация, %	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella dublin</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
№ 1						
0,25	24	16	9	12	14	27
0,5	20	19	13	13	13	28
1,0	26	22	14	14	13	29
3,0	28	23	17	16	15	32
Сумма	98	80	53	55	55	116
№ 2						
0,25	24	18	15	16	19	23
0,5	23	19	15	17	20	25
1,0	23	21	17	19	21	27
3,0	28	22	22	25	23	35
Сумма	98	80	69	77	83	110
№ 3						
0,25	22	15	12	13	18	18
0,5	24	16	12	13	19	20
1,0	32	22	15	13	19	22
3,0	34	24	22	20	23	28
Сумма	112	77	61	59	79	88
№ 4						
0,25	24	11	14	9	16	20
0,5	27	13	15	11	18	24
1,0	30	14	16	12	18	31
3,0	34	18	22	19	21	34
Сумма	115	67	67	51	73	109



а – *Pasteurella multocida*; б – *Trichophyton verrucosum*

Рисунок 1. – Действие композиции № 2 в концентрациях 0,25–3 % в диффузионном тесте

Таблица 2. – Сумма диаметров зон задержки роста, рейтинг композиций

Номер композиции			
№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
457 мм	517 мм	476 мм	471 мм
IV	I	II	III

В таблице 3 представлен формальный рейтинг действия композиций на отдельные виды микроорганизмов. Как вид-

но, именно композиция № 2 оказывала более эффективное действие и в разрезе видового состава бактерий.

Таблица 3. – Рейтинг действия композиций на отдельные виды микроорганизмов

Микроорганизмы	Номер композиции			
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
Стафилококки	98 (III-IV)	98 (III-IV)	112 (II)	115 (I)
Стрептококки	80 (I-II)	80 (I-II)	77 (III)	56 (IV)
Кишечная палочка	53 (IV)	69 (I)	61(III)	67 (II)
Сальмонеллы	55 (III)	77 (I)	59 (II)	51 (IV)
Клебсиеллы	79 (II)	73 (III)	55 (IV)	83 (I)
Пастереллы	88 (IV)	109 (III)	116 (I)	110 (II)
Сумма	18	13	15	14

Все композиции на основе теотропина эффективно действовали на *Trichophyton verrucosum* (таблица 4, рисунок 1).

Таблица 4. – Действие вариантов композиций на *Trichophyton verrucosum* (в диффузионном тесте (диаметры зон задержки роста в мм)

Номер композиции	Концентрация, %			
	0,25	0,5	1,0	3
№ 1	55	52	56	63
№ 2	40	41	47	63
№ 3	23	32	47	59
№ 4	50	53	65	70

Анализ результатов позволил скорректировать состав и предложить вариант № 5, который был сравнен с лучшими композициями № 2 и № 4.

В таблице 5 приведены результаты сравнения действия композиций № 2 и № 5 на эпизоотически значимые виды бакте-

рий. Как видно, более эффективной оказалась композиция № 5 (сумма диаметров задержки роста – 349 мм при 290 мм у композиции № 2), которая оказывала более эффективное действие и на *Trichophyton verrucosum* (таблица 6).

Таблица 5. – Действие композиций № 2 и № 5 в диффузионном тесте на эпизоотически значимые виды бактерий (диаметры зон задержки роста в мм)

Концентрация, %	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
№ 2 0,25	20	12	14	12	13	12
0,5	30	13	15	13	13	15
1,0	31	16	16	17	13	15
Сумма	81	41	45	42	39	42
№ 5 0,25	34	13	13	12	12	15
0,5	42	16	17	13	13	16
1,0	50	17	18	14	16	18
Сумма	126	46	48	39	41	49
3	60	20	21	17	20	21

Дезинфицирующие композиции на основе теотропина (№ 2, № 4, № 5) даже в концентрации 0,2 % в суспензионном тесте с органической защитой полностью инактивировали *Staphylococcus aureus* и *Esche-*

richia coli при экспозиции 10 минут. На поверхностях с органической защитой такой эффект достигался в концентрации 0,5 % и расходе 0,5 л/м².

Таблица 6. – Действие композиций № 2 и № 5 на *Trichophyton verrucosum* в диффузионном тесте (диаметры зон задержки роста в мм)

Номер композиции	Концентрация, %			
	0,25 %	0,5 %	1,0 %	3 %
№ 2	17	20	35	41
№ 5	25	Больше 50	Больше 50	Больше 50

Композиции № 2 и № 4 в концентрациях 2 % и 3 % при экспозиции 30 минут оказали выраженное действие на суспензию *Mycobacterium bovis*. При посеве обработанных суспензий на питательной среде появлялись лишь единичные очень мелкие колонии. При посеве суспензии *Mycobacterium bovis*, обработанной 2%- и

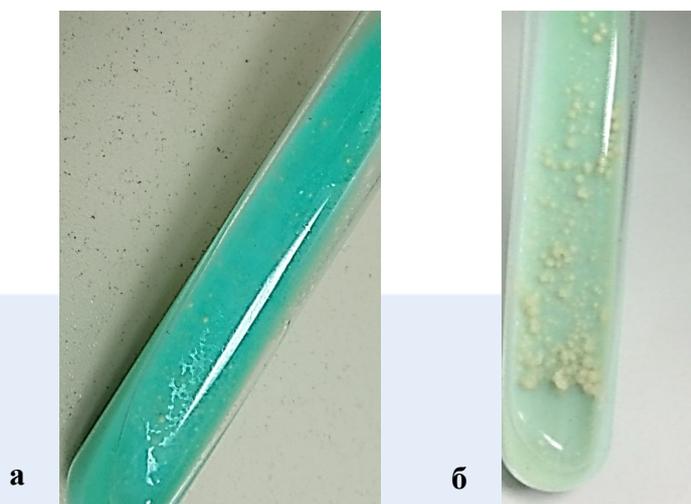
3%-ной композицией № 5, поверхность питательной среды была абсолютно чистой, что свидетельствовало о 100%-ном подавлении популяции. При этом в посеве контрольной суспензии было заметно до 800 отдельных крупных и мелких колоний (таблица 7).

