

МЕЖДУНАРОДНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
Выпускается с 2004 года

ISSN 2224-168X
ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС: 00802
008022

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

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

Борисовец Д.С. – кандидат ветеринарных наук, доцент, Республика Беларусь

ЗАМ. ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Насонов И.В. – доктор ветеринарных наук, профессор, Республика Беларусь

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ:

Стрельченя И.И. – кандидат ветеринарных наук, доцент, Республика Беларусь

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Щемелева Н.Ю. – кандидат ветеринарных наук, доцент, Республика Беларусь;

Каменская Т.Н. – кандидат ветеринарных наук, доцент, Республика Беларусь;

Андрусевич А.С. – кандидат ветеринарных наук, доцент, Республика Беларусь;

Новикова О.Н. – кандидат ветеринарных наук, доцент, Республика Беларусь;

Зуйкевич Т.А. – кандидат сельскохозяйственных наук, Республика Беларусь;

Белькевич И.А. – кандидат ветеринарных наук, Республика Беларусь;

Архипова Н.В. – кандидат ветеринарных наук, Республика Беларусь;

Василевич Ф.И. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, Российская Федерация;

Гулюкин А.М. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, Российская Федерация;

Забережный А.Д. – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Российская Федерация;

Карпенко Л.Ю. – доктор биологических наук, профессор, Российская Федерация;

Красочко П.А. – доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор, Республика Беларусь;

Красочко И.А. – доктор ветеринарных наук, профессор, Республика Беларусь;

Лысенко А.П. – доктор ветеринарных наук, профессор, Республика Беларусь;

Малашко В.В. – доктор ветеринарных наук, профессор, Республика Беларусь;

Паршин П.А. – доктор ветеринарных наук, профессор, Российская Федерация;

Стекольников А.А. – доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, Российская Федерация;

Шабунин С.В. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, Российская Федерация;

Ятусевич А.И. – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, Республика Беларусь;

Соляник А.В. – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, Республика Беларусь;

Тимошенко В.Н. – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, Республика Беларусь

НАД НОМЕРОМ РАБОТАЛИ:

Ларькова А.Е.

Лукьянова И.А.

Пуныко С.Г.

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

Все статьи рецензируются

Редакция не несет ответственности за возможные неточности, допущенные авторами. Мнение редакции может не совпадать с мнением авторов

© «Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария», 2025

СОДЕРЖАНИЕ**ЭПИЗООТОЛОГИЯ**

Щемелева Н.Ю., Леонтьева Л.В. НОДУЛЯРНЫЙ ДЕРМАТИТ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (ОБЗОР) 3

ИММУНОБИОЛОГИЯ

Щемелева Н.Ю., Василькова В.П., Романчик И.А. ОСОБЕННОСТИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ БЛАСТОЦИСТОЗА У ТЕЛЯТ 8

Каяк Ю.А. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ НОРОК ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ БИОПРЕПАРАТОМ «КОВПАСТ» 14

Тяпша Ю.И., Дубаневич О.В. ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* И *MYCOPLASMA BOVIS* В СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ *E. COLI* И ОЦЕНКА ИХ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ 18

Красочко П.П., Красочко В.П., Зубовская И.В., Черноков А.И. ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ И ОПТИМИЗАЦИЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *MORAXELLA BOVIS* И *MORAXELLA BOVOCULI* 23

Борисовец Д.С., Родригез-Маллон А.А., Тяпша Ю.И., Згировская А.А., Герасименко В.И. РАБОТКА ИФА-ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ 29

Красочко П.П., Борисовец Д.С., Кайсюань Би МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ 36

ФАРМАКОЛОГИЯ

Костюк Н.И., Кулешова Ю.М., Острикова К.В., Потапович М.И., Прокулевич В.А. ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ БЫЧЬИХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ИНТЕРФЕРОНОВ *IN VITRO* 41

Омар Хуссейн Али, Малашко В.В. ПРОДУКТИВНОСТЬ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ В ЛЕТНИЙ ПЕРИОД ВЫРАЩИВАНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИКА «ПРОМОИС» 47

САНИТАРИЯ

Каменская Т.Н., Лукьянчик С.А., Тучковская А.В., Шабловский В.О., Пап О.Г., Борсук Н.Г. ПОДБОР КОМПОЗИЦИЙ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ПОРОШКОВОГО ДЕЗИНФЕКТАНТА И ИЗУЧЕНИЕ БИОЦИДНЫХ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАИБОЛЕЕ ПЕРСПЕКТИВНОГО ОБРАЗЦА 56

CONTENTS**EPIZOOTOLOGY**

Shchemeleva N.Yu., Leontyeva L.V. BOVINE NODULAR DERMATITIS (OVERVIEW) 3

IMMUNOBIOLOGY

Shchemeleva N.Yu., Vasilkova V.P., Romanchik I.A. FEATURES OF IMMUNOBIOLOGICAL MANIFESTATION OF BLASTOCYSTOSIS IN CALVES 8

Kayak Yu.A. HEMATOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL INDICATORS IN MINK AFTER VACCINATION WITH «KOVFAST» BIOPREPARETE 14

Tyapsha Yu.I., Dubanevich O.V. OBTAINING PRODUCER STRAINS OF RECOMBINANT PROTEINS OF *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* AND *MYCOPLASMA BOVIS* IN THE *E. COLI* EXPRESSION SYSTEM AND EVALUATION OF THEIR ANTIGENIC PROPERTIES 18

Krasochko P.P., Krasochko V.P., Zubovskaya I.V., Chernokov A.I. PRIMER SELECTION AND MULTIPLEX PCR OPTIMIZATION FOR *MORAXELLA BOVIS* AND *MORAXELLA BOVOCULI* DETECTION 23

Borisovets D.S., Rodriguez-Mallon A.A., Tyapsha Yu.I., Zgirovskaya A.A., Gerasimenko V.I. DEVELOPMENT OF ELISA-DIAGNOSTICUM FOR DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES TO AFRICAN SWINE FEVER VIRUS 29

Krasochko P.P., Borisovets D.S., Kaixuan Bi MOLECULAR GENETIC DIAGNOSIS OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME 36

FARMACOLOGY

Kostyuk N.I., Kuleshova Y.M., Vostrykava K.V., Pataпович M.I., Prakulevich U.A. EVALUATION OF THE ANTIVIRAL ACTIVITY OF BOVINE RECOMBINANT INTERFERONS *IN VITRO* 41

Omar Hussein Ali, Malashko V.V. PRODUCTIVITY OF BROILER CHICKENS IN THE SUMMER PERIOD OF GROWING USING THE PROBIOTIC «PROMOIS» 47

SANITATION

Kamenskaya T.N., Lukyanchik S.A., Tuchkovskaya A.V., Shablovsky V.O., Pap O.G., Borsuk N.G. SELECTION OF COMPOSITIONS FOR THE CONSTRUCTION OF POWDER DISINFECTANT AND STUDY OF BIOCIDAL AND TOXICOLOGICAL PROPERTIES OF THE MOST PROMISING SAMPLE 56

Компьютерная верстка: ЛУКЬЯНОВА И.А.

Подписано в печать 08.12.2025 г.

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

Уч.-изд. л. , усл. печ. л. 7,44 Тираж 50 экз. Заказ №

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

Республиканское унитарное предприятие «Информационно-вычислительный центр

Министерства финансов Республики Беларусь».

Свидетельства о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий

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

УДК 619:616.98:578.821

Щемелева Н.Ю., кандидат ветеринарных наук, доцент
Леонтьева Л.В., соискатель

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

НОДУЛЯРНЫЙ ДЕРМАТИТ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (ОБЗОР)

Резюме

Нодулярный дерматит – высококонтагиозное вирусное заболевание, вызывающее лихорадку, поражение кожи, слизистых оболочек и лимфатической системы. Является одной из наиболее опасных трансграничных болезней животных, требующих комплексного подхода к профилактике: систематической вакцинации, строгого ветеринарного контроля, борьбы с переносчиками и международного взаимодействия.

Экономические последствия заболевания подчёркивают необходимость своевременного реагирования и внедрения современных стратегий борьбы, что имеет важное значение для сельского хозяйства и международной торговли.

Ключевые слова: нодулярный дерматит, КРС, вирусные болезни, вакцинация, эпизоотология.

Summary

Nodular dermatitis is a highly contagious viral disease that causes fever, damage to the skin, mucous membranes and lymphatic system. It is one of the most dangerous transboundary animal diseases requiring an integrated approach to prevention: systematic vaccination, strict veterinary control, vector control and international cooperation.

The economic consequences of the disease underscore the need for timely response and the introduction of modern control strategies, which is important for agriculture and international trade.

Keywords: lumpy skin disease, cattle, viral infections, vaccination, epidemiology.

Поступила в редакцию 05.12.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Нодулярный дерматит (НД) – опасное заболевание животных, возбудителем которого является вирус семейства *Poxviridae*. НД поражает только крупный рогатый скот (КРС) и буйолов. Вирус очень специфичен для хозяина и не вызывает заболевания у людей. Болезнь сопровождается поражением кожи, лихорадкой, снижением продуктивности и значительными экономическими потерями [1].

Заболевание относится к списочным болезням ВОЗЖ, и с территорий, неблагополучных по этой нозологической единице, запрещается проводить экспорт животных и продукции животноводства. Согласно данным ОИЕ и ВОАН, НД КРС включён в перечень болезней, подлежащих обязательному контролю и уведомлению. В Казахстане и странах Центральной Азии эпизоотические вспышки сопровождались значительными потерями в животноводстве. FAO и Европейская комиссия разработали руководства и регламенты по профилактике и борьбе с болезнью [2].

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Возбудителем НД является вирус семейства *Poxviridae*, также известным как вирус *Neethling*. Относится к роду *Capripoxvirus*. По антигенным свойствам близок к вирусу оспы овец [3].

Устойчивость вируса НД довольно высока. В кожных поражениях животного вирус сохраняется 33 дня. В шкурах больных животных, хранящихся в темных условиях, вирус может сохранять свою активность многие месяцы. Прогревание при температуре 37 °С в течение 5 дней в жидкости с pH 6,6–8,6 не снижает его вирулентность. Холод консервирует вирус: при температуре 4 °С он сохраняется до 6 месяцев [3].

Возбудитель инактивируется при температуре 55 °С в течение 2 ч, а при 65 °С – в течение 30 мин, чувствителен к растворам 1%-ного формалина, 2%-ного фенола, 2–3%-ного гипохлорида натрия [4].

К НД восприимчив КРС независимо от породы, пола, возраста, более чувствительны лактирующие коровы европейских

пород и телята, а также буйволы. У диких животных болезнь не обнаружена, хотя жирафы и антилопы высокочувствительны при экспериментальном заражении. Сведений о восприимчивости человека к НД нет [4].

Источником инфекции чаще являются больные и переболевшие животные. Вирус выделяется в окружающую среду из пораженных участков кожи, а также со слюной, спермой, молоком, истечениями из носовой полости и глаз. Пути передачи вируса мало изучены.

Считается, что НД распространяется главным образом через переносчиков – возможно, через укусы мух и комаров, но как эти переносчики передают вирус от животного к животному, в настоящее время неизвестно [5].

Факторами передачи возбудителя инфекции являются продукты убоя, молоко, сперма животных, в т.ч. находящихся в инкубационном периоде; корма, вода, навоз, транспорт и другие объекты внешней среды, контаминированные вирусом НД. Возможна передача вируса при непосредственном контакте больных и здоровых, половым путем, у телят – через молоко. Нодулярный дерматит регистрируется в форме эпизоотий, характеризуется сезонностью (отмечается в жаркий, влажный сезон), распространен на низинных, заболоченных участках, где обитает большое количество членистоногих различных видов. Болезнь появляется внезапно и одновременно в удаленных друг от друга местах, распространяется быстро [4].

НД заражается 5–100 % КРС. При проведении терапевтических и дезинфекционных мероприятий против НД КРС удается спасти 99 % животных. У выздоровевших животных развивается устойчивый иммунитет. Однако в хозяйствах, пострадавших от НД, присутствие антител к возбудителю определяется при ежегодном введении диагностического аллергена [6].

Нодулярный дерматит впервые был обнаружен в Замбии в 1929 г., к 1943 г. распространился на Ботсвану и всю Южную Африку, где порастил более 8 млн голов КРС, причинив значительный экономический ущерб. В 1957 г. он проник в Кению, где был связан со вспышкой оспы овец. В 1970 г. НД распространился на север, в Судан, к 1974 г. – на запад, достигнув Ниге-

рии, а в 1977 г. был зарегистрирован в Мавритании, Мали, Гане и Либерии. Еще одна эпизоотия НД в период с 1981 по 1986 гг. охватила Танзанию, Кению, Зимбабве, Сомали и Камерун, при этом зарегистрированный уровень смертности среди пораженного скота составил 20 %. Болезнь эндемична на всем африканском континенте, за исключением Алжира, Марокко, Ливии и Туниса. Распространение НД к северу от пустыни Сахара было впервые подтверждено в Египте, а за пределами Африканского континента – в Израиле, в период с 1988 по 1989 гг., повторно было зарегистрировано в 2006 г. Вспышки НД, как правило, носят спорадический характер и зависят от перемещения животных, иммунного статуса, а также характера ветра и осадков, влияющих на популяции переносчиков [7].

В 2015 г. вирус НД впервые был занесен в Европу, болезнь стала приоритетом для Глобального руководящего комитета (GF-TADs) для поэтапных методов борьбы с трансграничными болезнями животных по Европе [8].

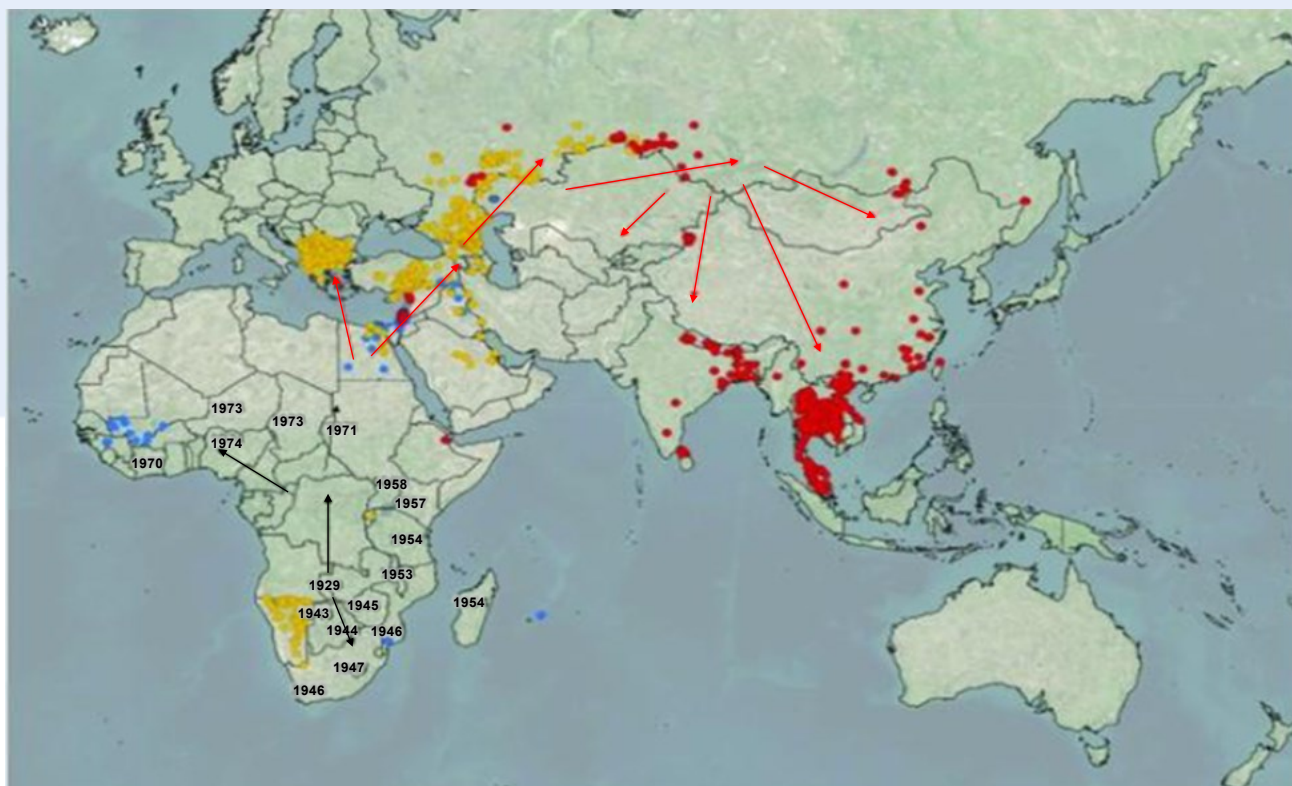
За последнее десятилетие НД распространился на Юго-Восточную Европу, Балканы, Россию, Казахстан и Азию в рамках евразийской эпидемии НД [9]. Динамика изменения ареала болезни приведена на рисунке 1.

Клинические признаки. Инкубационный период в полевых условиях не описан, но после экспериментального заражения длится 6–9 дней до появления лихорадки. У остро инфицированного животного наблюдается лихорадка, которая может сопровождаться температурой до 41 °С и сохраняться в течение 1 недели. Все поверхностные лимфатические узлы увеличиваются. У дойного скота наблюдается заметное снижение надоев молока. Поражения развиваются по всему телу, особенно на голове, шее, вымени, мошонке, вульве и промежности, через 7–19 дней после заражения. Характерные поражения кожных покровов представляют собой множественные четко очерченные или сливающиеся твердые плосковыпуклые папулы и узелки диаметром 0,5–5,0 см [10].

Узелки поражают дерму и эпидермис, могут распространяться на подкожный слой и иногда на прилегающие попе-

речно-полосатые мышцы, имеют кремово-серый или белый цвет на разрезе и могут первоначально выделять сыворотку, но в течение последующих 2 недель внутри может появиться конусообразный центральный стержень или секвестр некротического материала. Дермальные поражения включают васкулит с фибриноидным некрозом, отёк, тромбоз, лимфангит, дермально-эпидермальное расслоение и смешан-

ный воспалительный инфильтрат. Хронические поражения характеризуются инфарктом ткани с секвестрированным некротическим ядром, часто окаймлённым грануляционной тканью, постепенно замещающейся зрелым фиброзом. При появлении узелков выделения из глаз и носа становятся слизисто-гнойными, может развиваться кератит (рисунок 2) [6].



синие точки – вспышки НД КРС в 2006–2013 гг., желтые – в 2014–2018 гг., красные – в 2019–2021 гг.; черные цифры – год первых зарегистрированных вспышек НД в соответствующей стране; черные стрелки – исторические направления распространения болезни, красные – современные [5]

Рисунок 1 – География и динамика распространения нодулярного дерматита

Профилактика и меры борьбы.

НД в Республике Беларусь не регистрировался. Главное внимание должно быть направлено на недопущение заноса возбудителя болезни из соседних стран. С этой целью необходимо осуществлять строгий мониторинг ситуации в мире, ввоза в страну животных, продуктов их убоя, спермы, молока и молочных продуктов, прежде всего из стран, неблагополучных по данной болезни. При ввозе животных обязательным условием является их карантинирование с проведением необходимых диагностических исследований, направленных на

выявление и предотвращение распространения опасных заболеваний [4].

Большое значение для предупреждения НД имеют плановые вакцинации. Первую иммунизацию проводят 3-месячному молодняку, ревакцинацию – через 12 месяцев. В неблагополучном пункте и в хозяйствах угрожаемой зоны следует вакцинировать всех здоровых животных независимо от срока предыдущей иммунизации. Молодняк в возрасте до 6 месяцев прививают двукратно с интервалом в 14 суток [11].



Рисунок 2 – Теленок с ярко выраженными клиническими признаками нодулярного дерматита

Если возникновения болезни не удалось избежать, в хозяйстве объявляют карантин. После его снятия, как правило, вводят ограничение сроком на один год, в течение которого запрещено вывозить и реализовывать восприимчивых к болезни животных за пределы ранее неблагополучного пункта, кроме сдачи их на убой [12].

Экономический ущерб от НД КРС оценивается как крайне значительный: при вспышках заболевания падеж животных может достигать 10–20 % поголовья, удои молока снижаются на 30–50 %, а репродуктивная способность быков-производителей падает до 70 % случаев временной или полной стерильности. Дополнительно до 80 % шкур поражённых животных теряют товарную ценность, что значительно снижает прибыль от переработки. Введение карантинных мер и ограничений экспорта сокращает внешние поставки продукции на 40–60 %, а затраты на вакцинацию и ветеринарные мероприятия могут составлять до

15–20 % годового бюджета хозяйства. В совокупности это приводит к многомиллионным потерям для отрасли и серьёзно снижает экономическую устойчивость областей, где животноводство играет ключевую роль.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нодулярный дерматит остаётся одной из наиболее опасных трансграничных болезней животных. Его эпизоотическое распространение охватывает новые регионы, что требует комплексного подхода к профилактике: систематической вакцинации, строгого ветеринарного контроля, борьбы с переносчиками и международного взаимодействия. Экономические последствия заболевания подчёркивают необходимость своевременного реагирования и внедрения современных стратегий борьбы, что имеет важное значение для сельского хозяйства и международной торговли.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. WOAH. Lumpy Skin Disease guidelines. – URL: <https://rr-europe.woah.org/ru/миссия-мэб/болезни-животных/нодулярный-дерматит-нд/> (дата обращения: 01.12.2025).
2. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. – 7-е изд. – Т. 1. – Париж, 2012. – Гл. 2.4.14. – С. 762–774. – URL: <https://rr-americas.woah.org/app/uploads/2021/04/03-b-freischem-oie-terrestrial-and-aquatic-manuals.pdf> (дата обращения: 01.12.2025).
3. Introduction and spread of lumpy skin disease in South, East and Southeast Asia: qualitative risk assessment and management / X. Roche, A. Rozstalnyy, D. TagoPacheco [и др.] // FAO Animal Production and Health Paper 183. – Рим : FAO, 2020. – URL: <https://openknowledge.fao.org/bitstreams/93fff1b6-2377-4492-bd0c-a984f779751d/download> (дата обращения: 07.12.2025).
4. Ятусевич, А. И. Нодулярный дерматит крупного рогатого скота / А. И. Ятусевич, В. В. Максимович. – URL: <https://www.vsavm.by/wp-content/uploads/2012/07/9-Nodulyarnyi-dermatit-kрупного-rogatogo-skota.pdf> (дата обращения: 02.12.2025).
5. Нодулярный дерматит в Республике Казахстан: эпизоотология, история, стратегия профилактики и борьбы / Б. Ш. Мырзахметова [и др.]. – URL: <https://biosafety.kz/uncategorized> (дата обращения: 07.12.2025).
6. Нодулярный дерматит // Руководство по наземным животным. WOAH. – 2024. – Гл. 3.4.12. – URL: <https://www.woah.org/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/disease> (дата обращения: 01.12.2025).
7. Lumpy Skin Disease: A Systematic Review of Mode of Transmission, Risk of Emergence and Risk Entry Pathway / J. Bianchini, X. Simons, M.-F. Humblet, C. Saegerman // Viruses. – 2023. – Т. 15, № 1622. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/373420474> (дата обращения: 04.12.2025).
8. Lumpy skin disease: history, current understanding and research gaps in the context of recent geographic expansion / A. Mazloun, A. Sprygin, A. Van Schalkwyk [et al.] // Europe PMC. – 2023. – URL: <https://europepmc.org/article/MED/38029115> (дата обращения: 04.12.2025).
9. Sharma, P. Global expansion of lumpy skin disease: transmission trends, economic consequences, and preventive measures / P. Sharma, D. Kumar // Veterinary Research Communications. – 2025. – Т. 50, № 22. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11259-025-10954-y> (дата обращения: 05.12.2025).
10. Tuppurainen, E. FAO Lumpy Skin Disease Field Manual / E. Tuppurainen, T. Alexandrov, D. Beltran-Alcrudo. – Буданеум : FAO Regional Office for Europe and Central Asia, 2017. – URL: https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/reu/europe/documents/events2017/LSD_bp/d3/ManualReview.pdf (дата обращения: 06.12.2025).
11. ASEAN Secretariat. ASEAN Lumpy Skin Disease Prevention and Control Strategy (2024–2030). – Джакарта : ASEAN, 2024. – URL: <https://rr-asia.woah.org/app/uploads/2025/04/ASEAN-LSD-Prevention-and-Control-Strategy-October-2024.pdf> (дата обращения: 06.12.2025).
12. Снытко, О. Внимание! Нодулярный дерматит / О. Снытко // Приднепровская нива. – 2017. – URL: <https://www.pniva.by/2017/01/vnimanie-nodulyarnyj-dermatit/> (дата обращения: 05.12.2025).

препарат ветеринарный

МАСТИН

**ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СУБКЛИНИЧЕСКОГО И КЛИНИЧЕСКОГО
МАСТИТОВ КОРОВ В ПЕРИОД ЛАКТАЦИИ**

- ▶ антибактериальный препарат группы цефалоспоринов;
- ▶ действующее вещество – цефкином;
- ▶ обладает широким спектром бактерицидного действия;
- ▶ механизм действия заключается в нарушении формирования клеточной стенки бактерий, что приводит к их гибели



WWW.BIEVM.BY



УДК 619:116.99:636.22/.28.053.2

Щемелева Н.Ю., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
 Василькова В.П., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
 Романчик И. А., студент²

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

²Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ БЛАСТОЦИСТОЗА У ТЕЛЯТ

Резюме

Бластоцистоз, вызываемый протистом *Blastocystis* spp., является широко распространенной, но малоизученной инвазией сельскохозяйственных животных, патогенная роль которой остается дискуссионной.

При микроскопическом исследовании 288 проб фекалий от телят в возрасте до 30 дней инвазия была подтверждена в 72 пробах (25 % случаев). Сравнительный иммунологический анализ крови инвазированных и свободных от патогена телят выявил статистически значимые изменения. У больных телят установлено достоверное снижение относительного количества общих Т-лимфоцитов (CD3+) на 18,86 % и Т-хелперов (CD4+) на 18,81 %, что свидетельствует об иммуносупрессивном действии возбудителя. Одновременно отмечена лимфопения (снижение на 23,04 %) и значительное увеличение уровня палочкоядерных нейтрофилов (в 1,62 раза), что указывает на развитие выраженного воспалительного процесса.

Полученные данные свидетельствуют о том, что бластоцистоз у телят сопровождается комплексным нарушением иммунного ответа, характеризующимся дисбалансом клеточного звена иммунитета и хроническим воспалением. Это необходимо учитывать при разработке лечебно-профилактических мероприятий.

Ключевые слова: бластоцистоз, *Blastocystis* spp., телята, иммунный статус, Т-лимфоциты, нейтрофилы, воспаление.

Summary

Blastocystosis, caused by the protest *Blastocystis* spp., is a widespread but understudied invasion in farm animals, whose pathogenic role remains controversial.

Microscopic examination of 288 fecal samples from calves up to 30 days old confirmed the invasion in 72 samples (25 % of cases). A comparative immunological analysis of blood from infected and pathogen-free calves revealed statistically significant changes. In diseased calves, a significant decrease in the relative count of total T-lymphocytes (CD3+) by 18,86 % and T-helper cells (CD4+) by 1,81 % was established, indicating the immunosuppressive effect of the pathogen. Simultaneously, lymphopenia (a decrease of 23,04 %) and a significant increase in the level of band neutrophils (by 1,62 times) were noted, indicating the development of a pronounced inflammatory process.

The data obtained indicate that blastocystosis in calves is accompanied by a complex violation of the immune response, characterized by an imbalance in the cellular link of immunity and chronic inflammation. This must be taken into account when developing treatment and preventive measures.

Keywords: blastocystosis, *Blastocystis* spp., calves, immune status, T-lymphocytes, neutrophils, inflammation.

Поступила в редакцию 01.12.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы особую актуальность приобретает бластоцистоз – малоизученная протистная инвазия, обусловленная паразитированием преимущественно в толстой кишке протист *Blastocystis*, которые ведут себя как кишечные паразиты, подобные простейшим. *Blastocystis* выявляются в фекалиях животных и людей во всем мире. Данный полиморфный паразит вызывает интерес с точки зрения не только дифференциальной диагностики, но и не до конца определенной патогенной роли [1, 6, 7].

Систематическое положение бластоцист в течение длительного периода менялось. Сначала их причисляли к жгутиковым простейшим – трихомонадам. Позднее большинство исследователей отнесли бластоцисты к грибам.

Впервые о протозойной природе бластоцист высказался С.Н. Zierdt, применив принцип «доказательства от противного». Были определены характеристики, отличающие их от дрожжеподобных грибов: отсутствие клеточной стенки, характерной для грибов; рост со смешанной бактери-

альной флорой на бактериальных средах при нейтральной или слабощелочной pH; отсутствие мицелия; наличие псевдоподиального движения; оптимальная температура жизнедеятельности – 37 °C. Возбудитель был отнесен к классу *Lobosea* подклассу *Gymnamoebia* отряду *Amoebia* подотряду *Blastocystina* [7]. Таким образом, до 1988 г. бластоцисты относились к амебам. Позднее систематическая иерархия простейших многократно подвергалась пересмотру и изменениям.

В 1996 г. на основании анализа полной последовательности гена, кодирующего малую субъединицу рибосомальной РНК, была установлена принадлежность бластоцист к *Stramenopiles*, а систематическое положение *Blastocystis* на сегодняшний день выглядит так: домен *Eucariota*, царство *Chromista*, тип *Stramenopiles* или *Heteroconta*, класс *Blastocystea*, отряд *Blastocystida*, семейство *Blastocystidae*, род *Blastocystis* [6, 8].

Тип *Stramenopiles* – это огромная группа протистов, куда входят диатомовые водоросли, бурые водоросли (ламинария) и некоторые паразитические организмы, вроде *Blastocystis* и оомицетов (фитофтора).

Таким образом, *Blastocystis* – уникальный организм, относящийся к ранней ветви эволюции протист, отделившийся от главного ствола и освоивший новую среду обитания в анаэробных условиях. Положение о том, что *Blastocystis* – протиста, но не протозоа, всегда следует иметь в виду при его изучении и особенно при интерпретации полученных результатов. Род *Blastocystis* – единственно известный на сегодняшний день представитель *Stramenopiles*, паразитирующий в организме человека и животных.

Ранее существовавшее мнение о видоспецифическом паразитизме бластоцист оказалось неверным. В связи с этим были предложены изменения в номенклатуре, было решено отказаться от видовых названий в пользу обозначения генетического субтипа, штамма. Согласно современной классификации используется название *Blastocystis spp.* [3, 6].

Возможно, необычное происхождение бластоцист объясняет их уникальную способность к полиморфизму, поскольку до настоящего времени нет единого мне-

ния о числе их морфотипов. Наиболее изучены и признаны большинством исследователей вакуолярная, гранулярная, амебонидная и цистная формы [2].

За последние десятилетия научные взгляды на патогенность бластоцист претерпели значительные изменения. В настоящее время накоплено достаточное количество клинических наблюдений и лабораторных данных, подтверждающих как потенциальную, так и действительную этиологическую роль бластоцист в развитии патологий как у человека, так и у сельскохозяйственных животных. Эти заболевания, как правило, развиваются на фоне снижения общей резистентности макроорганизма [1, 2, 4, 5].

Определенный патогенный потенциал бластоцист был продемонстрирован еще в 1973 г. в экспериментальных работах В.Р. Phillips и С.Н. Zierdt по заражению мышей и морских свинок. Интенсивное инфицирование животных бластоцистами сопровождалось водянистой диареей и гиперемией кишечника [7].

В работах Н.С. Elwakil и Н. Hewedi по экспериментальному заражению *per os* белых мышей гистологическое исследование толстого кишечника инфицированных животных показало наличие инфильтрации подслизистого и даже мышечного слоя с проявлением воспаления, что клинически сопровождалось симптомами острого колита. Микроскопически в фиксированных мазках исследователи обнаружили вакуолярные формы бластоцист [5].

Современные исследования выявили прямую связь между наличием инвазии бластоцистами и нарушением функции желудочно-кишечного тракта. В ряде работ показано, что заражение *Blastocystis spp.* сопровождается изменением микробного состава кишечника, в частности появлением штаммов *Escherichia coli*, обладающих гемолитической активностью. Это усугубляет течение инфекционного процесса и усиливает воспалительные реакции в кишечнике [2, 4].

Данные по распространению бластоцистоза среди сельскохозяйственных животных весьма варьируют. Как отмечают сами исследователи, результаты зависят от особенностей сбора материала, методов исследования и уровня подготовки [4].

Кроме того, анализ показал отсутствие исследований по изучению особенности иммунобиологического проявления бластоцистоза у животных, что важно для понимания изменений, происходящих в организме инвазированного животного, и выбора дальнейшей стратегии лечебных и профилактических мероприятий.

Таким образом, **целью** нашего исследования было выявить телят, инвазированных *Blastocystis spp.*, и установить особенности иммунобиохимического проявления бластоцистоза у данного вида животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная часть представленной работы выполнялась в отделе паразитологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского».

Предметом исследования выступал биологический материал (пробы фекалий, крови) от телят в возрасте до 30 дней (диагностический период выявления бластоцист) черно-пестрой породы из хозяйств Минской, Могилевской, Брестской и Витебской областей, где ранее в пробах фекалий выявляли бластоцист.

Критерии включения в группу исследования: возраст до 2 месяцев, наличие диарейного синдрома, недостаточная масса тела. От телят в индивидуальную тару отбирались пробы фекалий, кровь – в вакуумные пробирки и доставлялись в лабораторию. Всего было исследовано 288 проб фекалий и 72 пробы крови от положительных на бластоцистоз телят. Использовали венозную кровь, стабилизированную гепарином (50 Ед/мл крови). Кровь забирали из яремной вены в пробирку, содержащую антикоагулянт. Исследование клеток крови, в том числе иммунологический подсчет Т-клеток (CD 3/4/8 – общие Т-лимфоциты, хелперы, киллеры), проводили методом проточной цитометрии с помощью автоматического гематологического анализатора.

Проводили микроскопию фиксированного окрашенного мазка, при этом учитывали морфологию бластоцист и количество в поле зрения микроскопа (п.з.м.), отмечали время отбора и доставки проб в лабораторию. Использовали методы окрашивания с применением окраски 2%-ным фуксином Циля в авторской модификации (рисунок 1).

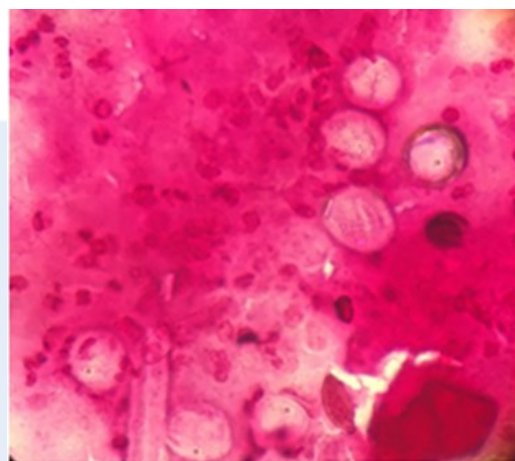
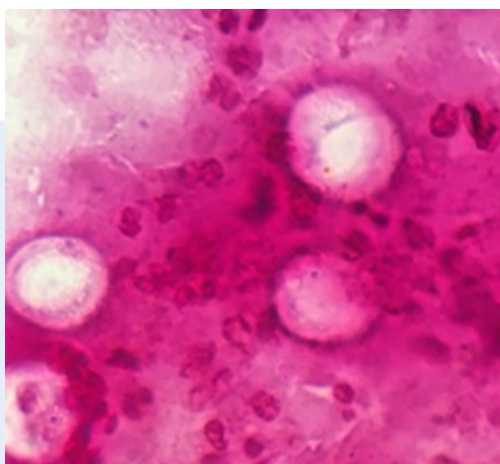


Рисунок 1 – Вакуолярная форма *Blastocystis spp.* (оригинальное фото, ув.×100)

Материал экспериментальных исследований подвергали статистической обработке на персональном компьютере с использованием программы STATISTICA 8.0.

Количественная оценка субпопуляции лимфоцитов имеет диагностическую

значимость в ветеринарной практике в случаях выявления вторичных иммунодефицитов при паразитарных инфекционных заболеваниях для последующего адекватного лечения животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В нашем исследовании установлено достоверно значимое снижение уровня Т-лимфоцитов (Т-CD3+) на 18,86 % ($p<0,01$),

Т-хелперов (Т-CD4+) – на 18,81 % ($p<0,01$) у телят с лабораторно подтвержденным бластоцистозом по сравнению с телятами, свободными от бластоцист (таблица).

Таблица – Изменения уровня основных популяций Т-лимфоцитов при бластоцистозе телят

Популяции лимфоцитов	Относительное количество, клеток %		Референтные значения, %
	инфицированные телята <i>Blastocystis spp.</i>	телята, свободные от <i>Blastocystis spp.</i>	
Т-лимфоциты (Т-CD3+)	54,62±5,61*	67,32±3,15	65–75
Т-хелперы (Т-CD4+)	37,13±5,32*	45,73±2,24	45–50
Т-киллеры (Т-CD8+)	20,97±2,21	23,33±1,82	20–25

Примечание – * $P<0,05$ в сравнении со здоровыми животными

Немаловажную роль в интерпретации иммунологического статуса животного играет и изучение общего уровня лейкоцитов крови. У инвазированных телят наблю-

далась тенденция к повышению количества лейкоцитов по сравнению с телятами, свободными от данного паразита (рисунок 2).

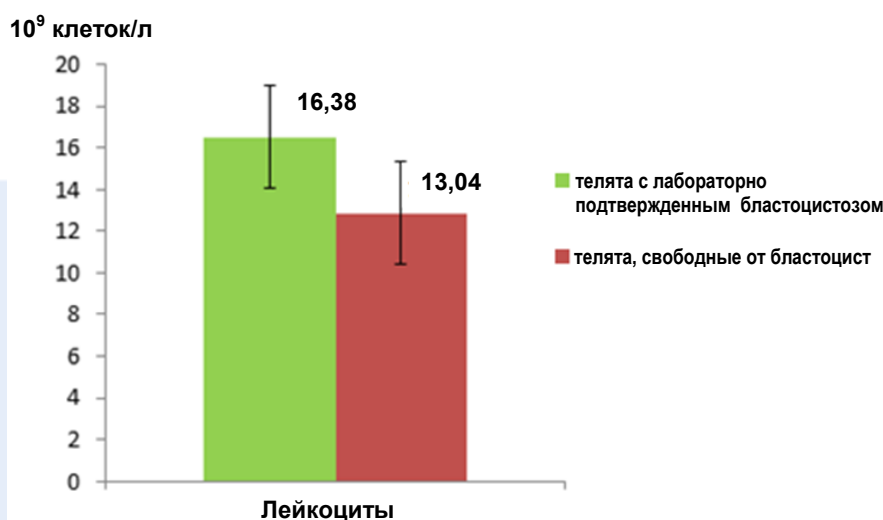


Рисунок 2 – Уровень лейкоцитов в крови телят с лабораторно подтвержденным бластоцистозом по сравнению с телятами, свободными от бластоцист

Анализ лейкограммы является одним из главных этапов иммунобиологического исследования, в частности, интерес представляет уровень палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитов у инвазированных и свободных от бластоцист животных.

В здоровом состоянии защиту иммунитета обеспечивают зрелые (сегментоядерные) нейтрофилы и совсем немного молодых (т.е. палочкоядерных) нейтрофилов. Чем активнее антигенная атака, тем

больше проявляется нагрузка на иммунитет и тем больше в крови появляется палочкоядерных нейтрофилов (рисунок 3). При наших исследованиях наблюдалось достоверное повышение в 1,62 раза ($P<0,01$) количества молодых форм нейтрофилов по отношению к группе клинически здоровых животных. Полученные данные свидетельствуют о развитии в организме телят, инвазированных *Blastocystis spp.*, воспалительных реакций, вызванных данным возбудителем.

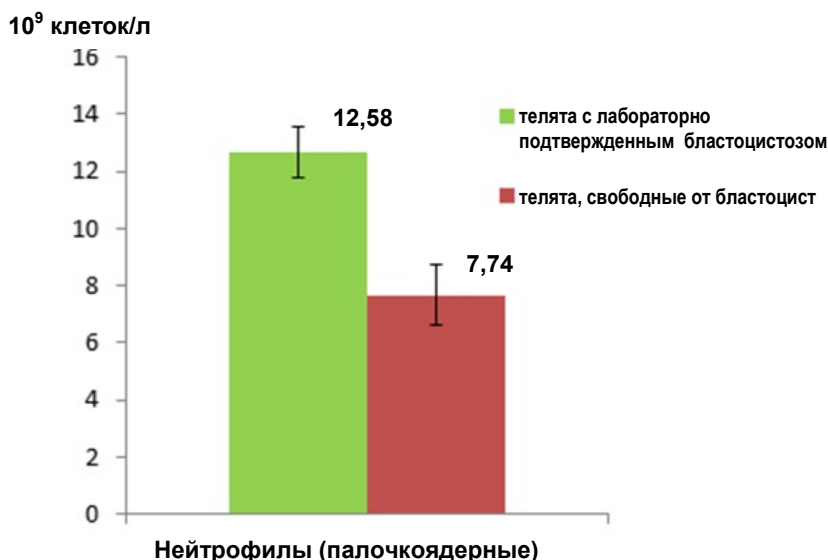


Рисунок 3 – Уровень нейтрофилов в крови у телят с лабораторно подтвержденным бластоцистозом по сравнению с телятами, свободными от бластоцист

Пониженное содержание лимфоцитов в крови телят, инвазированных *Blastocystis spp.* (рисунок 4), связано с иммуносупрессивным действием возбудителя и хроническим течением болезни. Достоверное снижение лимфоцитов было установлено за период наблюдений и было ниже на 23,04 % ($p < 0,01$) аналогичных показателей, полученных от группы контроля.

Лимфопения при одновременном значительном увеличении уровня палочкоядерных нейтрофилов говорит о сильной воспалительной реакции организма и одновременно о нарушении (дисбалансе) функционирования защитных сил естественной резистентности организма животных, инвазированных возбудителем *Blastocystis spp.*

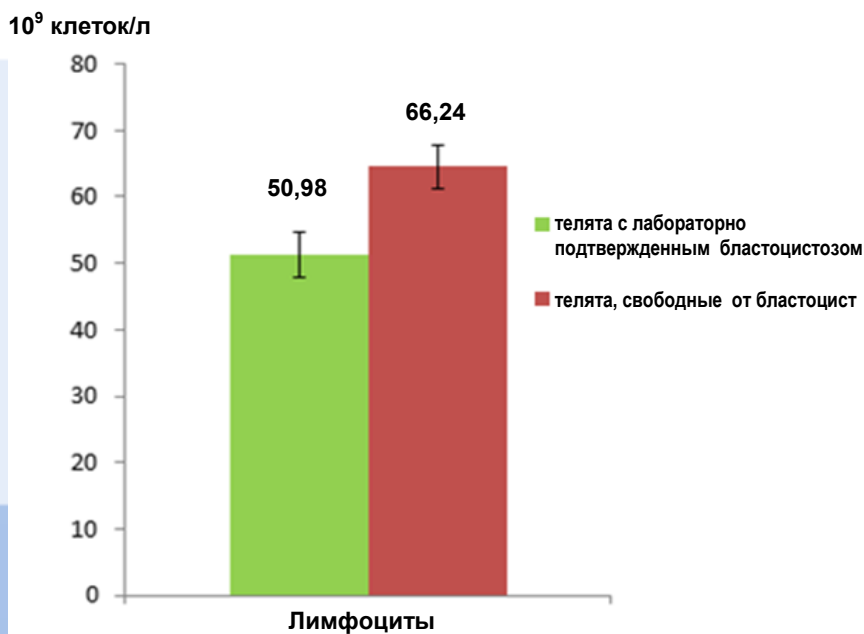


Рисунок 4 – Уровень лимфоцитов в крови у телят с лабораторно подтвержденным бластоцистозом по сравнению с телятами, свободными от бластоцист

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования биоматериала из хозяйств четырех областей республики обнаружено 25 % положительных на бластоцистоз проб от всех поступивших (288/72).