Таблица 7. – Результаты посева *Mycobacterium bovis*, обработанных в суспензионном тесте с органической защитой, дезинфектантами (3%-ные растворы композиций № 2, № 5), экспозиция 30 минут

		
Рост в контроле	Дезинфектант № 2, единичные колонии (стрелка)	Дезинфектант № 5, отсутствие признаков роста

При обработке поверхностей, загрязненных *Mycobacterium bovis*, покрытых органической пленкой, при мелкокапельном орошении и экспозиции 30 минут композиция № 5 оказывала бактериостатическое действие. Через 21 день после посевов смывов с поверхностей в кон-

трольных пробирках наблюдался рост крупных и средних по размеру колоний, порядка 800 КОЕ (рисунок 2б). В посевах смывов с поверхностей, обработанных композицией № 5 в концентрациях 1,5–3 %, были заметны мелкие точечные колонии (рисунок 2а).



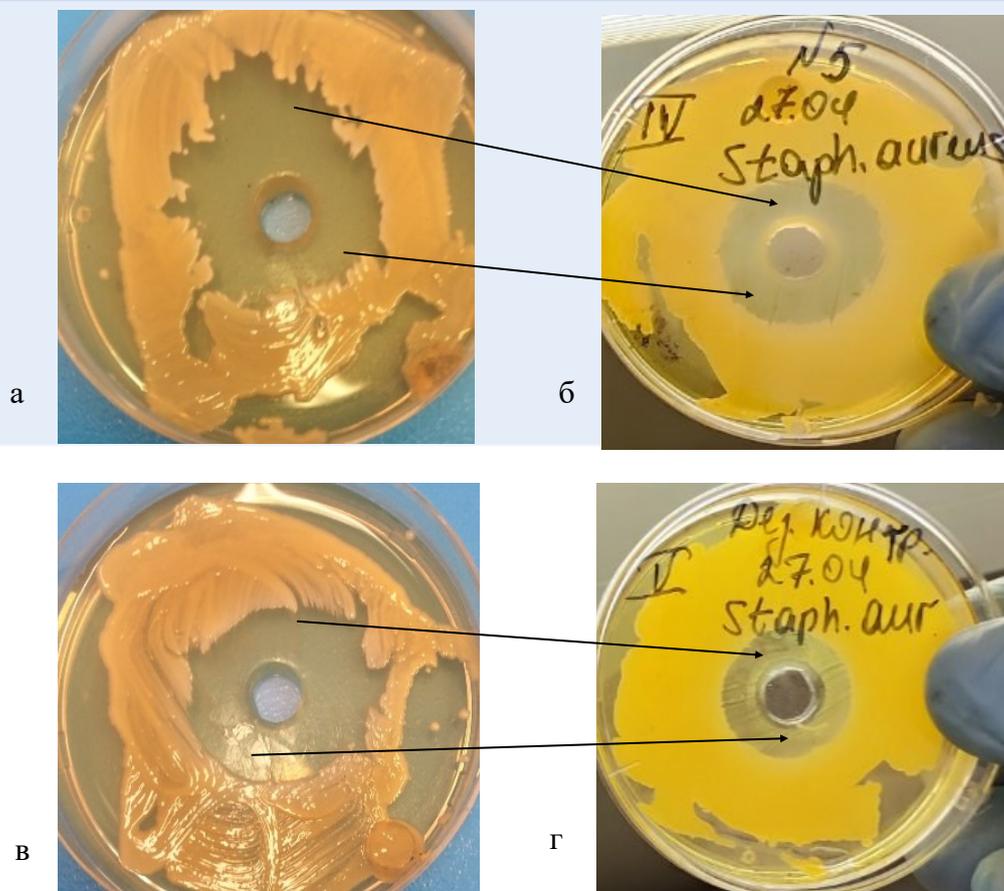
а – эффективность обеззараживания;
б – рост в контроле

Рисунок 2. – Поверхность, загрязненная *Mycobacterium bovis* под органической защитой, 3%-ная композиция № 5 при экспозиции 30 минут

При продолжении культивирования (до 31 дня) колонии увеличивались в размерах. В целом эффективность действия композиции № 5 в 3%-ной концентрации составила 88,8 %.

При изучении формирования резистентности тест-штамма к композиции № 5 в концентрации 1 % в сравнении с кон-

трольным хлорсодержащим дезинфектантом «Профит» в концентрации 1 % установлено, что при 4-кратном контакте эффективность действия композиции № 5 на *Staph. aureus* снижалась на 4,8 %, а у контрольного дезинфектанта – на 10 % (рисунок 3, таблица 8).



а – I; б – II; в – III; г – IV

Рисунок 3. – Результаты пассажа в диффузионном тесте для сравнения скорости формирования резистентности *Staph. aureus* к дезинфектантам в 1%-ной концентрации

Таблица 8. – Формирование резистентности стафилококков к дезинфектантам в диффузионном тесте (диаметры зон задержки роста в мм)

Дезинфектанты, 1 %	Пассаж			
	I	II	III	IV
Композиция № 5	21	19,5	25	20
«Профит» (контроль)	21	20	20	18

Вместе с тем, если дезинфектанты использовались в меньшей концентрации (0,5 %), то уже 3-кратный контакт с ними

приводил к развитию резистентности у *Staph. aureus* (таблица 9).

Таблица 9. – Результаты диффузионного теста при определении скорости формирования резистентности стафилококков к композициям № 2 и № 5 в концентрации 0,5 % (зоны задержки роста в мм)

Пассаж	Номер композиции	
	№ 2	№ 5
I	34	31
II	18	23
III	19	22
IV	15	21
V	12	19

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что бактерицидная эффективность теотропина невысока. В концентрации 0,5–0,75 % он действует бактериостатически, а в 1%-ной концентрации – бактерицидно, но эффект проявляется через 16–18 ч [5]. В изученных вариантах композиций действие теотропина усиливалось добавлением ЧАС. В результате они оказывали бактерицидное действие уже при концентрации теотропина 0,2–0,51 %, причем эффект проявлялся уже через 10 минут, в том числе и при наличии органической защиты.

Сравнение вариантов композиций показало, что без ущерба бактерицидному действию можно отказаться от введения в состав головной фракции этилового спирта и диметилсульфоксида, но усилить его введением поверхностно-активного вещества (композиция № 5).

Наряду с установленным действием на бактерии, композиции на основе теотропина оказывали выраженное действие на представителей дерматомицетов, даже в 0,25%-ной концентрации.

Дезинфицирующая композиция на основе теотропина № 5 уже в 2%-ной кон-

центрации при 30-минутном контакте бактериостатически действовала на микобактерии туберкулеза бычьего вида, а в 3%-ной концентрации обеспечивала 88,8%-ную инактивацию их популяции на поверхностях с органической защитой. Для достижения 100%-ного микобактерицидного эффекта необходимы дополнительные исследования с использованием более высоких концентраций рабочих растворов и увеличении доли ПАВ для разрушения кластеров микобактерий.

Важно, что к 1%-ным дезинфицирующим композициям на основе теотропина тенденция роста резистентности микрофлоры нарастала гораздо медленнее, чем к контрольному хлорсодержащему дезинфектанту, но этот эффект проявлялся в меньшей степени при использовании 0,5%-ного рабочего раствора.

Результаты исследований показали, что оптимальный вариант дезинфицирующей композиции на основе теотропина может быть использован в качестве нового дезинфицирующего средства для объектов ветеринарного надзора.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Влияние длительного периода эксплуатации животноводческих помещений на микробиологическое состояние объекта / Ю. Г. Лях [и др.] // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2004. – № 4. – С. 10–11.
2. Тарасов, И. И. Анализ микробиологических аспектов дезинфекции / И. И. Тарасов // Ветеринарная медицина. – 2011. – 95. – С. 430–431.
3. Высоцкий, А. Э. Сравнительная биоцидная активность дезинфектанта «Сандим-Д» / А. Э. Высоцкий // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии: сб. науч. тр. ВНИИВСГЭ. Т. 117. – М., 2006. – С. 176–182.
4. Шандала, М. Г. Новые дезинфекционные технологии для профилактики инфекционных болезней / М. Г. Шандала // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2006. – № 4. – С. 15–17.
5. Изучение бактерицидного и бактериостатического действия теотропина на микроорганизмы различной морфологической структуры / Д. А. Васильев // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. Научно-теоретический журнал. – 2011. – № 1(13). – С. 75–79.

УДК 615.918:582.28

Кучинский М.П., доктор ветеринарных наук, профессор
Крашевская Т.П., кандидат биологических наук, доцент
Кучинская Г.М., научный сотрудник

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

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ МИКОТОКСИНОВ В РАЦИОНАХ ЖИВОТНЫХ (ОБЗОР)

Резюме

В статье представлен обзорный материал по уровню контаминации микотоксинами кормов животных. Приведены сведения о возможностях лабораторной практики при выявлении и оценке уровня различных микотоксинов в кормах. Приведены наиболее перспективные адсорбенты из группы биологических методов снижения уровня микотоксинов в кормах животных.

Ключевые слова: микотоксины, контаминация кормов микотоксинами, методы детоксикации кормов, неорганические адсорбенты, органические адсорбенты, комплексные адсорбенты.

Summary

The article provides an overview of mycotoxin contamination of animal feed. The article includes information on the modern laboratory methods to identify and assess the degree of various mycotoxins' contamination. The most promising adsorbents of the group of the biological methods used to reduce the degree of mycotoxins in animal feed are presented.

Keywords: mycotoxins, contamination of animal feed with mycotoxins, methods of detoxication of animal feed, nonorganic adsorbents, organic adsorbents, compound adsorbents.

Поступила в редакцию 12.12.2023 г.