В ходе исследований иммунобиологических показателей крови телят, инвазированных *Blastocystis spp.*, была выявлена

лимфопения с достоверно значимым снижением уровня Т-лимфоцитов (Т-CD3+) на 18,86 % ($p < 0,01$), Т-хелперов (Т-CD4+) – на 18,81 % ($p < 0,01$) при одновременном увеличении уровня палочкоядерных нейтрофилов, что указывает на патологическую воспалительную реакцию и дисбаланс защитных сил организма животных.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Максимова, М. С. Взаимосвязь между интенсивностью выделения *Blastocystis sp.* и проявлениями дисфункции желудочно-кишечного тракта / М. С. Максимова, Т. В. Продеус // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2018. – Т. 7. – № 4 (27). – С. 52–57.
2. Об ассоциации *Blastocystis species* и микробиоты кишечника при различных состояниях макроорганизма / М. С. Максимова, Т. В. Продеус, Л. В. Федянина, О. В. Грицюк // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2015. – № 4. – С. 55–58.
3. Продеус, Т. В. Морфологическая идентификация бластоцист / Т. В. Продеус, Л. В. Федянина, А. А. Фролова // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2014. – № 1. – С. 9–13.
4. *Blastocystis tropism in the pig intestine* / R. Fayer, T. Elasser, R. Gould [et al.] // *Parasitol Res.* – 2014. – № 113 (4) – P. 1465–72.
5. Elwakil, H. S. Pathogenic potential of *Blastocystis* in laboratory mice / H. S. Elwakil, I. H. Hewedi // *Parasitol. Res.* – 2010. – № 107 (3) – P. 685–9.
6. Tan, K. S. W. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis spp.* / K. S. W. Tan // *Clin Microbiol Rev.* – 2008. – Vol. 21, n 4. – P. 639–665.
7. Zierdt, C. H. Studies of *Blastocystis* / C. H. Zierdt // *J. Protozool.* – 1973. – Vol. 20. – P. 114–121.
8. Zierdt, C. H. Taxonomic status of *Blastocystis*: reply / C. H. Zierdt // *Parasitol. Today.* – 1993. – Vol. 9. – P. 18–19.



ТРИКЛАМИЗОЛ

противопаразитарный препарат



Препарат ветеринарный «ТРИКЛАМИЗОЛ»
ТУ ВУ 600049853.308-2022

порошок для орального применения

Вид животных: крупный рогатый скот, овцы, козы, благородный олень и лесной олень

Способ применения: при транзитном, устойчивом и длительном в дозе 75 мг/кг или 1 мл/100 кг массы животного в сутки

Масса 500 г

Производитель: БИЕВМ

СОДЕРЖИТ

триклабендазол,
албендазол,
левамизола
гидрохлорид,
лактозу

ПРИМЕНЯЮТ

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



WWW.BIEVM.BY

Каяк Ю.А., аспирант

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

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ НОРОК ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ БИОПРЕПАРАТОМ «КОВПАСТ»

Резюме

В статье приведены данные о влиянии разработанной инактивированной вакцины для профилактики коронавирусной инфекции и пастереллеза норок на гематологические и иммунологические показатели животных. Установлено, что применение разработанного биологического препарата приводит к формированию иммунного ответа. Введение биопрепарата вызывает достоверное увеличение титра противовирусных и антибактериальных антител, количества Т- и В-лимфоцитов, лизоцимной и бактерицидной активности сыворотки крови.

Ключевые слова: биологический препарат, вакцина, SARS-CoV-2, пастереллез, профилактика, иммунный ответ, гематология.

Summary

This article presents data on the effect of the developed inactivated vaccine for the prevention of coronavirus infection and pasteurellosis on the hematological and immunological parameters of fur animals. It has been established that the use of the developed biological drug leads to the formation of an immune response. The introduction of the named causes a reliable increase in the titer of antiviral and antibacterial antibodies, the number of T- and B-lymphocytes, lysozyme and bactericidal activity of blood serum.

Keywords: biological product, vaccine, SARS-CoV-2, pasteurellosis, prevention, immune response, hematology.

Поступила в редакцию 13.10.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Характер иммунологического процесса при вакцинации определяется многофазными биологическими взаимоотношениями антигена, инактиванта и адъюванта с организмом норок. Достаточный защитный иммунный ответ наблюдается при условии, что животное здорово, а вакцина обладает высокой антигенной и иммуногенной активностью [1].

Нами разработана вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS CoV-2, и пастереллеза норок «Ковпаст» с целью формирования иммунитета к пневмоэнтеритам в возрасте от 2 месяцев и старше.

В предыдущих исследованиях нами было изучено влияние разработанной отечественной вакцины «Ковпаст» на биохимические показатели крови организма норок, в результате которых установлено отсутствие негативного влияния на обмен веществ. Эти показатели могут characterize

вать антигенную степень воздействия биопрепарата на организм в целом [2].

О высокой эффективности биопрепарата можно говорить лишь в том случае, если он стимулирует выработку высоких титров антител в организме вакцинированных норок и не оказывает негативного влияния на состояние обмена веществ, следовательно, и на продуктивность животных.

Цель исследований – оценить влияние отечественного биопрепарата «Ковпаст» на гематологические и иммунологические показатели крови норок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесесского» и в условиях Барановичского участка Пинского сельскохозяйственного отделения Производственного унитарного предприятия «Белкоопмех».

Гематологические показатели определяли на гематологическом анализаторе Mythic 18; бактерицидную активность сыворотки крови – методом фотонейфелометрии [3], фагоцитарную активность – в соответствии с [4], относительное количество Т- и В-розеткообразующих лимфоцитов в периферической крови исследовали по методу Д.К. Новикова и В.И. Новиковой [5], лизоцимную активность – по методу Дорофейчука В.Г. [6]. Титры противовирусных антител определяли в реакции нейтрализации, титры противобактериальный антител – в реакции агглютинации и методом ИФА с использованием тест-системы.

Для определения влияния разработанной отечественной вакцины «Ковпаст»

на иммунологические и гематологические показатели крови норки сформировали две группы животных по 10 голов в каждой – опытная и контрольная. Норкам опытной группы применяли разработанный биопрепарат в дозе 0,5 см³ двукратно внутримышечно в наружную сторону бедра с интервалом 21 день. Норкам контрольной группы вводили стерильный физиологический раствор натрия хлорида в той же дозе и с таким же интервалом. Отбор крови проводили до введения биопрепарата и на 14-й, 21-й и 39-й день после начала иммунизации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты исследований по оценке влияния биопрепарата на гематологические показатели организма норки приведе-

Таблица 1 – Гематологические показатели организма норки

Группа	Эритроциты, 10 ¹² /л	Гемоглобин, г/л	Гематокрит, %	Лейкоциты, 10 ⁹ /л
до введения биопрепарата				
Контрольная	8,51±0,31	170,2±4,22	49,8±3,17	6,2±0,33
Опытная	8,31±0,22	171,0±2,11	50,1±1,21	6,4±0,31
на 14-й день после введения биопрепарата				
Контрольная	8,58±0,18	170,2±5,12	50,2±1,21	6,6±0,14
Опытная	8,22±0,24	171,3±2,42	50,9±1,17	7,7±0,08*
на 21-й день после введения биопрепарата				
Контрольная	8,20±0,21	168,1±4,46	49,5±1,34	6,0±0,11
Опытная	8,18±0,18	170,1±3,33	51,0±1,35	8,3±0,14*
на 39-й день после введения биопрепарата				
Контрольная	8,53±0,42	170,7±4,61	50,2±1,24	6,4±0,12
Опытная	8,15±0,18	170,6±3,33	51,2±1,35	8,4±0,11*

Примечание – * $P \leq 0,05$

Из таблицы 1 следует, что достоверные изменения ($P \leq 0,05$) отмечены у животных опытной группы только в отношении лейкоцитов: их уровень увеличивается на 14-й день на 20 %, на 21-й день – на 24 %, на 39-й день – на 23 %.

Уровень гемоглобина, гематокрита и количество эритроцитов находились в пределах физиологической нормы и достоверно не отличались от показателей норки контрольной группы.

В таблице 2 отражена динамика неспецифических факторов защиты организма норки при применении разработанного биопрепарата.

Анализ данных таблицы 2 показывает, что применение вакцины приводит к достоверному увеличению фагоцитарной активности к 14-му дню опыта на 8 %. На 21-й день исследований фагоцитарная активность лейкоцитов увеличилась на 20,3 % ($P \leq 0,05$), а на 39-й день – на 16,7 %.

Бактерицидная активность сыворотки крови норки перед введением биопрепарата в опытной группе находилась в пределах 7,2–1,5 %. На 14-й день после применения вакцины ее уровень в опытной группе достигал значения 5,1 %, к 21-му дню увеличился на 9,5 % ($P \leq 0,05$) и на 45-й день составил 5,4 %.

Таблица 2 – Неспецифические факторы защиты норок

Группа	Фагоцитарная активность, %	Бактерицидная активность, %	Лизоцимная активность, %
до введения биопрепарата			
Контрольная	57,33±2,51	52,54±0,35	8,09±0,11
Опытная	58,5±4,51	53,62±0,42	7,25±0,15
на 14-й день после введения биопрепарата			
Контрольная	60,01±2,18	54,21±0,29	6,59±0,14
Опытная	63,2±2,25*	56,34±0,35	8,34±0,11
на 21-й день после введения биопрепарата			
Контрольная	58,41±3,11	55,16±0,21	7,21±0,16
Опытная	70,4±3,11*	58,72±0,18*	10,45±0,19*
на 39-й день после введения биопрепарата			
Контрольная	59,11±3,21	53,35±0,15	7,15±0,10
Опытная	68,3±2,81*	56,51±0,22*	9,18±0,10*

Примечание – * $P \leq 0,05$

Лизоцимная активность крови на 14-й день после введения биопрепарата составила 15 % в опытной группе, на 45-й день – 26,6 %. Данные изменения обусловлены стимулированием Т- и В-лимфоцитов

(гуморальный и клеточный иммунитет).

Результаты исследований по оценке влияния вакцины «Ковпаст» на клеточный и гуморальный иммунитет представлены в таблицах 3, 4.

Таблица 3 – Оценка влияния вакцины на выработку Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов крови норок

Группа	Относительное количество Т-лимфоцитов, %	Относительное количество В-лимфоцитов, %
до введения биопрепарата		
Контрольная	35,2±0,27	23,3±0,33
Опытная	36,8±0,21	24,7±0,30
на 14-й день после введения биопрепарата		
Контрольная	34,7±0,34	24,7±0,12
Опытная	39,6±0,24*	30,1±0,28*
на 21-й день после введения биопрепарата		
Контрольная	36,4±0,21	24,8±0,18
Опытная	41,2±0,18*	35,3±0,22*
на 39-й день после введения биопрепарата		
Контрольная	35,9±0,43	24,3±0,27
Опытная	40,5±0,22*	31,6±0,33*

Примечание – * $P \leq 0,05$

В показателях контрольной группы достоверных изменений не отмечено. Результаты проведенных исследований спонтанной розеткообразующей способности лимфоцитов на фоне иммунизации инактивированной вакциной «Ковпаст» (таблица 3) свидетельствуют о стимулирующем влиянии биопрепарата на иммунитет.

На 14-й день после введения вакцины отмечалось достоверное повышение уровня Т-лимфоцитов крови норок опытной группы на 7,6 % по отношению к контрольной группе. В последующие дни ис-

следований количество клеток достоверно увеличивалось и на 39-й день наблюдений составило 9,13 % в опытной группе.

В течение 21-го дня после применения вакцины количество В-лимфоцитов достоверно повышалось и составило в опытной группе 21,8 % на 14-й, а на 21-й день – 42 % ($P \leq 0,05$). К 39-му дню исследований число В-лимфоцитов снижалось, однако оставалось на высоком уровне и составляло в опытной группе 28 %. В контрольной группе рост В-лимфоцитов был на уровне от 4,2 % до 6 %.

Наибольший рост специфических антител наблюдается на 21-е сутки с незначительным снижением на 39-е сутки.

Как видно из таблицы 4, титры антител к вирусному антигену SARS-CoV-2

при постановке реакции нейтрализации в среднем по опытной группе на 14-й день составляли $1,5 \log_2$, на 21-й день – $3,5 \log_2$, на 39-й – $7,0 \log_2$.

Таблица 4 – Уровень титров специфических антител после вакцинации биопрепаратом «Ковпаст»

Группа	Титры антител к вирусу SARS-Cov-2, \log_2	Титры антител к бактерии <i>P. multocida</i> , \log_2
до введения биопрепарата		
Контрольная	0	0
Опытная	0	0
на 14-й день после введения биопрепарата		
Контрольная	0	0
Опытная	1,5	4,5
на 21-й день после введения биопрепарата		
Контрольная	0	0
Опытная	3,5	6,75
на 39-й день после введения биопрепарата		
Контрольная	0	0
Опытная	7,0	9,25

Примечание – $*P \leq 0,05$

Титры антител к бактериальному (пастереллезному) антигену в реакции агглютинации на 14-й день после введения биопрепарата в среднем по опытной группе составляли $4,5 \log_2$, на 21-й день были в пределах $6,75 \log_2$, а на 39-й день исследований – $9,25 \log_2$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Испытуемая вакцина не оказывает негативного влияния на гематологические показатели норок. Опыт показал, что при

использовании биопрепарата «Ковпаст» у привитых норок наблюдается достоверное увеличение лизоцимной (с 11 % до 26,6 %) и бактерицидной активности (с 1,5 % до 9,5 %), количества Т- и В-лимфоцитов – на 9,13 % и 28 % соответственно, титров противовирусных и антибактериальных антител – до $7 \log_2$ и $9,25 \log_2$ соответственно.

Иммунизация испытуемой вакциной приводит к формированию у норок специфического напряженного иммунитета.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Балакирев, Н. А. Основы норководства : монография / Н. А. Балакирев. – М. : Высшая школа, 2001. – 287 с.
2. Каяк, Ю. А. Влияние инактивированной вакцины для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, пастереллеза на биохимические показатели крови норок / Д.С. Борисовец, Ю. А. Каяк, И. М. Ревякин // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2025. – Вып. 58, № 3. – С. 48–51.
3. Смирнова, О. В. Определение БАСК методом фотонейфелометрии / О. В. Смирнова, Т. А. Кузьмина // ЖМЭИ. – 1966. – № 4. – С. 8–11.
4. Плященко, С. И. Определение естественной резистентности организма сельскохозяйственных животных : метод. рекомендации / С. И. Плященко, Г. К. Волков, В. Т. Смирнов. – Минск, 1985. – 33 с.
5. Новиков, Д. К. Клеточные методы иммунодиагностики / Д. К. Новиков, В. И. Новикова. – Минск : Беларусь, 1979. – 222 с.
6. Дорофейчик, В. Г. Определение активности лизоцима нефелометрическим методом / В. Г. Дорофейчик // Лабораторное дело. – 1968. – № 1. – С. 28–29.

УДК 577.2:579.842.1:579.253.4

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

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

ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* И *MYCOPLASMA BOVIS* В СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ *E. COLI* И ОЦЕНКА ИХ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ

Резюме

В статье описано получение рекомбинантных штаммов-продуцентов *Escherichia coli*, синтезирующих рекомбинантные белки *M. bovis* и *M. hyopneumoniae*, и дана оценка антигенных свойств синтезируемых мембранных белков. Полученные результаты демонстрируют выраженные антигенные свойства рекомбинантных белков и подтверждают перспективность созданных штаммов-продуцентов для получения стандартизированных антигенных препаратов, пригодных для использования в ИФА-тест-системах диагностики микоплазмозов сельскохозяйственных животных.

Ключевые слова: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma bovis*, рекомбинантный белок, *E. coli* BL21 (DE3), штамм-продуцент, хроматография, антигенные свойства, иммуноферментный анализ (ИФА), серодиагностика.

Summary

The article describes production of recombinant strains-producers of *Escherichia coli* synthesizing recombinant proteins of *M. bovis* and *M. hyopneumoniae* and evaluation of antigenic properties of membrane proteins synthesized by them. Obtained results demonstrate expressed antigenic properties of recombinant proteins and confirm perspective of created strains-producers for obtaining standardised antigenic preparations, suitable for use in ELISA-test systems for diagnostics of farm animal mycoplasmosis.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma bovis*, recombinant protein, *E. coli* BL21 (DE3), producer strain, chromatography, antigenic properties, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), serodiagnosis.

Поступила в редакцию 05.12.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Микоплазмы рода *Mycoplasma* представляют собой группу бактерий, лишенных клеточной стенки, что обуславливает их резистентность к ряду антибиотиков и сложность культивирования [1]. *Mycoplasma bovis* считается одним из основных этиологических агентов хронических респираторных заболеваний, маститов и артритов у крупного рогатого скота (КРС) [2]. *Mycoplasma hyopneumoniae* является первичным патогеном, ответственным за энзоотическую пневмонию свиней – заболевание, ведущее к существенным потерям продуктивности из-за снижения привесов и ухудшения конверсии корма [3]. Лабораторная диагностика этих инфекций, в частности серологические методы, основанные на выявлении специфических антител, зависит от качества антигенов. Получение чистого антигена из микоплазм традиционными методами не всегда возможно, так как он может быть контаминирован компо-

нентами культуральной среды, а сам процесс культивирования патогенов трудоемок и требует особых условий [4]. Альтернативой для получения чистого антигена служат рекомбинантные технологии, позволяющие производить отдельные высокоочищенные иммунодоминантные белки в гетерологичных системах экспрессии, таких как *Escherichia coli* [5]. Этот подход обеспечивает воспроизводимость, специфичность и безопасность получаемых диагностических препаратов. Ключевым этапом в разработке таких препаратов является не только создание эффективного штамма-продуцента, но и комплексная оценка антигенных свойств полученного рекомбинантного белка.

Целью данной работы являлось создание рекомбинантных штаммов-продуцентов *E. coli*, экспрессирующих мембранные белки *M. hyopneumoniae* и *M. bovis*, и последующая оценка их антигенных свойств в иммуноферментном анализе (ИФА).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения штаммов-продуцентов использовали гены, кодирующие мембранные белки *M. hyorheumoniae* с молекулярной массой около 46 кДа (GenBank CP034597) и *M. bovis* (около 36 кДа, GenBank CP002058.1). Специфические ПЦР-продукты получали с использованием специфических праймеров, содержащих сайты рестрикции *NheI/HindIII* и *NheI/EcoRI*. ПЦР-продукты и экспрессионный вектор pET24b(+) обрабатывали соответствующими эндонуклеазами, фрагменты очищали с использованием набора Cleanup Standard («Евроген», Россия).

Лигирование проводили с помощью ДНК-лигазы T4 при молярном соотношении вставка-вектор 3:1. Лигированную смесь трансформировали в компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3). Отбор трансформантов осуществляли на плотной среде LB, содержащей канамицин (50,0 мкг/мл). Наличие целевых вставок подтверждали ПЦР-анализом.

Культивирование продуцентов проводили в 50,0 мл среды LB с канамицином и инкубировали на качалке (200,0 об/мин) при температуре 37 °C в течение 14–16 ч. Данная культура являлась раскладкой для засева 1,0 л основного объема среды в соотношении 1:100. Культивирование вели при температуре 37 °C до достижения оптической плотности OD 600 ~0,6–0,8. Биомассу осаждали центрифугированием при 4000 г в течение 20 мин при температуре 4 °C.

Для удаления остатков культуральной среды осадок дважды отмывали охлажденным 0,15 М раствором NaCl, pH 7,4. Отмытый осадок ресуспендировали в лизирующем буфере (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 1 mM фенилметилсульфонил-фторид – PMSF). Дезинтеграцию клеток проводили с использованием ультразвукового гомогенизатора Bandelin Sonopuls HD 2200 (Германия). Обработку осуществляли в импульсном режиме (6–7 циклов по 30 с (35 КГц) и перерывом 30 с для охлаждения на ледяной бане). Полноту разрушения контролировали микроскопически. Клеточный дебрис и неразрушенные клетки удаляли центрифугированием при 12000 g (15 мин, 4 °C). Супернатант (растворимая фракция) отбирали для дальнейшей очистки. Общую концентрацию белка в лизате определяли по методу Бредфорда.

Очистку гистидин-меченых рекомбинантных белков проводили методом иммобилизованной металлоаффинной хроматографии (IMAC) на Ni²⁺-хелатирующей смоле. Использовали хроматографические колонки объемом 10,0 мл (Econo-Pac, «Bio-Rad», США), заполненные смолой Nuvia IMAC («Bio-Rad», США). Колонку уравнивали 5–10 объемами стартового буфера (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM имидазол). Клеточный лизат, предварительно пропущенный через фильтр 0,45 мкм, наносили на колонку со скоростью 1,0 мл/мин. Неспецифически связанные белки отмывали отмывочным буфером, содержащим 20 mM имидазол. Элюцию целевого белка проводили буфером, содержащим имидазол, используя ступенчатый градиент с конечной концентрацией 250 mM. Белоксодержащие фракции, детектированные методом Бредфорда или при длине волны 280 нм, объединяли и анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE).