В связи с рядом причин, доминирующей из которых является глобальное изменение климата, в последние годы значительно ухудшились условия сбора и хранения урожая. Следствием этого стал тот факт, что зерно и другие сельскохозяйственные культуры всё чаще идут на корм животным пораженными микроскопическими грибами. Микотоксины, продуцируемые микроскопическими грибами, начинают доминировать среди природных за-

грязнителей продовольственного и сельскохозяйственного сырья, что представляет собой серьезную угрозу для здоровья населения и животных. Согласно данным FAO (Food and Agriculture Organization), более 25 % производимого в мире зерна подвергается загрязнению микотоксинами. До 36 % всех заболеваний в развивающихся странах прямо или косвенно связаны с микотоксинами [4, 14].

Учитывая широкое распространение плесневых грибов и того, что ряд микотоксинов способен вызывать серьезные морфофункциональные изменения в организме человека и животных, важное значение придается современным методам определения их содержания, в том числе и экспресс-методам. Значительное внимание этой проблеме уделяют ведущие разработчики аналитического оборудования и крупные международные организации, такие как IUPAC, AOAC International и IFJU, специализированные национальные организации стран ЕС и США, а также научные центры и профильные министерства многих стран мира [1, 13].

К настоящему времени установлено свыше 400 микотоксинов. Например, компания Waters Corp. разработала эффективные методы определения 33 микотоксинов в образцах кормов для сельскохозяйственных животных. В лаборатории фирмы Alltech Inc. к настоящему времени определяют 54 микотоксина и их метаболита. В этот перечень входят афлатоксины (B_1 , B_2 , G_1 , G_2), охратоксины (А, В), цитринин, трихотеценовые микотоксины типа В (ДОН, 15-ацетил ДОН, 3-ацетил ДОН, фузаренон Х, ниваленол, ДОН-3-глюкозид), трихотеценовые микотоксины типа А (Т-2 токсин, НТ-2 токсин, диацетоксисцирпеннол, неосоланиол), фумонизины (B_1 , B_2 , B_3), зеараленон, фузариевая кислота, а также микотоксины, продуцируемые грибами родов *Penicillium* (патулин, пеницилловая кислота, вортманнин, рокефортин С, микофеноловая кислота), *Aspergillus* (глиотоксин, стеригматоцистин, веррукулоген), алкалоиды спорыньи и группа так называемых «новых» микотоксинов (фузапролиферин, боверицин, энниатин А и В, монилиформин А, кульморин, бутенолид, альтернариол, эмодин, микофеноловая и тенуазоновая кислоты), которые продуцируют различные плесневые грибы, в том числе родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* и *Fusarium* [6, 18]. Американская фирма Phenomenex Inc. сообщила о возможности оценки в пищевых продуктах 243 микотоксинов на основе жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией. Специалисты исследовательского центра компании BIOMIN Holding GmbH в своих научных исследованиях выделяют

139 различных микотоксинов и некоторые их метаболиты [27].

Во многих странах мира установлены максимально допустимые уровни микотоксинов для кормовых культур, зерна и другого сырья для производства комбикормов и кормовых добавок, готовой продукции спиртового производства, комбикормовой, сахарной, пивоваренной и маслобойной промышленности. Такие уровни приняты и в Республике Беларусь. В нашей стране исследования пищевого сырья, кормов и кормовых добавок на сегодняшний день ограничиваются определением содержания шести микотоксинов: зеараленона, фумонизина B_1 , ДОН, Т-2 токсина, афлатоксина B_1 и охратоксина А.

В то же время результаты исследований 55 образцов зерна, сенажа и силоса, отобранных специалистами компании Alltech 37+ в августе-ноябре 2020 г. в хозяйствах Республики Беларуси, России и Казахстана, показали, что 99,6 % из их были контаминированы вторичными метаболитами грибов, причем абсолютное большинство образцов (96,4 %) содержали два и более вида микотоксинов при среднем их количестве в одном образце 5,5. При этом доля образцов с двумя микотоксинами достигала 10,9 %, тремя – 29,1, четырьмя – 10,9, пятью и восемью – по 5,5, шестью – 20, семью – 14,5 %. При этом наибольшее количество микотоксинов, одновременно присутствующих в одной пробе, было обнаружено не в зерне, а в сенаже и силосе [6, 12].

О широком распространении множественной контаминации кормов для животных вторичными метаболитами грибов свидетельствуют и данные, полученные в том же 2020 г. при исследовании 274 проб пшеницы, тритикале, овса, сои, кукурузы, гороха, кукурузного силоса и подсолнечного шрота, отобранных на фермах и производственных площадках 15 стран ЕС. Результаты лабораторного анализа показали, что 96 % всех проанализированных образцов содержали два и более микотоксина, среди которых преобладали «новые» микотоксины, при этом в каждой пробе выявлено в среднем 4,4 вторичных метаболитов грибов [6].

Основное отрицательное влияние микотоксинов на организм животных свя-

зано прежде всего с их способностью ингибировать синтез нуклеиновых кислот и белка, что, в свою очередь, ведет к замедлению роста, развития, снижению продуктивности, воспроизводительной способности, уровня иммунной защиты, антиоксидантного статуса и снижению устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды [5]. К микотоксинами особенно чувствительны высокопродуктивные животные, отличающиеся интенсивным обменом веществ, поэтому при загрязнении микотоксинами кормов, предназначенных для таких животных, возможно развитие острого отравления [21, 25].

Следует отметить, что на практике чаще приходится сталкиваться с ситуацией, когда количество микотоксинов в кормах не превышает допустимые уровни, но за счет способности к кумуляции и синергического влияния, а также неблагоприятного воздействия стрессов и других факторов внешней среды у животных возникают хронические субклинические микотоксикозы, которые наносят гораздо больший экономический ущерб, чем острые формы.

Микотоксины, угнетая иммунитет, снижают эффективность вакцинации и являются одной из основных причин широкого распространения инфекционных заболеваний животных [4, 21].

Несмотря на актуальность проблемы микотоксикозов сельскохозяйственных животных, в нашей стране часто недооцениваются негативные последствия данных заболеваний, а также отсутствуют эффективные мероприятия по их профилактике.

В зависимости от вида воздействия методы снижения концентрации микотоксинов в кормах животных классифицируются как физические, химические и биологические.

К физическим методам снижения концентрации микотоксинов относят использование СВЧ и УФ-облучения, гранулирование кормов, автоклавирование, проваривание и пропаривание кормового сырья, а также его обработка холодной плазмой [2, 4, 7, 28]. Согласно результатам последних исследований наиболее эффективным для снижения уровня микотоксинов в сырье и корме является обработка сырья ионизирующими излучениями [7].

Среди химических методов снижения концентрации микотоксинов выделяют

использование для детоксикации кормового сырья пероксида натрия, биосульфита натрия, аммиака, озона, едкого натра, негашеной извести, кальцинированной соды, пиросульфита натрия (калия) и перекиси натрия. Для каждого из вышеприведенных веществ, вступающих в химические реакции с микотоксинами и тем самым в той или иной мере снижающих их количество, разработаны рекомендации и методики эффективного использования [4, 14, 26, 28].

Поскольку большинство физических и химических методов детоксикации кормов и кормового сырья дорогостоящие, требуют больших производственных затрат, зачастую отрицательно влияют на показатели качества кормов и незначительно снижают количество микотоксинов, в нашей стране широкое распространение получило применение биологических методов снижения уровня микотоксинов [2, 25, 26].

К биологическим методам относят обработку кормов и кормового сырья живыми бактериальными культурами, ферментными препаратами, а также использование микотоксинсвязывающих компонентов различного происхождения. Связывание и выведение микотоксинов при этом происходит в пищеварительном тракте животных. Используя специализированные препараты, можно вывести из организма сельскохозяйственных животных 30–40 % и даже до 70 % различных токсинов. Специализированные добавки рекомендуется скармливать животным постоянно в качестве профилактического средства в количестве от 0,2–0,5 до 2 % от рациона [7, 15, 16, 22].

По своему происхождению адсорбенты микотоксинов делятся на минеральные (неорганические), органические и комплексные.

К адсорбентам на основе минералов относятся цеолиты, бентониты, алюмосиликаты, диатомиты, трепел, шунгит, перлит и другие. Адсорбирующий эффект минеральных компонентов таких препаратов основан на взаимодействии молекул токсинов с кристаллической решеткой природного или синтетического адсорбента, в результате чего происходит захват и выведение микотоксинов из пищеварительного тракта. Использование таких адсорбентов эффективно против афлатоксинов (B_1 , B_2 ,

G₁, G₂) и фумонизина [9]. Адсорбенты минерального происхождения отличаются низкой ценой, но некоторые из них способны оказывать негативный эффект посредством связывания в организме животных витаминов, аминокислот и ферментов [3, 16].

Цеолиты – группа минералов на основе алюминия или кремния. Цеолиты добавляют в корм молодняку из расчета 1 %, а взрослым животным – 2–3 % от массы сухого корма. Цеолиты особенно эффективны для детоксикации корма, содержащего зеараленон. В комбикорм, содержащий в 1 кг до 1 мг афлатоксина, добавляют 3–4 % цеолита [20].

Бентониты – это природные минеральные комплексы, содержащие несколько десятков биологических элементов и обладающие при этом высокими адсорбционными, катализирующими, ионообменными и связующими свойствами. Установлено, что бентонитовые глины в дозировке до 2 % от рациона, используемые в качестве детоксикантов микотоксинов плесневых грибов, проявляют выраженную адсорбционную активность при смешанных микотоксикозах животных и птицы [16, 20].

Алюмосиликаты (вермикулит) – алюмокремневые солеобразные соединения, которые вносятся в корма для сельскохозяйственных животных из расчета 0,5–1 % от массы сухого корма. Алюмосиликаты способны избирательно связывать афлатоксины.

Одними из лучших среди неорганических адсорбентов считают гидратированные натрий-кальций-алюмосиликаты (*HSCAS*). Адсорбционная ёмкость данных адсорбентов в отношении афлатоксинов составляет около 60–70 мг/г (в то время как у природных бентонитов данный показатель достигает только 9 мг/г) [17, 22].

Трепел – природный цеолит, обладающий сорбционными свойствами и антибактериальным действием. Значительное влияние трепел оказывает на снижение накопления в кормах ДОН – около 70 %, афлатоксина – на 14–16 % и Т-2-токсина – на 20–22 %. На накопление патулина и зеараленона трепел существенно не влияет. Рекомендуемые нормы смешивания трепела с различными видами кормов для снижения уровня микотоксинов, в расчете на

1 кг корма, следующие: сено, зерновые концентраты – 17 г, жмыхи, шроты, травяная мука – 18 г, силос – 5–6 г, сенаж – 10–12 г [23].