Для удаления примесей и имидазола проведена дополнительная стадия гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной фосфатно-солевым буфером (ФСБ, 0,01 M, pH 7,4). Очищенный белок концентрировали с помощью ультрафильтрации (Amicon, Merck) с отсечением молекулярной массы 10 кДа. Концентрацию очищенного белка определяли методом Бредфорда. Очищенный препарат хранили при температуре минус 20 °C.

Для оценки антигенных свойств полученных белков проводили иммунизацию кроликов массой 2,5–3,0 кг. Очищенные рекомбинантные белки эмульгировали с адьювантом Montanide ISA 61 («Seppic», Франция) в соотношении 40:60 (антиген/адьювант, v/v).

Для оценки зависимости иммунного ответа от дозы антигена кроликов иммунизировали разными количествами белка: 50,0 мкг, 100,0 мкг и 200,0 мкг на животное. Эмульсию вводили внутримышечно в две точки в области спины. Схема иммунизации включала две инъекции с интервалом 14 дней. Через 10 дней после второй иммунизации осуществляли забор крови из краевой вены уха. Полученную сыворотку хранили при температуре минус 20 °C. Контрольной группе животных вводили

смесь стерильного ФСБ с адьювантом по аналогичной схеме.

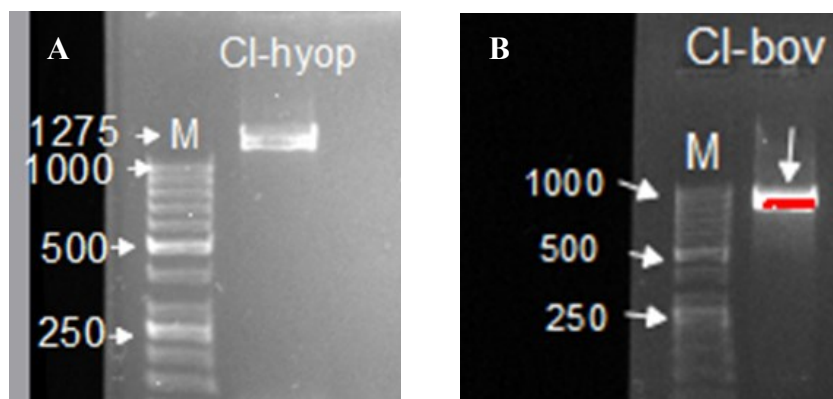
Иммуноферментный анализ проводили в 96-луночных полистироловых планшетах («Costar», США). Для оптимизации сорбции антигена лунки сенсibilizировали растворами рекомбинантного белка в концентрациях 10,0; 20,0 и 30,0 мкг/мл в различных буферах: 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере (КББ, pH 9,4), 0,02 М ФСБ (pH 7,4) и 0,02 М ацетатном буфере (pH 5,0). Инкубацию проводили 1 ч при температуре 37 °С. После трехкратной отмывки ФСБ с 0,05%-ным раствором твина-20 (ФСБ-Т) проводили блокирование неспецифических сайтов связывания 0,4%-ным раствором обезжиренного молока в КББ в течение 1 ч при температуре 37 °С. После отмывки в лунки вносили серийные двукратные разведения исследуемых антисывороток (начиная с 1:100) и инкубировали 1 ч при температуре 37 °С. После отмывки вносили конъюгат-поликлональные антитела к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена («USCN Life Science

Inc.», Китай), разведенные согласно рекомендациям производителя. Инкубация – 1 ч при температуре 37 °С. После финальной отмывки реакцию проявляли с использованием ТМБ-субстратного раствора в течение 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 10%-ной серной кислоты. Оптическую плотность (ОП) измеряли при длине волны 450 нм на планшетном спектрофотометре.

Учет результатов проводили по пороговому значению, определяемому как средняя ОП отрицательных контрольных сывороток (K⁻). Положительным считали образец, ОП которого превышала пороговое значение в 1,5 раза. Титром антител считали наибольшее разведение сыворотки, дающее положительный результат.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате молекулярно-генетических манипуляций были получены рекомбинантные плазмиды pET24b(+), несущие гены целевых белков *M. hyor pneumoniae* и *M. bovis* (рисунок 1).



А – продукт амплификации с праймерами Cl-hyor (1275 п.н.);

В – продукт амплификации с праймерами Cl-bov (1002 п.н.);

М – маркер молекулярной массы

Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР-анализа клонов с генами *thr* и *mbov*

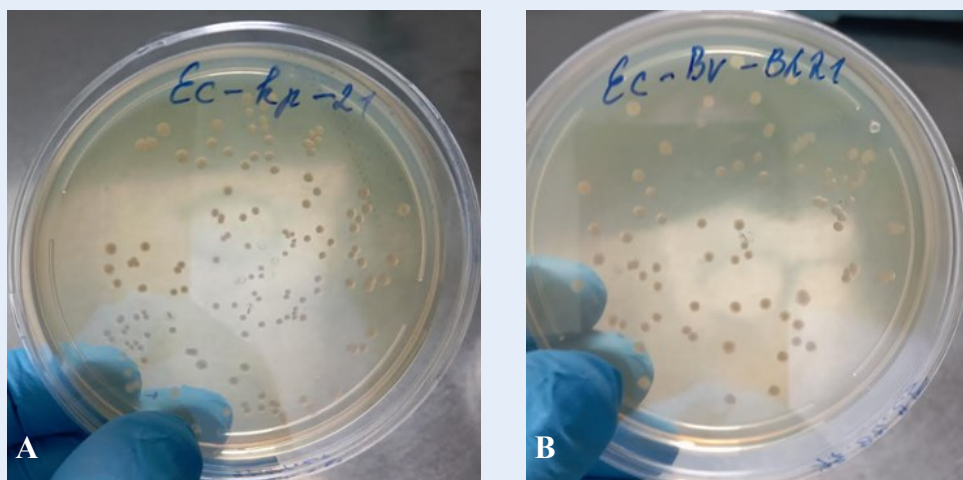
Трансформация в штамм *E. coli* BL21(DE3) и отбор на средах с канамицином позволили выделить стабильные клоны-продуценты, обозначенные как EchrBL21p1 – для *M. hyor pneumoniae* (рисунок 2 А) и EcBvBL21p1 – для *M. bovis* (рисунок 2 В).

ПЦР-анализ и рестрикция выделенных плазмид подтвердили корректность конструкции и наличие целевых вставок ожидаемого размера.

При культивировании штаммов-продуцентов в 1,0 л среды LB с последующим центрифугированием было получено 3,0–4,0 г биомассы клеток. После отмывания физиологическим раствором и ультразвуковой дезинтеграции общее количество белка в растворимой фракции лизата составляло 80,0–120,0 мг. Хроматографическая очистка растворимой фракции лизата обеспечила эффективное выделение целевых гистидин-меченых белков *E. coli*. Це-

левой белок элюировался в виде четкого пика при повышении концентрации имидазола до 250 мМ. Электрофоретический анализ фракций элюата показал наличие доминирующей полосы с молекулярной массой, соответствующей ожидаемой (~46 кДа для *M. hyopneumoniae* и ~36 кДа для *M. bovis*),

что свидетельствовало о высокой степени очистки. Последующая гель-фильтрация позволила удалить низкомолекулярные примеси и соли. Выход высокоочищенного рекомбинантного белка с 1 л культуральной жидкости составил в среднем 8,0–12,0 мг.



А – Ec-hp-BL21; В – Ec-Bv-BL21

Рисунок 2 – Колонии трансформантов, несущих рекомбинантные плазмиды pET-22b(+)-*mhr* (первичный отбор рекомбинантных клонов)

Иммунизация кроликов очищенными рекомбинантными белками с адъювантом Montanide ISA 61 индуцировала выраженный гуморальный иммунный ответ, необходимый для последующей оценки антигенных свойств. Максимальные титры антител были получены при использовании дозы антигена 200,0 мкг на животное. Меньшие дозы приводили к менее стабильному ответу.

Эффективность сорбции рекомбинантных белков на полистироловом планшете максимальна при использовании карбонатного буфера с pH 9,4. Концентрация антигена 20,0 мкг/мл была выбрана как оп-

тимальная, обеспечивающая высокий сигнал при экономичном расходе реагента. В качестве наиболее эффективного блокирующего агента подтвержден 0,4%-ный раствор обезжиренного молока.

ИФА-анализ антисывороток, полученных от кроликов, иммунизированных дозой 200,0 мкг, продемонстрировал высокие титры специфических антител, что подтверждает выраженные антигенные свойства использованных рекомбинантных белков. Средние диагностические титры составили 1:1600 для антисывороток к рекомбинантному белку *M. hyopneumoniae* и 1:1800 – для антисывороток к белку *M. bovis* (таблица).

Таблица – Оценка антигенных свойств рекомбинантных белков *M. hyopneumoniae* и *M. bovis* в серологических тестах

Рекомбинантный белок (антиген)	Диагностический титр специфических антисывороток в ИФА
<i>M. hyopneumoniae</i>	1:1600
<i>M. bovis</i>	1:1800
Контроль (ФСБ+адъювант)	<1:100

Антисыворотки были специфичны и не реагировали с гетерологичными антигенами.

Полученные данные согласуются с результатами других исследований, показывающих, что рекомбинантные мембранные белки сохраняют конформационно-зависимые эпитопы и проявляют выраженные антигенные свойства в серологических тестах [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами генной инженерии созданы стабильные рекомбинантные штаммы продуценты *E. coli* BL21(DE3) – EchrBL21p1 и EcBvBL21p1, обеспечивающие синтез мембранных белков *Mycoplasma hyopneumoniae* (около 46 кДа) и *Mycoplasma bovis* (около 36 кДа).

Разработана и апробирована эффективная схема очистки целевых белков,

включающая ультразвуковую дезинтеграцию биомассы и одноэтапную аффинную хроматографию (ИМАС) на смоле Nuvia ИМАС. Выход очищенного белка составляет 8,0–12,0 мг/л культуры, что достаточно для практического применения.

Экспериментально доказаны выраженные антигенные свойства полученных рекомбинантных белков. При иммунизации кроликов (оптимальная доза 200,0 мкг) индуцируются специфические антисыворотки, реагирующие с гомологичными антигенами в иммуноферментном анализе с титрами 1:1600–1:1800.

Оптимизированы условия постановки твердофазного ИФА для оценки антигенных свойств: сорбция антигена в карбонатном буфере при pH 9,4, концентрация 20,0 мкг/мл, использование обезжиренного молока для блокирования.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Razin, S. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas* / S. Razin, D. Yorgev, Y. Naot // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1998. – Vol. 62, № 4. – P. 1094–1156.
2. Nicholas, R. A. J. *Mycoplasma bovis: disease, diagnosis, and control* / R. A. J. Nicholas, R. D. Ayling // *Res. Vet. Sci.* – 2003. – Vol. 74. – P. 105–112.
3. *Review on the transmission of Mycoplasma hyopneumoniae in pig herds* / D. Maes [et al.] // *Vet. Res.* – 2008. – Vol. 39, № 1. – Art. 18.
4. Проблемы лабораторной диагностики микоплазмозов животных / П. Т. Сахарчук [и др.] // *Ветеринарная патология.* – 2018. – № 2. – С. 45–51.
5. Получение рекомбинантных антигенов для иммуноферментного анализа: стратегии и применение / О. В. Соколова [и др.] // *Биотехнология.* – 2019. – Т. 35, № 4. – С. 22–32.
6. *Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxin serotypes C and D* / Jr. C. Moreira [et al.] // *Anaerobe.* – 2016. – Vol. 40. – P. 58–62.

ВАКЦИНА ИНАКТИВИРОВАННАЯ ЭМУЛЬГИРОВАННАЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОЛИБАКТЕРИОЗА (ЭШЕРИХИОЗА) И КЛЕБСИЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

КОЛИТОКС-ЛТ

► изготовлена из штаммов бактерий *Escherichia coli* серотипов F41, K88 (F4), K99 (F5), A20 (F17); *Klebsiella pneumoniae*; рекомбинантной субъединицы В термолabile токсина *Escherichia coli*; масляного адъюванта



► термолabile энтеротоксин *E. coli* имеет белковую природу и обладает высокой иммуногенной активностью

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

WWW.BIEVM.BY

УДК 619:617.711/.713-002-022.6

Красочко П.П., доктор биологических наук, доцент¹
Красочко В.П., кандидат ветеринарных наук¹
Зубовская И.В., кандидат ветеринарных наук, доцент²
Черноков А.И., аспирант¹

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

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

ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ И ОПТИМИЗАЦИЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *MORAXELLA BOVIS* И *MORAXELLA BOVOCULI*

Резюме

Разработан мультиплексный метод ПЦР в режиме реального времени для одновременной детекции и дифференциации возбудителей инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота – *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*. Метод основан на использовании оригинальных праймеров и зондов к консервативным генам цитотоксинов *MbxA* и *MbvA*, что обеспечивает его высокую специфичность. Проведенная оптимизация показала чувствительность метода $3,8 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovis* и $6,5 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovoculi*, что позволяет эффективно выявлять как моно-, так и микст-инфекцию в клиническом материале.

Ключевые слова: инфекционный кератоконъюнктивит, крупный рогатый скот, *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi*, ПЦР, праймеры, диагностика.

Summary

A multiplex real-time PCR method has been developed for the simultaneous detection and differentiation of infectious agents of bovine keratoconjunctivitis - *Moraxella bovis* and *Moraxella bovoculi*. The method is based on the use of original primers and probes to the conserved genes of cytotoxins *MbxA* and *MbvA*, which ensures its high specificity. The optimization showed a sensitivity of $3,8 \times 10^3$ CFU/mL for *M. bovis* and $6,5 \times 10^3$ CFU/mL for *M. bovoculi*, which allows effective detection of both mono- and mixed-infection in clinical material.

Keywords: infectious keratoconjunctivitis, cattle, *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi*, PCR, primers, diagnostics.

Поступила в редакцию 01.12.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный кератоконъюнктивит (ИКК) крупного рогатого скота (КРС) является широко распространенной и экономически значимой болезнью, наносящей существенный ущерб животноводству во многих странах мира, включая Республику Беларусь и Российскую Федерацию [7]. Заболевание характеризуется острым контактиозным воспалением конъюнктивы и роговицы, приводящим к слезотечению, светобоязни, серозно-гнойным истечениям, помутнению, изъязвлению роговицы и, в конечном итоге, к частичной или полной потере зрения [5, 7]. Масштаб экономических потерь обуславливает необходимость разработки более эффективных мер контроля данной патологии. Экономические потери складываются из снижения молочной и мясной продуктивности, затрат на лечение,

а также преждевременной выбраковки животных [2, 8].

Этиологическая структура ИКК сложна и может включать различные инфекционные и инвазионные агенты. Однако, как показали многочисленные исследования, ведущая роль в возникновении типичных вспышек болезни принадлежит грамотрицательным бактериям рода *Moraxella*, в частности видам *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi* [5, 7, 8]. При этом часто отмечаются случаи смешанной инфекции, что дополнительно осложняет диагностику. *Moraxella bovis* долгое время считалась основным возбудителем ИКК, однако в 2007 г. был описан новый вид – *Moraxella bovoculi*, который также является высокопатогенным для КРС [8]. По данным исследований в хозяйствах Республики Беларусь в 90 % случаев ИКК выделя-

ются возбудители рода *Moraxella*, причем *Moraxella bovoculi* обнаруживается в 65 % случаев, а в 25 % – в ассоциации с *Moraxella bovis* [2]. Аналогичные данные получены и в Российской Федерации, где в 76 % обследованных хозяйств ИКК был вызван *M. bovoculi*, а в остальных – *M. bovis* [7].

Традиционная бактериологическая диагностика моракселлеза затруднена в связи с медленным ростом возбудителей на питательных средах, их низкой биохимической активностью, а также частой контаминацией проб сопутствующей микрофлорой [4, 6]. Это приводит к значительной задержке получения результата и снижает эффективность лечебно-профилактических мероприятий. Стандартные биохимические тесты, например на анализаторе VITEK 2 COMPACT, часто не позволяют провести видовую дифференциацию *M. bovis* и *M. bovoculi* [4]. В связи с этим наиболее точными методами идентификации признаны молекулярно-генетические методы (ПЦР) и масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) [4, 7]. В существующих в Республике Беларусь системах эпизоотологического учета ИКК часто не регистрируется ввиду отсутствия повсеместной лабораторной диагностики, что не отражает истинной распространенности патологии [4].

Как подчеркивают многие исследователи, бактерии рода *Moraxella* играют ведущую роль в этиологии инфекционного кератоконъюнктивита КРС, что обуславливает высокую экономическую значимость данной болезни и необходимость совершенствования мер по ее контролю. Ключевым элементом в системе контроля является точная и быстрая лабораторная диагностика, позволяющая идентифицировать патоген до вида. Существующие схемы лечения ИКК, в частности применение лечебного препарата или вакцины, могут продемонстрировать эффективность [1, 3], однако их успешное применение и контроль распространения инфекции в первую очередь зависят от своевременной и точной этиологической диагностики, позволяющей дифференцировать *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi* [4]. Низкие точность и скорость традиционных бактериологических методов, а также отсутствие в Республике Беларусь зарегистрированных средств специфической профилактики [5] создают устойчи-

вую потребность в разработке современных высокочувствительных инструментов молекулярной диагностики.

Таким образом, необходимость в разработке и внедрении высокоспецифичных, быстрых и точных методов диагностики ИКК, а также эффективных средств специфической профилактики является актуальной задачей современной ветеринарной науки и практики. Настоящее исследование посвящено подбору специфических праймеров и оптимизации мультимплексной ПЦР для одновременной детекции и дифференциации *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*, а также определению аналитической чувствительности метода и оптимизации условий постановки мультимплексной ПЦР. Это позволит усовершенствовать систему диагностики и эпизоотологического мониторинга инфекционного кератоконъюнктивита КРС.

Цель исследования – разработать мультимплексный метод ПЦР для специфического выявления *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на базе НИИ ПВМиБ УО ВГАВМ. В качестве ДНК-матрицы использовали ДНК из идентифицированных изолятов *M. bovis* и *M. bovoculi*, полученных от КРС с клиническими признаками кератоконъюнктивита. Идентификация изолятов была подтверждена масс-спектрометрией (MALDI-TOF).

Для подбора праймеров использовали нуклеотидные последовательности генов цитотоксина MbxA (для *M. bovis*) и MbvA (для *M. bovoculi*) из базы данных GenBank. Подбор олигонуклеотидов проводили с использованием программного обеспечения Primer3 и SnapGene. Для подбора олигонуклеотидов к *Moraxella bovis* использовали геномы штаммов SAM102599, SAM57954, Epp63, NCTC9426, SAM109237, SAM57947, SFS9a, а для *Moraxella bovoculi* – 2471-2, 4785, SFS9a, 371, 58069, 22581.

Выделение ДНК проводили с использованием набора «АртМагнит Вет». ПЦР в режиме реального времени ставили с использованием премикса «АртМикс ДНК-полимераза» и амплификатора Gentier 96. Оценку специфичности проводили с ДНК гетерологичных микроорганизмов

(вирус ИРТ КРС, хламидии, *E. coli*, *S. aureus* и др.). Чувствительность определяли методом серийных десятикратных разведений ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ключевой задачей являлся целенаправленный подбор праймеров, обеспечивающих специфичную детекцию каждого вида. Для этого в качестве мишеней были выбраны гены цитотоксинов MbxA (для *M. bovis*) и MbvA (для *M. bovoculi*) как высококонсервативные в пределах вида и вариабельные между видами. Для каждого гена с помощью биоинформатических методов было сконструировано по три кандидатных набора праймеров и зондов, из которых по результатам сравнительного ана-

лиза был выбран один оптимальный для каждого вида. Критериями для сравнительного анализа и итогового выбора служили:

- длина ампликона – приоритет отдавался наиболее коротким продуктам для сокращения времени амплификации;

- температура плавления – выбирались пары праймеров со схожей температурой плавления в диапазоне 58–62 °C для совместимости в мультиплексном формате;

- содержание GC – оптимальным считался уровень 45–60 % для обеспечения стабильной гибридизации.

Характеристики трех кандидатных наборов олигонуклеотидов представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Последовательности праймеров к гену MbxA у *M. bovis*

Шифр	Последовательность	Температура плавления	GC, %	Длина продукта, п.н.
Mb1-1	gcatttcactcgcccttgt	60	45	184
Mb1-2	gccttctgtctcggtacac	60	60	
Mb1-3	gcaggaactgaatcacgtga	59	50	
Mb2-1	aacgcattaagagcggaaaa	59	40	159
Mb2-2	acaaggcggaagtgaatgc	60	45	
Mb2-3	ggcaagaaagttgaagctgg	59	50	
Mb3-1	tggtgacgaccgcttgtt	60	53	63
Mb3-2	aatcatcgcccttcctccag	57	48	
Mb3-3	gtcgatcggtgccttaccacc	59	55	

Таблица 2 – Последовательности праймеров к гену MbvA у *M. bovoculi*

Шифр	Последовательность	Температура плавления	GC, %	Длина продукта, п.н.
Mbo1-1	cttgctgggcaaggtaaaa	60	45	185
Mbo1-2	ctggcggttcacaactca	59	45	
Mbo1-3	gtagacggcacacatgcaac	60	55	
Mbo2-1	cgtacagtggttaaagggtgata	57	45	105
Mbo2-2	tctcaattcataatcacgatactcaag	55	33	
Mbo2-3	gccaaagatactgcggtaggtaaacg	61	52	
Mbo3-1	tcggtgagttggcaggtatt	60	50	227
Mbo3-2	acttatgcgttcgcgagatt	59	45	
Mbo3-3	agtgaggccggtgtaata	59	50	

По совокупности критериев (минимальная длина ампликона, совместимые температуры плавления и оптимальное содержание GC) для дальнейшей работы и оптимизации мультиплексной ПЦР для *M. bovis* был выбран набор Mb3, а для *M. bovoculi* – набор Mbo2.