В животноводстве Республики Беларусь наиболее широкое применение нашел трепел месторождения «Стальное» Хотимского района Могилевской области, включающий в себя пять фракций кальцита, монтмориллонита, цеолита, рентгеноаморфного опала и опал-кристобалита. Кальцит в породе присутствует постоянно, его содержание варьирует в пределах 15–34 %. Благодаря высокому уровню кальцита трепел данного месторождения относится к известковому типу с весьма равномерным распределением кремневой, глинистой и карбонатной составляющих и значительным содержанием цеолитов (до 25 %). На основе трепела данного месторождения были разработаны комплексная добавка-сорбент «МеКаСорб», в которой трепел обогащен кормовыми дрожжами и ферментом фитазой, а также адсорбент микотоксинов «Беласорб» содержащий трепел, автолизированные пивные дрожжи, лактулозу и/или сухую послеспиртовую барду [11, 19].

С целью усиления эффективности адсорбентов этой группы зачастую в их состав включают несколько минеральных компонентов. Так, например, добавка для контроля микотоксинов «Токсфин сухой» (компания «Kemin») представляет собой комплекс, состоящий из бентонита (48,9–50,9 %) и сепиолита (39,0–41,0 %), при этом сорбционная емкость препарата по афлатоксину В₁ составляет не менее 95 % [9, 17].

К *органическим сорбентам* микотоксинов относят, прежде всего компоненты клеточной стенки дрожжей (чаще всего *Saccharomyces cerevisiae*), представленные такими полисахаридами, как глюканы и маннаны, называемые также этерифицированными глюкоманнанами (EGM) [16, 18]. Их отличает высокая скорость адсорбции, что имеет особенно важное значение при развитии острых микотоксикозов. К препаратам из клеток водорослей и глюканов дрожжевых клеток относится нейтритизатор токсинов «Микосорб+» (компания «Alltech»). Компоненты инактивированных клеточных стенок дрожжей и водо-

рослей частично способны связывать неполярные микотоксины (в том числе зеараленон, фумонизин, трихотецены) [9, 17, 27].

В качестве органических продуктов также используются хитозан, пектины, лигнин и другие вещества, действующие в организме как сорбенты, имеющие свойство связывать токсичные метаболиты различной природы. Адсорбирующими свойствами также обладает биомасса мицелиальных грибов и бактерий, например лактобактерий. Такие компоненты способны связывать широкий спектр микотоксинов. К органическим сорбентам также относят грибы рода *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Eurotium Herbariorum*, *Penicillium*, инактивирующие токсины за счет оригинального механизма действия, а также дрожжи *Trichosporon mycotoxinivorans* и *Phaffia rhodozyma*, используемые в некоторых коммерческих препаратах [21].

В последнее время в животноводстве шире стали использоваться комплексные, в том числе минерально-органические адсорбенты. Данные добавки отвечают современным требованиям к производству и содержат высокотехнологичные компоненты, такие как модифицированные слоистые сорбенты, состоящие из минеральной части, и клеточные стенки дрожжей и водорослей. Адсорбенты данной группы обладают очень высокой сорбционной емкостью и способны связывать свыше 90 % афлатоксинов, свыше 60 % – ДОН и Т-2, а также не менее чем 55 % охратоксинов [9, 10, 17, 24].

В комплексных минеральных адсорбентах может сочетаться сразу несколько компонентов. Например, в кормовых добавках «Кормо-Токс Плюс» (компания «Chemopharma») и «ХаруФикс+» («Нару Pharm») содержатся алюмосиликаты, каолиниты и экстракт дрожжевой культуры *Saccharomyces cerevisiae*. В состав препарата «БиоТокс» («Biochem») входят синтетические силикаты кальция, натрия, осажденная кремниевая кислота и инактивированные дрожжи в сухой форме. Кормовая добавка «Карбитокс» («Агроакадемия») содержит в составе алюмосиликаты, жом свекловичный ферментированный, комплекс живых спорообразующих штаммов *Bacillus subtilis* [9]. Вышеозначенные добавки обладают высокой сорбционной

емкостью по афлотоксинам, Т-2 токсину, ДОН, зеараленону и охратоксину.

Комплексные адсорбенты могут включать и другие вещества, расширяющие их спектр действия, создающие оптимальные условия для адсорбции микотоксинов, улучшающие функцию печени и кишечника, стимулирующие обмен веществ и снижающие стрессовую нагрузку (витамины, аминокислоты, бутираты и др.). Так, например, в «Биосорб Органик» («Daavision BV») и «Токсаут Форте» («BioTech») входит бетаин, который применяется в качестве частичной замены метионина и холина в рационе и одновременно играет роль защиты печени от проникновения микотоксинов из кишечника в кровотока.

В качестве вспомогательных компонентов в комплексные препараты некоторые производители добавляют эфирные масла и фитодобавки. Так, препарат «Мастерсорб GOLD» («GRASP»), помимо алюмосиликатов кальция и натрия, а также дрожжевых клеток, содержит силимарин (экстракт расторопши) – сильный детоксикант и антиоксидант. Препарат «Микофикс-селект 3.Е» (компания «Biomim») также содержит экстракт расторопши [21].

Элиминатор микотоксинов «Эли-токс» (компания «Импекстрако») содержит в своем составе органические и минеральные адсорбенты, растительные экстракты, витамин С и микотоксиннейтрализующие специфические ферменты, поэтому способен не только адсорбировать микотоксины, но и оказывает гепатопротекторное и антиоксидантное действия [8].