Специфичность отобранных олигонуклеотидов была проверена в серии перекрестных ПЦР. Реакции с ДНК *M. bovis* давали положительный сигнал только с набором Mb3, а с ДНК *M. bovoculi* – только с набором Mbo2, что подтвердило отсутствие

перекрестной реактивности и возможность их совместного использования в мультиплексном формате. Для оптимизации температуры отжига ПЦР проводили в диапазоне температур 58–62 °С. Анализ показал, что температура 58 °С является оптимальной для обоих наборов, поскольку при ней регистрировался максимальный относительный уровень флуоресценции (1693 у.е. для *M. bovis* и 1339 у.е. для *M. bovoculi*) при минимальном пороговом цикле (Ct). Данные по оптимизации температуры отжига приведены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – Результаты оптимизации температуры отжига для *M. bovis*

Температура отжига, °С	Наличие амплификации (C _t)	Пороговый цикл	Относительный уровень флуоресценции
58	положительно	19,4	1693
59,3	положительно	19,5	1642
60,2	положительно	19,6	1560
61,2	положительно	19,6	1592
62	положительно	19,6	1608

Таблица 4 – Результаты оптимизации температуры отжига для *M. bovoculi*

Температура отжига, °С	Наличие амплификации (C _t)	Пороговый цикл	Относительный уровень флуоресценции
58	положительно	19,6	1339
59,3	положительно	19,7	1285
60,2	положительно	19,8	1235
61,2	положительно	19,8	1215
62	положительно	19,9	1186

Настроенная мультиплексная ПЦР надежно детектировала как моно-, так и микст-инфекцию в одной реакции. Результаты тестирования мультиплексного формата представлены в таблице 5.

Аналитическую чувствительность определяли методом серийных десятикратных разведений ДНК, выделенной из суспензий бактерий с известной концентрацией (подтверждена чашечным методом).

Установленный предел детекции составил $3,8 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovis* и $6,5 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovoculi*. Подробные результаты определения чувствительности приведены в таблице 6.

Таблица 5 – Результаты выявления генома моракселл в мультиплексной ПЦР

Образец ДНК	Результат выявления генома	
	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovoculi</i>
<i>M. bovis</i>	положительно	отрицательно
<i>M. bovoculi</i>	отрицательно	положительно
<i>M. bovis</i> + <i>M. bovoculi</i>	положительно	положительно

Таблица 6 – Чувствительность ПЦР при выявлении генома моракселл

<i>M. bovis</i>		<i>M. bovoculi</i>	
концентрация, КОЕ/мл	результат ПЦР	концентрация, КОЕ/мл	результат ПЦР
$3,8 \times 10^8$	положительно	$6,5 \times 10^8$	положительно
$3,8 \times 10^7$	положительно	$6,5 \times 10^7$	положительно
$3,8 \times 10^6$	положительно	$6,5 \times 10^6$	положительно
$3,8 \times 10^5$	положительно	$6,5 \times 10^5$	положительно
$3,8 \times 10^4$	положительно	$6,5 \times 10^4$	положительно
$3,8 \times 10^3$	положительно	$6,5 \times 10^3$	положительно
$3,8 \times 10^2$	отрицательно	$6,5 \times 10^2$	отрицательно
$3,8 \times 10^1$	отрицательно	$6,5 \times 10^1$	отрицательно
$3,8 \times 10^0$	отрицательно	$6,5 \times 10^0$	отрицательно

Аналитическую специфичность оценивали, тестируя разработанную систему на панели ДНК гетерологичных микроорганизмов. Отрицательные результаты были получены с ДНК вируса ИРТ КРС, хламидий, а также ряда бактерий (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Bacillus subtilis* и других коагулазо-негативных стафилококков и стрептококков), что доказывает высокую специфичность метода и отсутствие ложноположительных результатов. Полные данные по оценке специфичности представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Оценка специфичности разработанного метода выявления генома моракселл

Наименование возбудителя	Результат ПЦР	Наименование возбудителя	Результат ПЦР
<i>M. bovis</i>	положительно	<i>Staphylococcus aureus</i>	отрицательно
<i>M. bovoculi</i>	положительно	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	отрицательно
ИРТ КРС	отрицательно	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	отрицательно
Хламидии	отрицательно	<i>Staphylococcus cohnii</i>	отрицательно
<i>Escherichia coli</i>	отрицательно	<i>Staphylococcus sciuri</i>	отрицательно
<i>Streptococcus sanguinus</i>	отрицательно	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	отрицательно
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	отрицательно	<i>Bacillus subtilis</i>	отрицательно

В результате сравнительного анализа для каждого вида был выбран один оптимальный набор, наилучшим образом отвечающий всем критериям:

- для *M. bovis* – праймеры Mb3-1 (5'-tggtgacgaccgcttggtt-3'): Tm = 60 °C, GC = 53 % и Mb3-2 (5'-aatcatgccttcattccag-3'): Tm = 57 °C, GC = 48 %, зонд Mb3-3 (5'-gtcgatcggtgcctttaccacc-3'): Tm = 59 °C, GC = 55 % с флуорофором флуоресцин (FAM). Длина ампликона – 63 п.н.;

- для *M. bovoculi* – праймеры Mbo2-1 (5'-cgtacagtggctaaagtgata-3'): Tm = 57 °C, GC = 45 % и Mbo2-2 (5'-tctcaattcataatcacgatactcaag-3'): Tm = 55 °C,

GC = 33 %, зонд Mbo2-3 (5'-gccaagatactgcggtaggtaaacg-3'): Tm = 61 °C, GC = 52 % с флуорофором гексахлорфлуоресцеин (HEX). Длина ампликона – 105 п.н.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования был успешно разработан и оптимизирован мультиплексный метод ПЦР в режиме реального времени для одновременной детекции и дифференциации *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*. Ключевым этапом работы стал целенаправленный подбор высокоспецифич-

ных праймеров и зондов к консервативным генам цитотоксинов MbxA и MbvA, который обеспечил отсутствие перекрестных реакций как между целевыми видами, так и с рядом других патогенов, вызывающих конъюнктивиты у КРС.

Экспериментальная оптимизация показала, что метод обладает высокой аналитической чувствительностью ($3,8 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovis* и $6,5 \times 10^3$ КОЕ/мл для *M. bovoculi*) и позволяет надежно выявлять как моно-, так и микст-инфекцию в рамках одной реакции. Установленная оптимальная температура отжига (58 °C)

обеспечивает максимальную эффективность амплификации для обоих наборов праймеров в мультиплексном формате.

Разработанная тест-система представляет собой быстрый, специфичный и чувствительный инструмент, который существенно расширяет возможности диагностики и эпизоотологического мониторинга инфекционного кератоконъюнктивита КРС. Его внедрение в практику позволит повысить точность этиологической диагностики и обоснованность проводимых лечебно-профилактических мероприятий.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бактерии рода *Moraxella* – возбудители инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота / Г. Н. Спиридонов, Л. Ш. Дуплева, А. Ф. Махмутов [и др.] // Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства : материалы Междунар. науч.-практ. конф., Йошкар-Ола, 20–21 марта 2025 г. – Йошкар-Ола : Марийский государственный университет, 2025. – С. 662–665. – EDN RTHHDR.
2. Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота в хозяйствах Республики Беларусь / М. А. Ананчиков, О. Н. Новикова, И. В. Зубовская [и др.] // Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария. – 2025. – № 1. – С. 21–25. – EDN JOVBJA.
3. Коба, И. С. Оценка терапевтической эффективности лекарственного препарата Тула-трин при инфекционном кератоконъюнктивите у крупного рогатого скота / И. С. Коба, Ю. В. Козлов, Д. Г. Решетникова // Ветеринария и кормление. – 2022. – № 3. – С. 48–50. – DOI 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2022-3-12. – EDN ECWWZB.
4. Красочко, В. П. Идентификация бактерий рода Моракселла / В. П. Красочко // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и болезней пчел в современных условиях : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 95-летию со дня рождения доктора ветеринарных наук, профессора Смирновой Нины Ивановны и Дню белорусской науки, Витебск, 07–08 декабря 2023 г. – Витебск : Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2024. – С. 103–105. – EDN UDOSLS.
5. Красочко, В. П. Роль бактерий рода Моракселла при инфекционном кератоконъюнктивите / В. П. Красочко // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и болезней пчел в современных условиях : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 95-летию со дня рождения доктора ветеринарных наук, профессора Смирновой Нины Ивановны и Дню белорусской науки, Витебск, 07–08 декабря 2023 г. – Витебск : Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2024. – С. 101–102. – EDN AAAUJS.
6. Тучков, Н. С. Эпизоотические культуры *Moraxella bovis*, их биологические свойства и вирулентность выделенных культур для телят / Н. С. Тучков, В. Н. Карайченцев, Н. П. Зуев // Молодые ученые – науке и практике АПК : Материалы Междунар. науч.-практ. конф. аспирантов и молодых ученых, Витебск, 25–26 апреля 2024 г. – Витебск : Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2024. – С. 484–487. – EDN ZCHFVN.
7. Этиология и клинично-эпизоотологические аспекты инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота / Г. Н. Спиридонов, Л. Ш. Дуплева, А. С. Заринов, И. Т. Хусаинов // Ученые записки Учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – 2018. – Т. 54, № 4. – С. 133–137. – EDN YUNYQX.
8. Этиология, способы профилактики и лечения при инфекционном кератоконъюнктивите крупного рогатого скота / С. Н. Семенов, А. Н. Лопанов, В. Н. Карайченцев [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2024. – № 6 (236). – С. 55–60. – DOI 10.53083/1996-4277-2024-236-6-55-60. – EDN IBNHWT.

УДК 619:616-076:578.842.1

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Родригез-Маллон А.А., руководитель проекта²
Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Згировская А.А., кандидат биологических наук¹
Герасименко В.И., младший научный сотрудник¹

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

²Центр генетической инженерии и биотехнологий, г. Гавана, Республика Куба

РАЗРАБОТКА ИФА-ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Резюме

Разработаны рекомбинантные антигены вируса африканской чумы свиней (АЧС) путем клонирования и экспрессии белков, кодируемых двумя генами данного вируса – p72 (B646L) и p30 (CP204L). Отработаны параметры адсорбции рекомбинантных белков вируса африканской чумы свиней и определены оптимальные концентрации компонентов ИФА-диагностикума для выявления антител к антигенам вируса АЧС. Разработан ИФА-диагностикум для выявления специфических антител к вирусу африканской чумы свиней. Проведена иммунизация кроликов и получены специфические сыворотки к вирусу АЧС. Проведен подбор оптимальных концентраций компонентов диагностикума для выявления антител к антигену вируса АЧС. Проведена проверка разработанного ИФА-диагностикума по показателю специфичности и чувствительности.

Ключевые слова: африканская чума свиней, рекомбинантные антигены, ИФА-диагностикум, специфичность, чувствительность.

Summary

Recombinant antigens of the African swine fever virus (ASF) have been developed by cloning and expressing proteins encoded by two genes of this virus: p72 (B646L) and p30 (CP204L). The parameters of adsorption of recombinant proteins of the African swine fever virus have been worked out and optimal concentrations of ELISA diagnostic components have been determined for the detection of antibodies to antigens of the African swine fever virus. An ELISA diagnosticum has been developed to detect specific antibodies to the African swine fever virus. Rabbits were immunized and specific serums for the African swine fever virus were obtained. The selection of optimal concentrations of diagnostic components for the detection of antibodies to the ASF virus antigen was carried out. The developed ELISA diagnostic was tested in terms of specificity and sensitivity.

Keywords: African swine fever virus, Recombinant antigens, ELISA diagnostic, specificity, sensitivity.

Поступила в редакцию 28.11.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) – вирусная болезнь, характеризующаяся высокой контагиозностью. Возбудителем заболевания является ДНК-содержащий вирус семейства *Asfarviridae* с размером вириона 175–215 нм [1]. В естественных условиях к АЧС восприимчивы домашние и дикие свиньи всех возрастов. Скорость распространения и степень патогенности вируса АЧС таковы, что эта инфекция способна в короткие сроки (3–5 месяцев) привести к огромным экономическим потерям или даже полной утрате поголовья свиней [2, 3].

Эпизоотологическая особенность АЧС заключается в чрезвычайно быстром

изменении форм течения инфекции среди домашних свиней – от острого со 100%-ной летальностью до хронического и бессимптомного носительства и непредсказуемого распространения.

Для эффективного использования различных методов диагностики АЧС, направленных на выявление возбудителя или специфических антител, следует учитывать особенности протекания болезни и ее формы. При сверхострой и острой формах выявление вирусспецифических антител возможно только в пробах селезенки, так как специфические антителопродуцирующие клетки и, следовательно, антитела появляются там на 2-3-и сутки после инфицирования, в то время как животные

гибнут уже на 3–7-е сутки [4]. При подостром и хроническом течении болезни вирусспецифические антитела в крови появляются на 7–10-е сутки, до этого времени целесообразно проводить выявление вирусного антигена или генома в крови, так как данный период течения АЧС характеризуется вирусемией [5].

Одним из перспективных методов определения вирусных антигенов и антител к ним является иммуноферментный анализ (ИФА). Его преимущества заключаются в высокой специфичности, скорости и простоте постановки реакции, сравнительно невысокой стоимости и универсальности применяемого оборудования, возможности автоматизации процедуры анализа. За последнее десятилетие произошли значительные изменения в технологии производства ИФА-наборов, обусловленные результатами научно-практических разработок, связанных с применением моноклональных антител (МкА), которые практически полностью вытеснили поликлональные не только в «сэндвич»-вариантах ИФА, предназначенных для обнаружения антигена, но и в большинстве тест-систем, направленных на выявление антител, где они используются в качестве конъюгатов или для адсорбции антигена [6, 7]. Помимо этого, в качестве компонентов ИФА эффективно используются рекомбинантные антигены, обладающие иммунохимическими свойствами нативных белков и представляющие собой хорошо охарактеризованные и стандартизированные препараты [8, 9, 10].

Целью настоящей работы явилась разработка иммуноферментного диагностического теста для выявления антител к вирусу африканской чумы свиней.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований совместно с организацией-партнером – Центром инженерии и биотехнологий (Куба).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в отделе вирусных инфекций, отделе молекулярно-генетической диагностики и геномной инженерии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и в

Центре инженерии и биотехнологий (Куба).

Получение рекомбинантных антигенов. Рекомбинантные белки вируса АЧС были предоставлены Центром инженерии и биотехнологий (Куба). Получение рекомбинантных антигенов вируса АЧС осуществлялось путем клонирования и экспрессии белков, кодируемых двумя генами данного вируса: р72 (B646L) и р30 (CP204L). Ген р72 отвечает за синтез капсидного белка, который играет ключевую роль в формировании структуры вириона, ген р30 кодирует также белок оболочки вириона, который участвует в процессах взаимодействия вируса с клетками-хозяевами и обеспечения его инфекционных свойств. Организация-партнер предоставила краткую информацию о методах контролирования полученных генов и клонирования векторов.

Оптимизацию генов проводили с помощью онлайн программных инструментов (CodonOptimizationTool). Необходимые фрагменты нуклеотидных последовательностей для получения генов были синтезированы искусственно. Последовательность оптимизированного гена разбивали на несколько перекрывающихся фрагментов (250–300 п.н. каждый). Эти фрагменты затем подверглись гибридизации, после чего проводилась ПЦР-амплификация с использованием праймеров, комплементарных крайним 5'- и 3'-концам целевого гена. Полученные гены были клонированы в векторы рЕТ24а и рЕТ-24b. Данные конструкции трансформировали в компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3). Культивирование проводили на среде LB. Полученную биомассу клеток после верификации лизировали ультразвуком и очищали с использованием метода аффинной хроматографии на основе 6xHis-тега (6xHis-тег – это последовательность из шести гистидиновых аминокислотных остатков (His-His-His-His-His-His), которая добавляется к N-концу (иногда к C-концу) целевого белка. Гистидин обладает высокой аффинностью (сродством) к ионам никеля (Ni^{2+}) и кобальта (Co^{2+}). Это свойство используется для очистки рекомбинантного белка с помощью аффинной хроматографии (колонки для хроматографии Econo-Pac® Chromatography Columns,

Pkgof 50 #7321010 с сорбентом, сорбент Nuvia™ IMACResin, 25 ml #7800800). Очищенные рекомбинантные белки были количественно определены с использованием метода Брэдфорда [11].

Адсорбция рекомбинантных белков. В исследовании использовались полистироловые иммунные планшеты ОАО «Фирма Медполимер» и «Sarstedt» (Германия). Реактивы для постановки ИФА-анализа приобретены в фирме «Sigma» (США).

При отработке параметров адсорбции полученных рекомбинантных белков вируса АЧС на полистироловых планшетах использовали различные концентрации белка – 2,0 мкг/мл, 3,0 мкг/мл, 3,5 мкг/мл. Объем внесенного белка в лунку составлял 100,0 мкл (эта величина была постоянной). Время адсорбции было разным – 16 ч и 24 ч. Адсорбцию белка проводили при температуре плюс 4 °С и при комнатной температуре. Для адсорбции рекомбинантных белков на поверхности полистиролового планшета использовали три различных адсорбирующих буфера: 0,05 М Na-гидрокарбонатный буфер, pH 9,5; 0,025 М Na-фосфатный буфер, pH 7,5; 0,1 М глицин-HCl буфер, pH 2,8.

В качестве промывочного раствора использовали 0,05 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0,2 М CaCl₂ (ФСБ) и 0,05%-ный раствор твина-20 (ФСБТ) с добавлением 1%-ного раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ФСБ.

Схема постановки ИФА: адсорбция рекомбинантных белков, которые в данном случае будут выступать как антиген, отмывка несвязавшихся белков промывочным буфером, внесение антисывороток к вирусу АЧС, инкубация с антигеном в течение 1,5 ч. Планшет промывали три раза промывочным раствором. Для выявления комплекса антиген+антитело в лунки вносили конъюгат и инкубировали в течение 60 мин, после чего содержимое из лунок удаляли, трижды промывали промывочным раствором, вносили хромоген-субстрат, содержащий 0,1%-ный раствор ортофенилендиамина, 0,05%-ную концентрацию H₂O₂ и 0,1%-ный раствор цитрата натрия, и останавливали реакцию внесением стоп-раствора (10%-ный раствор серной

кислоты). Учет результатов ИФА проводили, измеряя оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Реакцию учитывали, если отношение между показателями оптической плотности положительного и отрицательного контролей K⁺/K⁻ составляло ≥1,5 (коэффициент повышения оптической плотности).

Для получения антисывороток к рекомбинантным белкам вируса иммунизировали лабораторных животных – клинически здоровых кроликов живой массой 2,5–3,0 кг. В качестве адъюванта использовали минеральное масло Montanide ISA 70. Иммунизацию проводили по схеме: антиген АЧС (образцы рекомбинантных белков № 1, № 2, № 3) вводили внутримышечно в область поясницы по 0,5 мг белка в две точки с 0,5 мл Montanide ISA 70 (1:1). Через 7, 14 и 21 день и в дальнейшем – через 3 недели в течение 3 месяцев вводили рекомбинантные белки внутримышечно в возрастающих дозах: 0,75; 1,0; 1,2 и 1,5 мг. Через 10 суток после заключительной инъекции брали кровь для контроля накопления антител. Продолжительность цикла иммунизации составила 3 месяца. К образцам рекомбинантных белков № 1, № 2, № 3 получены антисыворотки № 1, № 2, № 3, которые проверяли на наличие белка методом Брэдфорда. Титр антител проверяли в реакции ИФА в тест-системе INGEZIM PPA DAS («Ingenasa», Испания).

Для разрабатываемого ИФА-диагностикума использовали рекомбинантные белки вируса АЧС, которые вносили по 100,0 мкл в лунки панели с концентрацией антигена 3,0 мкг/мл по методике, описанной выше.

Антисыворотки крови разводили 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 в pH 7,4 (0,02 М фосфатно-солевой буфер) и вносили по 100,0 мкл в соответствующие лунки иммунологической панели. Панели закрывали крышкой и инкубировали при температуре 37 °С в течение 60 мин.

Рабочий раствор антикроличьего конъюгата с пероксидазой хрена («Sigma») вносили во все лунки панели по 100,0 мкл. Панель закрывали крышкой и переносили в термостат, выдерживали при температуре 37 °С в течение 1 ч. Затем лунки освобождали от содержимого путем стряхивания и 3-кратно промывали, внося по

0,25 мл 0,02 М фосфатно-солевого буфера pH 7,4 в каждую лунку.

Затем во все лунки панели вносили по 100,0 мкл субстратного буферного раствора (ТМБ). После внесения субстратной смеси панели помещали в темное место, через 15–20 мин реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 100,0 мкл раствора серной кислоты с массовой долей 10 %.

Сравнение сконструированного диагностикума по параметрам чувствительности и специфичности провели с использованием тест-системы INGEZIM PPA DAS («Ingenasa», Испания). Для проведения исследований по определению чувствительности и специфичности использовали референсные свиные сыворотки (3 положительных сыворотки и 1 отрицательная), предоставленные Центром генетической инженерии и биотехнологий (Куба).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Важнейшей задачей создания качественных наборов является стандартизация технологических операций процесса изготовления изделия, в первую очередь стандартизация нанесения на поверхность лунок полимерных планшетов рекомбинант-

ных белков. Известно, что при адсорбции белков на поверхность пластиковых планшетов большинство молекул теряет свою активность. Это было подробно изучено в работах группы J.K. Jancovich [3]. Было обнаружено, что около 75 % антигенов и более 90 % антител утрачивают свою биологическую активность после того, как их подвергали обычной для ИФА процедуре – пассивной адсорбции на поверхность пластиковых планшетов в карбонатном буфере (pH 9,6).

Для адсорбции рекомбинантных белков нами был использован метод пассивной адсорбции.

Вариабельность таких параметров, как состав буфера для покрытия планшета, условия адсорбции антигенов, температурно-временные режимы инкубации напрямую влияют на воспроизводимость и сопоставимость полученных результатов. Перечисленные параметры существенно влияют на плотность и однородность адсорбции антигена, уровень неспецифического фона, долговременную стабильность покрытия.

Результаты отработки параметров постановки ИФА с рекомбинантными белками представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Оработка параметров адсорбции полученных рекомбинантных белков вируса АЧС на полистироловых планшетах

Используемые буферы	Показатель ΔОП К+/К-						
	концентрация белка, мкг/мл			время адсорбции, ч		температура адсорбции	
	2,0	3,0	3,5	16	24	комнатная	4 °С
0,05 М Na-гидрокарбонатный буфер, pH 9,5	1,5±0,05	2,4±0,07	2,35±0,03	2,1±0,07	1,9±0,01	1,9±0,02	2,5±0,01
0,025 М Na-фосфатный буфер, pH 7,5	1,6±0,03	2,0±0,08	2,0±0,01	2,1±0,09	2,0±0,03	1,98±0,05	2,0±0,03
0,1 М глицин-HCl буфер, pH 2,8.	1,4±0,02	1,5±0,05	1,5±0,04	1,6±0,03	1,63±0,05	1,87±0,03	1,9±0,03
Контроль с 0,1 М КББ с pH 9,4 (коммерческая тест-система)	1,5±0,05	2,4±0,07	2,35±0,05	2,1±0,04	1,9±0,01	2,0±0,01	2,5±0,09

Как видно из таблицы 1, наиболее оптимальными параметрами постановки ИФА с рекомбинантными белками являются использование 0,05 М Na-гидрокарбонатного буфера с pH 9,5, концентрация белка для адсорбции на планшеты 3,0 мкг/мл (меньшая концентрация белка

приводит к уменьшению показателя ΔОП К+/К- по сравнению с контролем, а увеличение концентрации не приводит к большей плотности адсорбции белка на поверхности планшета). По времени адсорбции белка на поверхности планшета достаточно 16 ч, при такой длительности ад-

сорбции величина показателя $\Delta\text{ОП К+К-}$ составляет 2,1, как и в контроле. Установлено, что адсорбцию лучше всего проводить при температуре плюс 4 °С.

После иммунизации рекомбинантными антигенами № 1, № 2, № 3 у всех кроликов в сыворотке крови выработались

антитела, т.е. на данные белки у животных наблюдается иммунный ответ. В таблице 2 представлены результаты проверки сывороток крови иммунизированных кроликов на наличие антител к вирусу АЧС методом ИФА.

Таблица 2 – Результаты изучения иммунологических свойств рекомбинантных антигенов при внутримышечном введении

Показатели	Титры антител				
	400	800	1600	3200	6400
№ 1 $\Delta\text{ОП К+К-}$	4,3±0,6	3,0±0,03	1,9±0,03	1,2±0,02	1,0±0,02
№ 2 $\Delta\text{ОП К+К-}$	4,3±0,04	3,1±0,04	1,8±0,01	1,1±0,03	0,9±0,01
№ 3 $\Delta\text{ОП К+К-}$	4,0±0,01	2,8±0,08	1,7±0,04	1,1±0,06	0,8±0,02

Как видно из таблицы 2, во всех полученных сыворотках уровень антител достаточно высокий даже при большом разведении (1:1600). Значения показателя $\Delta\text{ОП К+К-}$ составляли 1,9 (образец № 1), 1,8 (образец № 2) и 1,7 (образец № 3). Наилучшими иммуногенными свойствами обладают рекомбинантные белки № 1 и № 2: показатель $\Delta\text{ОП К+К-}$ составил 4,3 при разведении сыворотки № 1 1:400 и 3,0 – при разведении 1:800. ИФА считается положительной при величине показателя $\Delta\text{ОП К+К-}$ больше 1,5. Для образца № 2 эти показатели составили 4,3 при разведении 1:400, 3,1 – при разведении 1:800 и 1,8 – при разведении 1:1600.

В дальнейшей работе использовали антисыворотки, полученные при иммуниза-

ции антигеном вируса АЧС № 1 (значение показателя $\Delta\text{ОП К+К-}$ 1,9 при разведении сыворотки 1:1600).

Успех разработки ИФА-диагностикума зависит от правильного подбора концентрации и вида белковых блокаторов. Для этого могут быть использованы бычий сывороточный альбумин, обезжиренное молоко, альбумин, эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота. Стабильные и воспроизводимые результаты при разработке ИФА были получены при сорбции антигена в 0,05 М Na-гидрокарбонатном буфере с pH 9,5 и блокировании панелей 0,4%-ным сухим обезжиренным молоком – значение $\Delta\text{ОП К+К-}$ составило 2,4 (таблица 3).

Таблица 3 – Эффективность предотвращения неспецифической сорбции при постановке ИФА

Показатели	Варианты блокировки панели (0,1 М КББ с pH 9,4)			
	0,1%-ный БСА	0,4%-ное молоко	0,1%-ный альбумин	0,1%-ная эмбриональная сыворотка
$\Delta\text{ОП К+К-}$	1,9±0,04	2,4±0,01	2,1±0,01	1,9±0,04

На сенсibilизированных иммунологических панелях разных производителей с буфером КББ при блокировке молоком результаты были получены равнозначные, значение $\Delta\text{ОП К+К-}$ составило 2,4.

При оптимизации условий обнаружения антител к рекомбинантному белку сравнивали:

- иммунологические панели разных производителей (АО «Фирма Медполимер», РФ, «Sarstedt», Германия) по способности связывать рекомбинантный антиген АЧС;

- влияние условий сорбции антигена (pH 5,0 – 0,02 М ацетатного буфера (АцБ), pH 7,2 – 0,02 М фосфатно-солевого буфера (ФСБ-Т); pH 8,0 – 0,02 М ФСБ-Т), pH 9,4 – 0,1 М КББ) на результаты ИФА;

- время и температуру сорбции (60 мин при 37 °С и 16 ч при 4 °С);

- влияние условий блокировки (молоко, БСА, эмбриональная сыворотка КРС) на результаты ИФА.

В таблице 4 показаны результаты ИФА на сенсibilизированных иммунологических панелях разных производителей.

Как видно, лучшие результаты были получены на панелях «Sarstedt» (Германия), на которых ΔОП К-/К+ составила 2,3, поэтому в дальнейших исследованиях мы использовали иммунологические панели данного производителя.

В таблице 5 представлены результаты изучения влияния условий сорбции антигена на результаты ИФА в зависимости от буферного раствора и его pH.

Таблица 4 – Сорбционная способность иммунологических панелей разных производителей к рекомбинантному антигену в конкурентном ИФА

Показатели	Иммунологические панели	
	АО «Фирма Медполимер», РФ	«Sarstedt», Германия
ОП 450 нм К+	0,4±0,09	0,34±0,06
ОП 450 нм К-	0,85±0,05	0,79±0,08
ΔОП К-/К+	2,1	2,3

Таблица 5 – Влияние состава буферного раствора и его pH на сорбцию рекомбинантного антигена в конкурентном ИФА

Показатели	Показатель pH при сорбции антигена			
	5,0	7,2	8,0	9,4
	АцБ	ФСБ-Т	ФСБ-Т	КББ
ОП 450 нм К+	0,34±0,07	0,36±0,07	0,38±0,05	0,38±0,012
ОП 450 нм К-	0,69±0,15	0,85±0,05	0,92±0,05	0,95±0,03
ΔОП К-/К+	2,02	2,36	2,42	2,50

Лучшие показатели были получены при сорбции антигена в 0,02 М фосфатно-солевом буфере с pH 7,2 – показатель ΔОП К-/К+ составил 2,5 (при инкубации 60 мин и температуре 37 °С). Увеличение времени контакта до 16 ч при температуре 4 °С повышало показатель ΔОП до 2,6.

Сорбционная способность антигена рекомбинантного белка при внесении на

иммунологические панели «Sarstedt» исследовалась в концентрации 10,0; 20,0; 30,0 и 40,0 мкг/мл на карбонатно-бикарбонатном буфере с pH 9,4 (таблица 6).

В таблице 7 приведены результаты тестирования референсных сывороток с помощью сконструированного диагностического по сравнению с коммерческой тест-системой.

Таблица 6 – Сорбционная способность иммунологических панелей в концентрации антигена 10,0; 20,0; 30,0 и 40,0 мкг/мл

Показатели	Концентрация антигена, мкг/мл			
	10,0	20,0	30,0	40,0
ОП 450 нм К+	0,35±0,06	0,36±0,07	0,37±0,06	0,36±0,011
ОП 450 нм К-	0,83±0,13	1,10±0,06	1,04±0,07	0,95±0,04
ΔОП К-/К+	1,9	2,4	2,49	2,64

Таблица 7 – Результаты сравнительного изучения специфичности и чувствительности разработанного ИФА-диагностического и коммерческой тест-системы

Тест-системы	Референсные сыворотки, значения оптической плотности											
	№ 1			№ 2			№ 3			№ 4		
	разведения сывороток											
	1:10	1:20	1:30	1:10	1:20	1:30	1:10	1:20	1:30	1:10	1:20	1:30
INGEZIM PPA DAS	1,678	1,112	0,800	0,549	0,986	1,440	0,742	1,098	1,645	0,799	1,021	1,329
ИФА-диагностикум	1,599	1,099	0,799	0,547	1,038	1,378	0,701	1,012	1,628	0,753	1,009	1,313
Статистическая значимость	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Примечание – * $p < 0,05$

На основании проведенных сравнительных исследований (таблица 7) можно с уверенностью сказать, что разработанный ИФА-диагностикум обладает чувствительностью и специфичностью.

При исследовании 4 референсных сывороток в разведениях 1:10, 1:20, 1:30 значения оптической плотности, полученные при проверке в тест-системе INGEZIM PPA DAS и в разработанном диагностикуме, совпали.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны рекомбинантные антигены вируса АЧС путем клонирования и экспрессии белков, кодируемых двумя генами данного вируса – р72 (B646L) и р30 (CP204L).

2. Отработаны параметры адсорбции рекомбинантных белков вируса АЧС и определены оптимальные концентрации компонентов ИФА-диагностикума для выявления антител к антигенам вируса АЧС:

- использование иммунологических панелей «Sarstedt» (Германия);

- сенсibilизация иммунологических панелей в концентрации 20,0–40,0 мкг/мл рекомбинантного антигена АЧС;

- сорбирование антигена при рН 9,5 в 0,1М карбонатно-бикарбонатном буфере 60 мин при температуре плюс 37 °С;

- введение в буферный раствор для блокировки панелей 0,4%-ного обезжиренного молока.

3. Разработан ИФА-диагностикум для выявления специфических антител к АЧС свиней.

4. Проведена иммунизация кроликов и получены специфические сыворотки к вирусу АЧС.

5. Подобраны оптимальные концентрации компонентов диагностикума для выявления антител к антигену вируса АЧС, обеспечившие положительный результат в ИФА по показателю ΔОП К-/К+ со значением 3,65.

6. Проведена проверка разработанного ИФА-диагностикума по показателю специфичности и чувствительности в сравнении с коммерческой тест-системой INGEZIM PPA DAS («Ingenasa», Испания).

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Кашкин, К. П. Методические разработки по клинической иммунологии / К. П. Кашкин, Е. Н. Степанова, Л. М. Скуинь. – М. : Медицина, 1997. – 518 с.
2. Gladue, D. P. Recombinant ASF live attenuated virus strains as experimental vaccine candidates / D. P. Gladue, M. V. Borca // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 5. – P. 878.
3. Viral vector vaccines against ASF: Problems and perspectives / R. K. Ravilov [et al.] // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2022. – Vol. 9. – P. 830244.
4. Vaccination with a gamma irradiation-inactivated African swine fever virus is safe but does not protect against a challenge / J. Pikalo [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 832264.
5. Adenovirus-vectored African Swine Fever Virus antigen cocktails are immunogenic but not protective against intranasal challenge with Georgia 2007/1 isolate / S. Lokhandwala [et al.] // *Veterinary microbiology*. – 2019. – Vol. 235. – P. 10–20.
6. A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies, for the detection of african swine fever virus antigens and antibodies / M. I. Vidal, M. Stiene, J. Henkel [et al.] // *J. Virol. Methods*. – 1997. – 66 (2). – P. 211–218.
7. World Organization of Animal Health (OIE). African swine fever. Manual of Standards for diagnostic test and vaccines. – 2008.
8. High doses of inactivated African swine fever virus are safe, but do not confer protection against a virulent challenge / E. Cadenas-Fernández [et al.] // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9. – № 3. – P. 242.
9. Immunization of pigs by DNA prime and recombinant vaccinia virus boost to identify and rank African swine fever virus immunogenic and protective proteins / J. K. Jancovich [et al.] // *Journal of virology*. – 2018. – Vol. 92. – № 8. – P. 10.1128/jvi. 02219-17.
10. DNA-protein vaccination strategy does not protect from challenge with African swine fever virus Armenia 2007 strain / S. Y. Sunwoo [et al.] // *Vaccines*. – 2019. – Vol. 7, № 1. – P. 12.
11. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol.72, № 1-2. – P. 248–254.

УДК 619:616.98:578:636.4

Красочко П.П., доктор биологических наук, доцент¹
Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент²
Кайсюань Би, аспирант¹

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

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

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ

Резюме

В репродуктивной патологии свиней особую роль играет вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС). Для быстрого, высокочувствительного и специфичного обнаружения вирусного генома широкое распространение получили молекулярно-биологические методы, в первую очередь полимеразная цепная реакция (ПЦР). Современные разработки направлены на создание диагностических тест-систем, которые позволяют с высокой эффективностью выявлять геном возбудителя в образце, что значительно сокращает время и стоимость тестирования. Разработанный метод позволяет выявлять геном вируса РРСС в разном биологическом материале (сыворотка крови, паренхиматозные органы, изоляты вируса) с высокой чувствительностью.

Изучение вышеуказанной инфекции показало ее широкое распространение в патологии свиней. Так, серопозитивность свиней к вирусу РРСС на отдельных свинокомплексах составляет 77,5 %.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, распространение, вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней, позитивность.

Summary

In the reproductive pathology of pigs, the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (RRSS) plays a special role. For the rapid, highly sensitive and specific detection of the viral genome, molecular biological methods, primarily polymerase chain reaction (PCR), have become widespread. Modern developments are aimed at creating diagnostic test systems that allow high efficiency to identify the pathogen genome in the sample, which significantly reduces the time and cost of testing. The developed method makes it possible to identify the RRSS virus genome in various biological material (blood serum, parenchymal organs, virus isolates) with high sensitivity.

The study of the above infection showed its widespread distribution in the pathology of pigs. Thus, the seropositivity of pigs to the PRRS virus on individual pig farms is 77,5 %.

Keywords: polymerase chain reaction, spread, porcine reproductive-respiratory syndrome virus, positivity.

Поступила в редакцию 14.10.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

В репродуктивной патологии свиней наибольшую роль играют вирусы репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС), цирковир 2 типа (ЦВС-2), вирус гриппа свиней, парвовирус (ПВС) и в меньшей степени – вирус классической чумы свиней (КЧС) и вирус болезни Ауески из-за обязательной вакцинации и благополучия свинокомплексов по данным болезням в Республике Беларусь. Особую роль в репродуктивной патологии свиней играет вирус РРСС.

Для эффективного мониторинга, контроля и проведения дифференциальной диагностики разработано множество лабораторных методов. Традиционные методы,

такие как вирусная изоляция и серологические анализы, включая иммуноферментный анализ, позволяют выявлять вирус или антитела к нему. Однако для быстрого, высокочувствительного и специфичного обнаружения вирусного генома, особенно в условиях коинфекций и генетической гетерогенности, широкое распространение получили молекулярно-биологические методы, в первую очередь полимеразная цепная реакция (ПЦР). Современные разработки направлены на создание диагностических систем, которые позволяют с высокой эффективностью выявлять возбудителей методом ПЦР, что значительно сокращает время и стоимость тестирования [6].

Целью настоящей работы явилась разработка метода выявления нуклеиновых кислот вируса РРСС методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных, на кафедре эпизоотологии и инфекционных болезней УО ВГАВМ, лаборатории молеку-

лярной биологии Института ветеринарной медицины Внутреннего Монгольского аграрного университета (Китайская Народная Республика).

Для оценки распространённости РРСС использовали результаты диагностических исследований, выполненных в УО ВГАВМ в период 2018–2022 гг., для выявления генома вируса РРСС – олигонуклеотиды, предложенные Всемирной организацией здоровья животных (таблица 1).

Таблица 1 – Последовательности олигонуклеотидов для выявления геном вируса РРСС

Наименование вируса	Шифр олигонуклеотида	Последовательность
РРСС	EU-1 F	5'-GCA-CCA-CCT-CAC-CCR-RAC-3'
	EU-2 F	5'-CAG-ATG-CAG-AYT-GTG-TTG-CCT-3'
	EU-1 R	5'-CAG-TTC-CTG-CRC-CYT-GAT-3'
	EU-2 R	5'-TGG-AGD-CCT-GCA-GCA-CTT-TC-3'
	Probe EU-1	5'-(6-HEX)-CCT-CTG-YYT-GCA-ATC-GAT-CCA-GAC-(BHQ1)
	Probe EU-2	5'-(HEX)-ATA-CAT-TCT-GGC-CCC-TGC-CCA-YCA-CGT-BHQ1

В качестве положительного контроля использовали штамм вируса РРСС «КМИЭВ-V112» (РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского»).

Для оценки специфичности метода в качестве положительных образцов использовали РНК, выделенную из патологического материала (кровь, сыворотка, кусочки паренхиматозных органов от свиней и поросят), с подтверждённым наличием нуклеиновых кислот вируса РРСС с помощью коммерческих тест-систем, а также гетерологичные штаммы вирусов и бактерий, потенциально инфицирующие свиней: вирус КЧС (КМИЭВ-V113), вирус болезни Ауески (штамм «ГНКИ»), *Escherichia coli* (штамм ATCC 25922), *Salmonella enterica* (ATCC ВАА-2162), *Streptococcus suis* (изолят УО ВГАВМ), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619).

Для выделения РНК использовали коммерческие наборы для выделения нуклеиновых кислот «Рибо-Преп», «Рибо-Сорб» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), «АртДНК» (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь). Для выявления генома вируса РРСС использовали коммерческие наборы «АртТест

РРСС» (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь) и «Тест-система «РРСС» для выявления и генотипирования вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней методом полимеразной цепной реакции» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ), «Набор реагентов «ПЦР-РРСС-ФАКТОР» (ООО «ВЕТ ФАКТОР», Россия).

ПЦР ставили в режиме реального времени с использованием амплификатора «Rotor Gene 3000». Учёт реакции проводили в соответствии с инструкциями к диагностическим наборам.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведенные нами ранее исследования по распространённости РРСС в Республике Беларусь показали актуальность разработки средств быстрой и эффективной диагностики [1, 4].

Анализ проведенных в отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней УО ВГАВМ (ранее – лаборатория биотехнологии научно-исследовательского института прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии УО ВГАВМ) серологических исследований показал высокий процент положитель-

ных проб сывороток крови: из 267 образцов, исследованных в период 2020–2022 гг., 207 были положительными на наличие специфических антител к вирусу РРСС, что составляет 77,5 %. Исследования по выявлению генома вируса не были столь обширны, но при выявлении положительной пробы 90–100 % проб из этой же группы содержали геном РРСС.

Высокий уровень серопозитивности является следствием вакцинации против данного возбудителя, т.к. в настоящее время в Республике Беларусь лишь единичные свинокомплексы, как правило, племенные или специализирующиеся на откорме, не проводят вакцинацию. Несмотря на проводимые профилактические мероприятия, РРСС остается актуальной проблемой свиноводства ввиду высокой вариабельности вируса. Вакцины не обеспечивают стерильного иммунитета, и животные на фоне вакцинации остаются носителями вируса, что создает угрозу заражения неиммунизированного поголовья и, как следствие,

приводит к выявлению положительных проб методом ПЦР в вакцинированном стаде.

Для разработки метода выявления генома вируса РРСС первоначально были протестированы олигонуклеотиды к вирусу РРСС в реакции ПЦР с предложенными в методике условиями:

- состав реакционной смеси: праймеры – по 10,0 пмоль, олигонуклеотидные зонды – по 5,0 пмоль, ArtMix ревертаза (5×) – 5,0 мкл, деионизированная вода – до 15,0 мкл; выделенная РНК – 10,0 мкл;

- условия ПЦР: обратная транскрипция – 55 °С 10 мин; денатурация – 95 °С 2 мин; 45 циклов, состоящих из денатурации при 95 °С 5 с, отжига при 60 °С 15 с, элонгации при 67 °С 15 с; учет флуоресценции после стадии отжига.

В качестве испытуемых образцов выступали штамм вируса РРСС «КМИЭВ-V112» и положительные образцы клинического материала с подтвержденным содержанием РНК вируса (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты выявления генома вируса РРСС

Наименование испытуемого материала	Количество проб	Результат
Штамм «КМИЭВ-V112»	1	положительный
Положительные сыворотки крови	8	положительный (8 проб)
Отрицательные сыворотки крови	20	отрицательный (20 проб)
Положительный патологический материал	9	положительный (9 проб)
Отрицательный патологический материал	19	отрицательный (19 проб)

Как видно из таблицы, используемые олигонуклеотиды достоверно позволяют выявить РНК вируса РРСС в сыворотках крови и патологическом материале, инфицированном циркулирующими в свиноводческих хозяйствах штаммами вируса РРСС.

Далее отработанный метод выявления генома вируса РРСС протестирован со следующими условиями:

- состав реакционной смеси: праймеры к вирусу РРСС – 5,0 пмоль, ArtMix ревертаза (5×) – 5,0 мкл, деионизированная вода – до 15,0 мкл; выделенные нуклеиновые кислоты 10,0 мкл;

- условия ПЦР: обратная транскрипция – 55 °С 10 мин; денатурация 95 °С 2 мин; 45 циклов, состоящих из денатурации при 95 °С 5 с, отжига при 60 °С 15 с, элонгации при 67 °С 15 с; учет флуоресценции после стадии отжига (канал HEX соответствует вирусу РРСС).