В состав нейтрализаторов микотоксинов могут входить органические кислоты, как, например, препарат «АтоксБио Плюс» («ТекноФид»). Гуминовые кислоты и фумаровую кислоту содержит препарат «Микософт» (НПЦ «АгроСистема»).

Что касается эффективности имеющихся на рынке адсорбентов, то следует сослаться на результаты независимых исследований, в которых были смоделированы условия, приближенные к желудочно-кишечному тракту животных. Они показали, что даже самые широко применяемые органические сорбенты известных мировых производителей способны одновременно связывать лишь чуть более 50 % основных микотоксинов [3].

Одним из способов биологической борьбы с микотоксинами является использование в рационах животных *пробиотиков*, обладающих противогрибковым действием. Ферменты некоторых штаммов *B. subtilis* способны частично трансформировать трихоценовые токсины ДОН и Т-2 токсин до нетоксических форм, которые выводятся из организма через почки, а также продуцируют в желудочно-кишечном тракте животных аминокислоты и витамины. *T. mycotoxinivorans* выделяют вещества для нейтрализации охратоксина и зеараленона. Некоторые бактерии могут продуцировать антибиотики полипептидной природы для подавления роста грибов и частичного расщепления их гифов и токсинов [18].

С учетом того, что многие микотоксины способны существенно нарушать витаминно-минеральный обмен, с целью повышения устойчивости организма животных и нормализации метаболизма целесообразно применять препараты на основе витаминов и биоэлементов («КМП», «КМП Плюс», «Микровит SA», «Мультивит»,

«Витамин E+Se», «Седиминум плюс» и др.), руководствуясь при этом инструкциями к их применению [15].

Таким образом, использование биологических методов снижения содержания микотоксинов в рационах сельскохозяйственных животных является биологически эффективным и экономически целесообразным. При выборе адсорбента следует обращать внимание на его состав и учитывать фактическую контаминацию сырьевых ингредиентов и готовых комбикормов микотоксинами, а также вид животных.

Также следует отметить, что зачастую на сельскохозяйственных предприятиях в качестве борьбы с микотоксинами ограничиваются лишь введением в рацион животных адсорбентов. Однако практика показывает, что успешной профилактика микотоксикозов может быть только при осуществлении комплекса мероприятий, направленных на устранение или сведение до минимума уровней микотоксинов в кормах на всех этапах их приготовления, транспортировки, хранения и скармливания животным.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Агольцов, В. А. Микология и микотоксикология в ветеринарии и зоотехнии : монография / В. А. Агольцов, О. М. Попова, С. В. Ларионов. – Саратов : Приволжская книжная палата, 2015. – 240 с.
2. Антипов, В. А. Система мероприятий по профилактике микотоксикозов животных и птиц / В. А. Антипов, В. В. Васильев // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2009. – № 9. – С. 18–21.
3. Адамс, Н. Эффективность одновременного связывания нескольких микотоксинов различными адсорбентами в условиях модели желудочно-кишечного тракта *in vitro* / Н. Адамс // Животноводство России. – 2020 (июнь). – С. 56–60.
4. Белявский, В.Н. Токсикология. Микотоксикозы: учеб.-метод. пособие / В. Н. Белявский, М. П. Кучинский. – Гродно : ГГАУ, 2022. – 122 с.
5. Безбородова, Н. А. Влияние микотоксинов на иммунную и антиоксидантную систему организма сельскохозяйственных животных / Н. А. Безбородова, М. А. Суздальцева, М. Г. Хачатрян // Материалы междунар. науч.-практ. конф., посвященной 100-летию со дня рождения д.в.н, профессора Кабыша А.А. – Троицк : Южно-Уральский государственный аграрный университет, 2017. – С. 35–42.
6. Борутова, Р. Микотоксины: беспечность недопустима. Исследования образцов кормового сырья растительного происхождения (урожай 2020 г.) / Р. Борутова // Животноводство России. – 2021 (март). – С. 26–30.
7. Брагинец, С. В. Физические методы снижения содержания микотоксинов в кормах и их применение в комбикормовой промышленности / С. В. Брагинец, О. Н. Бахчевников // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2021. – № 22(1). – С. 32–46.
8. Брылина, В. Сочетание стратегий для эффективной борьбы с микотоксикозами / В. Брылина, М. Брылина // Комбикорма. – 2021. – № 2. – С. 63–67.
9. Бурдаева, К. Рынок российских адсорбентов микотоксинов в 2023 году / К. Бурдаева // «Ценовик». Сельскохозяйственное обозрение. – 2023. – № 6. – С. 25–30.