Для оценки относительной чувствительности метода были подготовлены смеси нуклеиновых кислот, содержащих РНК выявляемого вируса в различных вариантах, и РНК из патологического материала, проведены ПЦР в сравнении с коммерческим набором. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Значения пороговых циклов при тестировании метода выявления генома вируса РРСС

Наличие генома вирусов в составе смеси нуклеиновых кислот	Значение порогового цикла	
	разработанный метод	коммерческий набор («АртТест РРСС»)
ПВС	–	–
ЦВС-2	–	–
РРСС	23,4	22,9
ПВС + ЦВС-2	–	–
ПВС + РРСС	25,1	25,9
ЦВС-2 + РРСС	25,8	24,9
ПВС + ЦВС-2 + РРСС	26,7	27,2
Пат. материал 1	36,8	35,7
Пат. материал 2	32,4	33,1
Пат. материал 3	16,5	16,1

Как видно из таблицы 3, чувствительность метода выявления вируса РРСС соответствует коммерческому набору – значения порогового цикла варьируются в пределах одного цикла, из чего можно заключить, что чувствительность метода со-

ставляет 10^3 ГЭ/мл (чувствительность коммерческого набора).

Для определения аналитической специфичности метода были поставлены ПЦР с различным биологическим материалом с использованием разработанного метода (таблица 4).

Таблица 4 – Выявление генома вируса РРСС разработанным методом

Наименование образца	Количество образцов	Количество положительных образцов, выявленных разработанным методом	Количество положительных образцов, выявленных коммерческими тест-системами
Пат. материал (сыворотка крови, паренхиматозные органы)	152	17	17
Штамм ПВС	1	0	0
ЦВС-2	2	0	0
Штамм РРСС	1	1	1
Вирус КЧС	1	0	0
Вирус болезни Ауески	1	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0
<i>Salmonella enterica</i>	1	0	0
<i>Streptococcus suis</i>	1	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	0	0

Полученные результаты показали, что разработанный метод обнаружения генома вируса РРСС обладает высокой специфичностью и позволяет идентифицировать вирус как в чистом виде (штаммы или изоляты), так и в патологическом материале. По своей специфичности метод не уступает коммерческим тест-системам.

ВЫВОДЫ

Проведенные серологические исследования сывороток крови свиней в 2020–2022 гг. показали высокий уровень серопо-

зитивности стада к вирусу РРСС – 77,5 %, что обусловлено как циркуляцией вируса, так и проводимой вакцинацией. Для эффективной диагностики репродуктивно-респираторного синдрома свиней нами разработан ПЦР-метод, который позволяет выявлять геном вышеуказанного вируса в различном биологическом материале (сыворотка крови, паренхиматозные органы, изоляты вируса) с чувствительностью, не уступающей коммерческим диагностическим тест-системам (10^3 ГЭ/мл).

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Болезни вирусной этиологии репродуктивных органов свиноматок / П. А. Красочко, П. П. Красочко, Б. Кайсюань [и др.] // Наше сельское хозяйство. – 2021. – № 14 (262). – С. 52–56. – EDN JGGYPI.
2. Мальцева, Б. М. Смешанное течение репродуктивно-респираторного синдрома и парвовирусной инфекции свиней / Б. М. Мальцева // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2001. – № 1. – С. 230.
3. Максимович, В. В. Инфекционные болезни свиней: монография – 2 изд., перераб. и доп. – Витебск : УО ВГАВМ, 2011. – 340 с. – EDN VYTLKJ.
4. WOAH Terrestrial Manual 2021: 3.9.6. Porcine reproductive and respiratory syndrome (infection with PRRS virus) - online version.
5. Co-infection dynamics of porcine parvovirus and PRRSV in European swine herds / I. Mészáros [et al.] // Veterinary Microbiology, 2019. – 231. – P. 87–94.
6. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Chapter 3.9.6. Porcine reproductive and respiratory syndrome (infection with PRRS virus). – 2020. Online version.
7. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure / R. Palinski, P. Piñeyro, P. Shang [et al.] // Journal of Virology. – 2016. – Vol. 91. – Is. 1. e01879-16. DOI 10.1128/JVI.01879-16.

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 619:578.245

Костюк Н.И., кандидат ветеринарных наук, доцент

Кулешова Ю.М., кандидат биологических наук, доцент

Острикова К.В., магистр биологических наук

Потапович М.И., заведующий НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета БГУ

Прокулевич В.А., доктор биологических наук, профессор

Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ БЫЧЬИХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ИНТЕРФЕРОНОВ *IN VITRO*

Резюме

При лечении и профилактике вирусных инфекций сельскохозяйственных животных активно применяются рекомбинантные интерфероны. Одним из важнейших показателей качества, отражающих эффективность и безопасность препаратов на основе интерферонов, является специфическая противовирусная активность. С помощью биологического метода дана сравнительная характеристика величины специфической активности бычьих интерферонов различных типов, а также их композиций, на перевиваемой клеточной культуре MDBK. Показано наличие выраженной специфической противовирусной активности композиций интерферонов.

Ключевые слова: противовирусная активность, рекомбинантные белки, бычьи интерфероны альфа (α), лямбда (λ), гамма (γ), тау (τ), линия клеток MDBK.

Summary

Recombinant interferons are actively used in the treatment and prevention of viral diseases in farm animals. One of the most important quality indicators reflecting the effectiveness and safety of interferon preparations is specific antiviral activity. A biological method was used to determine the activity of interferons. The estimation of the specific activity of interferons on the MDBK cell line was studied. The presence of specific antiviral activity of interferon compositions has been shown.

Keywords: antiviral activity, recombinant proteins, bovine interferons alpha (α), lambda (λ), gamma (γ), tau (τ), MDBK cell line.

Поступила в редакцию 02.12.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Высокий уровень заболеваний инфекционного характера у животных, наряду с недостаточной эффективностью в ряде случаев известных ветеринарных препаратов, требует разработки новых средств профилактики и лечения. Особенно это касается борьбы с вирусными инфекциями. В основе таких разработок могут быть использованы субстанции с выраженной антивирусной активностью, модуляторы клеточного и/или гуморального иммунитета [1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 12]. Таким широким спектром действия обладают белки млекопитающих, получившие групповое наименование цитокины, в частности группа полифункциональных сигнальных молекул – интерферонов I, II и III типа. С развитием генноинженерной методологии и биотехнологических производств появилась возможность получать индивидуальные белки в различных

системах экспрессии в промышленных масштабах, в том числе и молекулы, входящие в пул естественных видоспецифических модуляторов на уровне регуляции генов иммунной системы организма животных. Получение рекомбинантных регуляторных «защитных» белков является актуальной проблемой для развивающейся современной медицины и ветеринарии [2, 3, 8, 9, 10, 12, 13].

Результаты экспериментальных исследований и клинический опыт показывают, что разработка действенных и безопасных средств противoinфекционной терапии, а также методов их применения может в корне изменить тактические схемы как профилактики, так и лечения животных и тем самым повысить экономическую эффективность промышленного животноводства [5, 6, 8, 10, 12, 14, 15].

Рекомбинантные интерфероны с высокой противоинойфекционной активностью все чаще рассматриваются как основные действующие вещества при разработке перспективных фармацевтических препаратов ветеринарной противоинойфекционной иммунотерапии [5, 10, 11, 12, 13, 14, 15].

Цель исследования – изучить противовирусную активность рекомбинантных бычьих интерферонов (ИФН) различных типов и их композиций: альфа (α) + тау (τ) (ИФН I типа); альфа (α) + лямбда (λ) (ИФН I + ИФН III типов); альфа (α) + гамма (γ) + лямбда (λ) (ИФН I + ИФН II + ИФН III типов); тау (τ) + гамма (γ) (ИФН I + ИФН II типов); тау (τ) + лямбда (λ) (ИФН I + ИФН III типов); тау (τ) + гамма (γ) + лямбда (λ) (ИФН I + ИФН II + ИФН III типов); гамма (γ) + лямбда (λ) (ИФН II + ИФН III типов) с использованием тест-системы на основе перевиваемой культуры клеток MDBK *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Противовирусную активность композиций интерферонов определяли путем сравнения противовирусной активности испытуемых субстанций с аналогичным показателем стандартного образца интерферона на модели перевиваемой клеточной линии MDBK.

Культивирование клеточных линий осуществляли согласно паспортным рекомендациям производителя. Перед работой с перевиваемыми клеточными линиями проводили макро- и микроскопический анализ монослоя. В работу брали культуральные флаконы со 100%-ным монослоем клеток с эпителиоподобной морфологией, типичной для данной линии, не содержащие посторонних агентов.

Клетки снимали с субстрата по общепринятой методике [7]. Из полученной клеточной суспензии отбирали пробу в объеме 0,01 см³ для определения количества и жизнеспособности клеток тестом, основанным на нарушении мембранной целостности, измеряемой по проникновению красителя трипанового синего [7]. Количество клеток подсчитывали с помощью электронного счетчика Countess II («Life Technologies», США).

В исследовании использовали индикаторный вирус везикулярного стоматита

(VSV) с титром 10⁵ ТЦД/см³. За титр (активность) вируса принимали наибольшее разведение вируса, при котором клеточный монослой в 50 % лунок оказался полностью пораженным цитопатическим действием. Титр вируса выражали в тканевых цитопатических дозах ТЦД₅₀/мл.

Определение специфической активности ИФН и их композиций проводили следующим образом: готовили серии двукратных разведений ИФН в питательной среде ДМЕМ с содержанием 2 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) в разведениях от 1:100 до 1:12800. Из лунок планшетов со сформировавшимся полноценным клеточным монослоем удаляли ростовую питательную среду (ДМЕМ с содержанием 10 % ЭТС) и вносили приготовленные разведения интерферонов. На каждое разведение использовали по 4 лунки с культурой клеток MDBK. Для контроля клеточного монослоя (КК) на планшете оставляли не менее 4 лунок и не менее 16 лунок – для контроля дозы вируса. Планшеты инкубировали в СО₂-инкубаторе в течение 24–48 ч при температуре (37±1) °С в атмосфере с (5,0±0,5) % СО₂. После инкубирования из планшета удаляли среду и во все лунки, содержащие отдельные ИФН, композиции ИФН и стандартный ИФН, вносили индикаторный VSV в рабочей дозе 100,0 ТЦД₅₀/0,1 см³. В лунки, предназначенные для контроля дозы вируса, вносили разведения вируса, соответствующего 100,0 ТЦД₅₀/0,1 см³; 10,0 ТЦД₅₀/0,1 см³; 1,0 ТЦД₅₀/0,1 см³; 0,1 ТЦД₅₀/0,1 см³. В лунки, предназначенные для контроля клеточного монослоя, вносили поддерживающую среду (ДМЕМ с содержанием 2 % ЭТС). После внесения вируса 96-луночные планшеты помещали в СО₂-инкубатор на 24–48 ч до появления цитопатического действия в монослое клеток.

Учет результатов проводили методом визуальной оценки монослоя с помощью инвертированного микроскопа Nikon TS100 («Nikon Corporation», Япония). Для разведений стандарта ИФН и испытуемых образцов определяли количество лунок, в которых наблюдалось цитопатическое действие вируса. Для каждого планшета рассчитывали титр стандартного (Т_{со}) и испытуемого образцов (Т_{ир}) методом Спирмена-Кербера (формулы 1–3):

$$T_{ИФН} = 2^{\log_2 ED_{50ИФН}}, \quad (1)$$

$$T_{COH} = 2^{\log_2 ED_{50COH}}, \quad (2)$$

$$\log_2 ED_{50} = D_{max} + \frac{d}{n} \times (p - \frac{n}{2}), \quad (3)$$

где $\log_2 ED_{50}$ – двоичный логарифм титра стандартного или испытуемого образцов;

D_{max} – двоичный логарифм разведения, ниже которого наблюдается защита клеток от вируса, т.е. отсутствие признаков деградации монослоя, в 100 % лунок;

d – двоичный логарифм шага разведений, равный 1;

n – число лунок, приходящееся на каждое разведение;

p – число лунок для разведения, соответствующего D_{max} , и последующих разведений, в которых отсутствует цитопатическое действие вируса.

За титр ИФН принимали величину, обратную разведению образцов, при котором клеточная культура в 50 % лунок полностью защищена от ТЦД вируса.

Специфическую активность испытуемых образцов ($A_{ИФН}$) рассчитывали по формуле 4:

$$A_{ИФН} = A_{COH} \times \frac{T_{ИФН}}{T_{COH}}, \quad (4)$$

где A_{CO} – специфическая активность стандартного образца;

$T_{ИФН}$ – титр испытуемого образца;

T_{CO} – титр стандартного образца;

n – число лунок, приходящееся на каждое разведение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенной работы определена противовирусная активность рекомбинантных бычьих ИФН α , γ , λ , τ и их композиций: $\alpha + \tau$; $\alpha + \lambda$; $\alpha + \gamma + \lambda$; $\tau + \gamma$; $\tau + \lambda$; $\tau + \gamma + \lambda$; $\gamma + \lambda$, представленных в виде белковых субстанций высокой степени очистки ($\geq 98\%$).

Каждый экспериментальный образец представлял собой стерильный раствор рекомбинантных бычьих интерферонов в Трис-буфере (50 мМоль Трис-НCl, pH 7,0–8,0, 20 мМоль NaCl, 1 мМоль ЭДТА). При

создании композиций бычьих ИФН различных типов смешивали в соотношении 1:1, при этом общая концентрацией белка в композиции составляла 15 мкг/см³.

В ходе исследований активности отдельных ИФН и их композиций в модельной системе с использованием перевиваемой культуры клеток MDBK установлена выраженная противовирусная активность всех изучаемых образцов (таблицы 1, 2).

Полученные данные свидетельствуют, что композиции ИФН способны нейтрализовать цитопатическое действие VSV на 50 % в концентрациях, близких к таковым для стандартного образца ИФН.

Исходя из данных, представленных в таблице 1, можно заключить, что образцы ИФН различных типов обладали противовирусной активностью и подавляли цитопатическое действие индикаторного вируса в условиях *in vitro*, при этом наибольшие разведения исследуемых ИФН не защищали клетки от вируса. ИФН- α подавлял цитопатическое действие вируса на 50 % в разведениях до 1:3200, что соответствует противовирусной активности $3,2 \times 10^6$ МЕ/мг. Бычий ИФН- τ подавлял действие вируса на 50 % в разведениях до 1:400, его активность составила $0,4 \times 10^6$ МЕ/мг; ИФН- γ – $0,6 \times 10^6$ МЕ/мг, ИФН- λ – $1,6 \times 10^6$ МЕ/мг соответственно. Таким образом, проведенные исследования показали, что интерфероны α и λ обладали более выраженной противовирусной активностью, чем τ и γ , в системе перевиваемой линии клеток MDBK.

Следует отметить, что бычьи рекомбинантные интерфероны I (α) и III (λ) типов проявили наиболее высокую степень антивирусной активности, сопоставимую со стандартным образцом. Эти типы ИФН по своим структурно-функциональным свойствам отнесены к противовирусным цитокинам, имеющим свои рецепторы узнавания на поверхности клеток. Интерфероны γ и τ продемонстрировали пониженную противовирусную активность, что может быть следствием того, что главные функции ИФН- γ (II тип) заключаются в контроле клеточного и гуморального иммунного процесса, а ИФН- τ участвует в процессе распознавания беременности у жвачных животных.

Таблица 1 – Определение противовирусной активности бычьих рекомбинантных ИФН на перевиваемой линии клеток MDBK

Разведения ИФН*	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
Бычий α -ИФН	-	-	-	-	+	++	++++	++++
Бычий τ -ИФН	-	-	++	+++	+++	++++	+++	++++
Бычий γ -ИФН	-	-	+	+++	++++	++++	++++	++++
Бычий λ -ИФН	-	-	-	-	++	+++	+++	++++
Стандартный образец ИФН**	-	-	-	-	+	++	+++	+++

Примечания:

* – за 1 часть ИФН принималась концентрация 1,0 мкг/см³;

** – коммерческий препарат рекомбинантного α -ИФН («PBL InterferonSource», США);

++++ – полный цитопатический эффект, дегенерация клеток 80–100 %;

+++ – сохраняются участки монослоя без дегенерации, около 25 % всей площади;

++ – монослой частично сохранен, 50 % живых клеток;

+

– отсутствие признаков дегенерации, 100%-ный монослой, защита клеток от вируса

Таблица 2 – Противовирусная активность композиций бычьих рекомбинантных ИФН *in vitro* на перевиваемой культуре клеток MDBK

Разведения ИФН*	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
А) $\alpha + \tau$	-	-	++	++	+++	+++	++++	++++
Б) $\alpha + \lambda$	-	-	-	++	++	++	+++	++++
В) $\alpha + \gamma + \lambda$	-	-	-	-	+	++	++	+++
Г) $\tau + \gamma$	-	-	+	++	++	+++	++++	++++
Д) $\tau + \lambda$	-	-	-	+	++	++	+++	+++
Е) $\tau + \gamma + \lambda$	-	-	+	++	++	+++	++++	++++
Ж) $\gamma + \lambda$	-	-	+	++	++	++++	+++	++++
Стандартный образец ИФН**	-	-	-	-	+	++	+++	+++

Примечания:

* – перед титрованием в планшет общую концентрацию белка в образцах доводили до 1,0 мкг/см³;

** – коммерческий препарат рекомбинантного ИФН- α («PBL InterferonSource», США) в концентрации 1,0 мкг/см³;

++++ – полный цитопатический эффект, дегенерация клеток 80–100 %;

+++ – сохраняются участки монослоя без дегенерации, около 25 % всей площади;

++ – монослой частично сохранен, 50 % клеток живых;

+

– отсутствие признаков дегенерации, 100%-ный монослой

Сходную со стандартным образцом противовирусную активность проявили композиции Б ($\alpha + \lambda$) и Д ($\tau + \lambda$) – $3,2 \times 10^6$ МЕ/мг. При этом композиция В ($\alpha + \gamma + \lambda$) проявляла наиболее выраженную ан-

тивирусную активность в разведениях более высоких, чем стандартный образец, – 1:6400, что соответствует $6,4 \times 10^6$ МЕ/мг (рисунок).

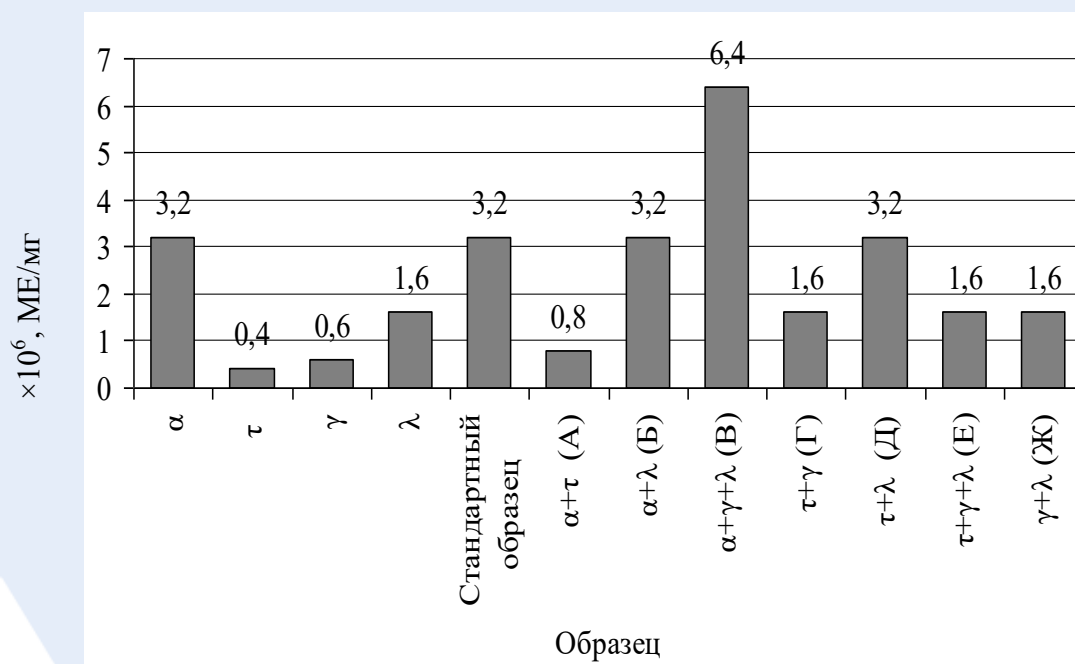


Рисунок – Сравнительная характеристика противовирусной активности композиций бычьих рекомбинантных ИФН *in vitro* в тест-системе перевиваемой культуры клеток MDBK

Композиция А ($\alpha + \tau$) показала самую низкую противовирусную активность в тест-системе перевиваемой культуры клеток MDBK. Это может быть связано как с конкуренцией данных видов ИФН за рецепторы, поскольку они относятся к одному типу (I тип), так и с возможной несовместимостью ИФН в составе одной композиции и, как следствие, со снижением активности.

Представленные на рисунке результаты демонстрируют, что практически все составленные композиции обладают более выраженной противовирусной активностью по сравнению с отдельно взятыми рекомбинантными ИФН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованные рекомбинантные ИФН и их композиции обладают выраженной противовирусной активностью в тест-системе перевиваемой культуры клеток MDBK, что позволяет прогнозировать их

перспективность для применения в качестве основы лечебно-профилактических ветеринарных препаратов.