10. Герунова, Л. К. Профилактика микотоксикозов в животноводстве / Л. К. Герунова, В. И. Герунов, Д. В. Корнейчук // Вестник Омского государственного аграрного университета. – 2018. – № 3(31). – С. 36–43.
11. Использование минерального адсорбента трепела в рационах высокопродуктивных коров основного периода лактации / А. И. Козинец [и др.] // Зоотехническая наука Беларуси. – 2011. – № 46(2). – С. 55–63.
12. Козинец, А. И. Оценка уровня поражения микотоксинами комбикормов и их компонентов в Республике Беларусь / А. И. Козинец // Зоотехническая наука Беларуси. – 2022. – № 57(1). – С. 210–219.
13. Кононенко, Г. П. Достижения и перспективы аналитических исследований в микотоксинологии / Г. П. Кононенко, А. А. Буркин // Труды Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2003. – Т. 115. – С. 157–172.
14. Кузнецов, А. Ф. Ветеринарная микология / А. Ф. Кузнецов. – СПб. : Лань, 2001. – 416 с.
15. Кучинский, М. П. Современные проблемы контаминации кормов микотоксинами и подходы к профилактике микотоксикозов животных / М. П. Кучинский, Г. М. Кучинская // Экология и животный мир. – 2023. – № 1. – С. 45–50.
16. Лавренова, В. Микотоксины и способы борьбы с ними / В. Лавренова // «Ценовик». Сельскохозяйственное обозрение. – 2017. – № 8. – С. 45–56.
17. Лавренова, В. Корма и кормовые добавки / В. Лавренова // «Ценовик». Сельскохозяйственное обозрение. – 2018. – № 8. – С. 37–42.
18. Лавренова, В. Меры профилактики микотоксикозов животных в России / В. Лавренова // Агро-Матик [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://agro-matik.ru/press/info-spec/meru-profilaktiki-mikotoksikozov-zhivotnyh/>. – Дата доступа: 11.12.2023.
19. Надаринская, М. А. Трепел месторождения «Стальное» в рационах крупного рогатого скота / М. А. Надаринская, А. И. Козинец // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сб. науч. тр. – Гродно, 2013. – Т. 2. – С. 127–134.
20. Петрушина, М. В. Влияние Хотынецких цеолитов и лецитина на физиолого-биохимический статус высокоудойных коров при промышленном содержании / М. В. Петрушина // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2010. – № 5.
21. Попов, В. С. Проблемы микотоксикозов в современных условиях и принципы профилактических решений : монография / В. С. Попов, Н. В. Самбуров, Н. В. Воробьева. – Курск : Планета+, 2018. – 158 с.
22. Попова, С. А. Микотоксины в кормах: причины, последствия, профилактика / С. А. Попова, Т. И. Скопцова // Известия Великолукской ГСХА. – В. Луки, 2017. – № 1. – С. 16–23.
23. Применение кормового трепела в рационах коров / Н. С. Яковчик [и др.] // Актуальные проблемы устойчивого развития сельских территорий и кадрового обеспечения АПК: материалы Междунар. науч.-практ. конф. / Белорусский государственный аграрный технический университет. – Минск : БГАТУ, 2021. – С. 277–283.
24. Пчелкина, А. А. Лечение и профилактика микотоксикозов животных / А. А. Пчелкина // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2009. – № 10. – С. 15–17.
25. Рябчик, И. Микотоксикозы: профилактика и лечение / И. Рябчик // Животноводство России. – 2013. – № 9. – С. 56–57.
26. Семенов, Э. И. Методические рекомендации по диагностике, профилактике и лечению микотоксикозов животных / Э. М. Семенов, М. Я. Тремасов, К. Х. Папуниди. – М. : ФГБНУ «Росинформагротех», 2017. – 68 с.
27. Сотниченко, А. Неполярные токсины в кормах. Стратегия борьбы / А. Сотниченко, В. Оханов // Комбикорма. – 2016. – № 1. – С. 110–113.
28. Чулков, А. К. О профилактике микотоксикозов животных / А. К. Чулков, М. Я. Тремасов, А. В. Иванов // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2009. – № 9. – С. 11–14.

В журнале «Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария» № 1/2023 г., в опубликованной статье «Эпизоотическая ситуация по инфекционным болезням животных в мире и Республике Беларусь и стратегия борьбы с ними» (авторы Максимович В.В., Гайсенюк С.Л., Гайсенюк Е.Л.) изложена недостоверная информация о заболеваемости людей бешенством в Республике Беларусь в последние годы. Вместо слов: «За последние 8 лет в республике заболело бешенством и умерло 8 человек» (страница 13, 3 абзац снизу, строка 20) следует читать: «В республике с 2012 года случаи заболевания людей бешенством не регистрируются».

А также требует уточнения пункт 6, страница 13. Его необходимо изложить в следующей редакции: «Проведение среди населения разъяснительной работы об опасности заболевания бешенством и мерах его предупреждения. Минздравом организована и проводится информационно-образовательная работа по профилактике бешенства среди населения с использованием всех доступных методов и средств: проведение бесед, лекций, выступление по радио и телевидению, проведение семинаров, публикации в печатных изданиях, распространение наглядных печатных материалов. Для систематизации принимаемых мер на уровне Правительства утвержден и реализуется Комплексный план мероприятий по профилактике бешенства в Республике Беларусь в 2021–2025 годах.»

Авторы статьи приносят извинения за предоставление недостоверной информации.



ПРЕПАРАТ ВЕТЕРИНАРНЫЙ

МИКРОВИТ SA



**ПРИМЕНЯЕТСЯ
КРУПНОМУ
РОГАТОМУ
СКОТУ И
СВИНЬЯМ**

- ▶ для стимуляции и нормализации половой функции
- ▶ при патологических состояниях, сопровождающихся снижением иммунореактивности организма и нарушением обмена веществ

- ▶ для профилактики эмбриональной смертности, гипоксии плода, послеродовых осложнений, сокращения сервис-периода, восстановления процесса овуляции у коров, повышения резистентности организма

WWW.BIEVM.BY



**Уважаемые
коллеги,
дорогие друзья!
Примите искренние
поздравления
с Новым 2024 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!