Проведенные исследования показали, что композиции ИФН вызывают снижение ТЦД на 50 % при разведениях от 1:1600 до 1:3200. При этом композиция В ($\alpha + \gamma + \lambda$) сохраняет высокий уровень противовирусной активности даже в разведениях 1:6400, что эффективнее противовирусного действия стандартного образца. Сравнительная характеристика антивирусной активности рекомбинантных ИФН, проведенная в условиях *in vitro*, показала, что композиции $\alpha + \lambda$ (вариант Б) и $\alpha + \gamma + \lambda$ (вариант В) более эффективны в подавлении цитопатического действия индикаторного вируса на клеточной линии MDBK, чем $\tau + \gamma$ (вариант Г), $\tau + \lambda$ (вариант Д), $\tau + \gamma + \lambda$ (вариант Е), $\gamma + \lambda$ (вариант Ж), а самая низкая противовирусная активность установлена у композиции $\alpha + \tau$ (вариант А).

Полученные в исследовании данные демонстрируют, что как отдельные интерфероны, так и их композиции могут являться эффективным средством противодей-

ствия вирусным инфекциям и потенциально могут быть рассмотрены для использования в клинической практике при лечении вирусных заболеваний.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Беликов, В. Г. Фармацевтическая химия / В. Г. Беликов. – М. : Высшая школа, 1993. – С. 192–198.
2. Власов, Н. А. Антибиотики и химиопрепараты для борьбы с инфекционными болезнями животных / Н. А. Власов, Д. А. Васильев // Новые методы в профилактике и лечении инфекционных болезней. – 1997. – № 1. – С. 22–24.
3. Волкова, М. А. Интерферон-α в терапии онкогематологических заболеваний / М. А. Волкова // Вместе против рака. – 2005. – № 1. – С. 38–51.
4. Глотов, А. В. Особенности проявления вирусных и ассоциативных вирусно-бактериальных болезней крупного рогатого скота / А. В. Глотов // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2009. – № 2. – С. 17–27.
5. Григорян, А. А. Схемы применения миксоферона при лечении телят / А. А. Григорян, В. Н. Прохоров // Ветеринария. – 1996. – № 2. – С. 9–11.
6. Гуревич, Г. И. Профилактика сезонных острых респираторных вирусных инфекций / Г. И. Гуревич // Биомедицинский журнал. – 2001. – № 10. – С. 42–45.
7. Дьяконов, Л. П. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / Л. П. Дьяконов. – М. : Спутник, 2009. – 656 с.
8. Еришов, Ф. И. Система интерферона в норме и патологии / Ф. И. Еришов. – М. : Медицина, 1996. – С. 12–68.
9. Конопаткин, А. А. Диагностика моно- и смешанных респираторных инфекций крупного рогатого скота / А. А. Конопаткин // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2000. – № 1. – С. 9–20.
10. Муравьев, И. А. Технология лекарств / И. А. Муравьев. – М. : Медицина, 1980. – Т. 2. – С. 538–553.
11. Попов, В. Ф. Лекарственные формы интерферонов / В. Ф. Попов. – М. : Триада-Х, 2002. – С. 21–27.
12. Прокулевич, А. В. Ветеринарные препараты на основе интерферона / В. А. Прокулевич, М. И. Потапович // Вестник Белорусского государственного университета. – Сер. 2. Химия. Биология. География. – 2011. – № 3. – С. 51–55.
13. Рафальский, В. В. Клиническое применение препаратов интерферона / В. В. Рафальский. – Смоленск : Смоленская государственная медицинская академия, 1997. – 233 с.
14. Brujeni, N. Cloning and high level expression of bovine interferon gamma gene in eukaryotic cells / N. Brujeni, H. Tadjbakhsh // Iranian Journal of Veterinary Research. – 2010. – Vol. 11, № 2. – P. 125–133.
15. Costa-Pereira, A. P. The antiviral response to gamma interferon / A. P. Costa-Pereira, T. M. Williams, B. Strobl // J. of Virology. – 2002. – Vol. 76. – P. 9060–9068.

наша продукция



Омар Хуссейн Али, кандидат сельскохозяйственных наук¹
Малашко В.В., доктор ветеринарных наук, профессор²

¹Колледж ветеринарной медицины, Университет Диялы, г. Дияла, Республика Ирак

²УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, Республика Беларусь

ПРОДУКТИВНОСТЬ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ В ЛЕТНИЙ ПЕРИОД ВЫРАЩИВАНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИКА «ПРОМОИС»

Резюме

В статье анализируется эффективность применения пробиотика «Промоис» при выращивании цыплят-бройлеров в Республике Ирак. Наблюдается изменение продуктивных показателей: масса цыплят увеличивается на 8,8 %, конверсия корма уменьшается на 7,5 %, среднесуточный прирост возрастает на 8,6 % при снижении смертности в 2,4 раза по сравнению с контролем. Установлены характерные этапы преобразования гематологических показателей, протекавшие по лимфоцитарному типу, что сопровождалось увеличением количества лимфоцитов, эозинофилов и базофилов. Под влиянием препарата наблюдается стойкая динамика белкового обмена: содержание общего белка в сыворотке крови увеличивается на 19,2 %, альбуминов – на 33,3 %, глобулинов – на 22,4 %. Пробиотик стимулирует ангиогенез в алиментарной системе, что проявляется увеличением плотности капилляров в двенадцатиперстной кишке на 26,1 % и уменьшением межкапиллярного расстояния на 67,3 %. Увеличение количества капилляров обеспечивает высокую надежность иммунологического барьера пищеварительной системы от кормовых токсических веществ и патогенных агентов.

Ключевые слова: пробиотик, цыплята, гематология, биохимия, микроэлементы, морфология, ферменты, сосудистая система, продуктивность, пищеварительная система, конверсия корма.

Summary

This article analyzes the effectiveness of the probiotic «Promois» in raising broiler chickens in the Republic of Iraq. Productive indicators, such as chicken weight increased by 8,8 %, feed conversion decreased by 7,5 %, and average daily gain increased by 8,6 %, while mortality was reduced by 2,4 times compared to the control group. Characteristic stages of hematological parameter changes were identified. These changes followed a lymphocytic pattern, accompanied by an increase in lymphocytes, eosinophil's, and basophils. The drug resulted in a persistent increase in protein metabolism, with total serum protein levels increasing by 19,2 %, albumin by 33,3 %, and globulin by 22,4 %. The probiotic stimulates angiogenesis in the alimentary system, resulting in a 26,1 % increase in capillary density in the duodenum and a 67,3 % decrease in intercapillary distance. The increased capillary density ensures a highly reliable immunological barrier in the digestive system against feed toxic substances and pathogens.

Keywords: probiotic, chickens, hematology, biochemistry, trace elements, morphology, enzymes, vascular system, productivity, digestive system, feed conversion.

Поступила в редакцию 07.09.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Пробиотики – перспективный вариант для стимуляции роста в птицеводстве. Их добавляют в корма для обеспечения организма птицы полезными микроорганизмами. Пробиотики связываются с клетками, выстилающими пищеварительный тракт, блокируя рецепторы на клеточных стенках и предотвращая проникновение вредных микробов [9, 12]. Это способствует выведению патогенных микроорганизмов и снижает их негативное воздействие. Кроме того, пробиотики восстанавливают микробный баланс в кишечнике, особенно когда взрослые птицы подвергаются стрес-

су, вызванному высокими температурами или болезнями. Пробиотики становятся все более популярными, а их применение – широко распространенным во многих странах [1, 3].

Исследования показали, что использование пробиотиков в птицеводстве увеличивает живую массу и эффективность усвоения корма, а также способствует снижению смертности и теплового стресса [10]. Птицы, получавшие иракские пробиотики с питьевой водой, показали наибольший общий прирост массы в возрасте 35 дней [5].

Получен также положительный результат при введении пробиотиков в корм цыплятам после вылупления в течение 24 и 48 ч [11, 13]. Важность использования пробиотиков заключается еще в том, что они повышают конверсию корма, снижают его потребление и смертность птицы.

Профиль кишечной микробиоты – основной фактор, регулирующий здоровье, иммунитет и продуктивность птицы. Макроорганизм необходимо защищать от целого спектра патогенных микробов, вырабатывающих разнообразные механизмы выживания и резистентности в пищеварительном тракте. Поэтому для обеспечения полноценной защиты требуется использование комплексных решений [4].

Биопрепаратами нового поколения являются метапробиотики – препараты на основе пробиотических штаммов бактерий, дополнительно обогащенные полезными бактериальными метаболитами (органические кислоты), которые благодаря синергическому эффекту результативно модулируют микробиоту пищеварительной системы. Микропробиотик «Пробиоцид-Ультра» объединяет комбинацию естественных бактериальных метаболитов (фумаровой и лимонной кислот) и двух штаммов *Bacillus spp.*, действующих в синергизме [4].

В отличие от большинства патогенов, кислотоустойчивые представители микробиоты, такие как лакто- и бифидобактерии, не чувствительные к снижению уровня pH, достаточно легко переносят дисбаланс между внутренним и внешним pH.

В то же время иные представители полезной микробиоты, такие как целлюлозолитические бактерии *Ruminococcus*, *Eubacterium*, расщепляющие клетчатку, имеют другие механизмы защиты от подкисления. Дело в том, что у грамположительной группы бактерий, к которым они относятся, наблюдается высокий уровень внутриклеточного калия по сравнению с грамотрицательными патогенами, что способствует нейтрализации анионов кислот [8].

На сегодняшний день для того, чтобы полностью реализовать генетический потенциал кросса, получив при этом высокие показатели по продуктивным и мясным качествам, необходимо обеспечить птицу оптимально сбалансированными кормами, особенно в ранние периоды доразращивания.

Улучшение потребления и усвоение корма в первые 7 дней постнатальной жизни бройлеров, когда у них наблюдается наиболее высокая относительная скорость прироста живой массы, позволяет обеспечить в дальнейшем однородность поголовья [7].

В первые дни постнатальной жизни цыпляток также подвержен воздействию различных стрессовых факторов. Несформированная ферментная система и слабо развитый желудочно-кишечный тракт в первую неделю являются одними из главных причин применения для них особых кормов, которые называются престартерными [6].

Задачей престартерного комбикорма в комплексе с пробиотиками является стимулирование развития желудочно-кишечного тракта, укрепление иммунитета, обеспечение интенсивного обмена веществ, сведение к минимуму стресс-факторов после вылупления цыплят. Белковые корма в престартерных рационах положительно влияют на мясные качества цыплят-бройлеров [2].

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния пробиотика «Промоис» на продуктивные показатели цыплят-бройлеров при выращивании в летний период.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводился на птицеводческой ферме в районе Баладруз, провинция Дияла, Ирак, с 8 августа по 11 сентября 2025 г. Использовались 60 цыплят линии ROSS, разделенных на две группы – контрольную и опытную – по 30 цыплят. Опыт длился 33 дня. Цыплята размещались в шести одинаковых помещениях размером 1 м². Согласно схеме опыта было определено три периода: стартовый – с 1-го по 10-й день, ростовой – с 11-го по 21-й день и финишный – с 22-го по 35-й день.

Рацион кормления был составлен для каждого периода. Так, для стартового периода метаболизируемая энергия составляла 3015, для ростового – 3099 и финишного – 3182 ккал/кг корма. Освещение помещений было круглосуточным, температура измерялась трижды в день.

Изучались такие показатели, как масса цыплят, прирост массы, учет потребления корма, коэффициент преобразования

корма, процент смертности и продуктивность.

Пробиотик «Промоис» использовали из расчета 50,0 г на 100,0 л воды в условиях жаркого летнего сезона.

Пробиотик «Промоис» – многокомпонентный препарат, который содержит, КОЕ/г: *Bifidobacterium bifidum* – $1,0 \times 10^{20}$, *Lactobacillus acidophilus* – $1,0 \times 10^{10}$, *Lactobacillus casei* – $1,0 \times 10^{10}$, *Bacillus subtilis* – $1,0 \times 10^{10}$, *Bifidobacterium faecium* – $1,0 \times 10^4$, *Streptococcus thermophilus* – $1,0 \times 10^4$, дрожжи – $1,0 \times 10^2$.

Особенность препарата в том, что он содержит высокую концентрацию бифидо- и лактобактерий, это позволяет быстро колонизировать кишечник цыплят нормофлорой.

Коэффициент преобразования корма (коэффициент конверсии корма) равен соотношению нормы потребления корма (г) за цикл в заданный период к норме прироста массы (г) за тот же срок.

Для проведения гематологических и биохимических исследований использовали гематологический анализатор «IDEXX Procite DX», биохимический анализатор «SPOTCHEM ARKRAY ES-SP-4430», лабораторные микроскопы «OLIMPUS CX41» и «Olympus IX71».

Количественную оценку капилляризации тонкого кишечника цыплят проводили с использованием методики С.М. Блинкова и др. по формуле:

$$L_0 = 2n_c; n_c = N_c/2a,$$

где L_0 – длина капилляров на $1,0 \text{ мм}^2$;
 n_c – плотность концов капилляров на $1,0 \text{ мм}^2$;

N_c – число концов сосудов в пределах сетки;

a – площадь срезов, покрываемых сеткой.

Микроциркуляторное русло выявляли методом импрегнации азотнокислым серебром по В.В. Куприянову, а также гистохимическим методом по Г. Гомори, основанным на выявлении щелочной фосфатазы (ЩФ) в эндотелии кровеносных сосудов.

Активность щелочной фосфатазы определяли с помощью операционной си-

стемы «Биоскан» путем измерения оптической плотности β -глицерофосфата с использованием параметра OptAvg – средняя величина поглощения плотности объекта, десятичный логарифм от обратной трансмиссии (ОА):

$$OA = -\log(I_i/I_0),$$

где I_i – количество света, прошедшего через объект. Единица измерения – относительные единицы оптической плотности (отн. ед. оптич. пл.);

I_0 – количество света, падающего на объект.

Статистическую обработку цифрового материала проводили с использованием приложения MS Office с уровнем достоверности $P < 0,05$, $P < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

С учетом возраста цыплят рацион корректировался по питательным веществам (таблица 1).

Обращаем внимание на состав белкового концентрата, который содержит сбалансированные вещества: на сырой протеин приходится 40 %, жир – 5 % и 2 % – на клетчатку.

Из макроэлементов белковый концентрат содержит 6,5 % кальция, 4,0 % – усвояемого фосфора и 2,3 % – натрия. В состав также входят аминокислоты: 3,85 % лизина, 3,70 % метионина и 4,0 % метионина с цистеином, фермент фитаза в концентрации 15000 ед./кг и 5000 мг/кг хлорида холина.

Этот концентрат обеспечивает 2100 ккал энергии/кг и содержит все необходимые вещества для удовлетворения потребностей птицы.

В связи с тем, что в задачу входило оценить продуктивность цыплят-бройлеров при применении пробиотика в летний период выращивания, анализировались температурные показатели в течение суток (таблица 2).

Как видно из таблицы 2, в утренние часы температура была в пределах $29,1\text{--}32,0^\circ\text{C}$, в середине дня повышалась до $34,1\text{--}35,7^\circ\text{C}$, в вечернее время находилась в пределах $30,9\text{--}33,3^\circ\text{C}$.

Таблица 1 – Состав корма для цыплят-бройлеров

Возрастной период, дни			Ингредиенты корма, %
стартовый, 1–10	ростовой, 11–21	финишный, 22–35	
53	55	57	кукуруза
10	10	10	пшеница
30	27	24	соевый шрот, белка 44 %
5	5	5	белковый концентрат
1	2	3	масло
0,7	0,7	0,7	известняк
0,3	0,3	0,3	соль
100	100	100	всего
химический состав корма			
22,1	20,1	19,5	сырой протеин
3015	3099	3182	метаболизируемая энергия, ккал/кг корма
136,42	148,99	163,17	соотношение энергии к протеину
1,27	1,06	1,08	лизин
0,52	0,47	0,50	метионин
0,75	0,80	0,78	кальций
0,55	0,45	0,57	доступный фосфор
1,21	1,00	1,21	аргинин

Таблица 2 – Температурные показатели производственных помещений при выращивании цыплят-бройлеров в летний период

Возраст в неделях	Температура по времени суток, °С			Средняя температура, °С
	8 ⁰⁰	13 ⁰⁰	19 ⁰⁰	
1	32,0	35,7	32,1	33,3
2	30,2	34,1	30,3	31,5
3	29,1	34,6	29,2	30,9
4	29,3	34,2	30,1	31,2
5	29,5	34,2	30,2	31,3

С учетом приведенных выше данных оценена продуктивность цыплят-бройлеров при использовании пробиотика «Промо-ис» (таблица 3). Анализ данных таблицы 3 показывает, что живая масса цыплят-бройлеров в опытной группе на финишном отрезке эксперимента достигла $2080,32 \pm 3,65$ г, в контрольной группе – $1912,65 \pm 5,07$ г. Таким образом, показатель в опытной группе превышает таковой в контроле на 8,8 % ($P < 0,05$).

Расход корма в опытной группе был несколько выше: так, в контроле этот пока-

затель составлял $3280,22 \pm 11,01$ г, в опыте – $3311,12 \pm 12,14$ г, но приведенные данные недостоверны.

Относительно конверсии корма просматривается следующая тенденция: в контроле результаты составили $1,71 \pm 0,01$ кг/кг, в опытной группе – $1,59 \pm 0,01$ кг/кг, что, соответственно, меньше на 7,5 % ($P < 0,01$).

По нашим данным, среднесуточный прирост массы цыплят-бройлеров в контроле составлял $58,0 \pm 1,33$ г, в опытной группе – $63,0 \pm 1,09$ г, в процентном выражении это больше на 8,6 % ($P < 0,05$).

В расчете на 1,0 м² производственной площади при использовании пробиотика получено продукции в живой массе на 2,5 г больше, или же на 14,5 % ($P<0,01$), что в расчете на 1000 голов составит 2500 г.

В летний период обычно наблюдается падеж цыплят: в контроле он достиг 6,55 %, в опытной группе – 2,75 % (таблица 3). Таким образом, смертность цыплят в контроле выше в 2,4 раза.

Таблица 3 – Продуктивные показатели цыплят-бройлеров при использовании пробиотика «Промоис»

Показатель	Группа	
	контроль	опыт
Живая масса, г	1912,65±15,07	2080,32±13,65**
% к контролю	100	108,8
Расход корма, г	3280,22±11,01	3311,12±12,14 ^{н/д}
% к контролю	100	100,9
Коэффициент конверсии корма, кг/корма/кг прироста массы (кг/кг)	1,71±0,01	1,59±0,01**
% к контролю	100	93,0
Среднесуточный прирост массы, г	58,0±1,33	63,0±1,09*
% к контролю	100	108,6
Производительность на 1 м ² живой массы, г	17,20±0,32	19,70±0,36**
% к контролю	100	114,5
Смертность цыплят, %	6,55±0,48	2,75±0,78**

Примечание – * $P<0,05$; ** $P<0,01$; н/д – недостоверно

Гематологические показатели находились в пределах референтных значений (таблица 4). Однако количество эритроцитов в опытной группе было достоверно выше на 54 % ($P<0,01$). В контрольной группе установлено снижение количества эритроцитов даже по отношению к референтным значениям. Можно судить о том, что увеличение содержания эритроцитов указывает на усиление кроветворной функции (эритропоэз). Это априори связано с высокой интенсивностью обменных процессов в

период роста, что отражается на наращивании мышечной массы у цыплят-бройлеров.

Наблюдается тенденция повышения в крови цыплят опытной группы концентрации гемоглобина. Это способствует более полному насыщению органов и тканей кислородом. В процессе эксперимента наблюдалось увеличение содержания лейкоцитов на 15,1 % ($P<0,01$), что свидетельствует о высоком иммунологическом ответе на введение пробиотика.

Таблица 4 – Гематологические показатели при использовании пробиотика «Промоис»

Показатель	Контроль	Опыт	Референтные значения
Гемоглобин, г/л	73,04±2,98	77,34±2,82	51–99
Эритроциты, 10 ¹² /л	2,17±0,11	3,34±0,13**	3–4
СОЭ, мм/ч	3,23±0,54	2,43±0,17	–
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	31,43±1,23	36,17±0,49**	20–40
лейкоциты, %			
Псевдоэозинофилы	22,81±1,29	27,15±1,19*	19–28
Эозинофилы	4,55±1,27	3,62±1,18	3–5
Базофилы	1,47±0,42	2,61±0,43	3–5
Моноциты	2,24±0,36	2,58±0,36	0–1
Лимфоциты	63,21±2,18	73,97±2,22*	64–75

Примечание – * $P<0,05$; ** $P<0,01$

В процессе проведения эксперимента установлены изменения некоторых гематологических показателей, происходившие по лимфоцитарному типу. В частности, наблюдалось увеличение содержания в крови лейкоцитов на 17,0 % ($P<0,05$), псевдоэозинофилов – на 19,0 % ($P<0,05$) по отношению к контролю. Отмечалась тенденция к увеличению базофилов и моноцитов. Следовательно, формирование защитной функции крови в постэмбриональный период происходит за счет лейкоцитарных

фракций крови. В итоге применение пробиотика способствует нормализации гемопоэза.

Биохимический анализ сыворотки крови осуществлялся для того, чтобы получить информацию о функциональном состоянии организма птицы по показателям, которые достоверно отражают состояние обменных процессов (таблица 5). В опытной группе отмечена стойкая динамика повышения белкового обмена.

Таблица 5 – Биохимические показатели сыворотки крови цыплят-бройлеров при использовании пробиотика «Промоисс»

Показатель	Контроль	Опыт
Общий белок, г/л	31,23±1,16	37,23±1,61*
Альбумины, г/л	10,18±0,33	13,57±0,31*
Глобулины, г/л	20,13±1,45	24,64±1,47*
Аспаратаминотрансфераза (АСТ), ед./л	283,14±23,71	236,28±10,17
Глюкоза, ммоль/л	11,23±0,31	10,77±1,22
Кальций, ммоль/л	2,15±0,07	3,73±0,13*
Триглицериды, ммоль/л	0,22±0,48	0,17±0,28
Фосфор, ммоль/л	2,76±0,19	2,91±0,11
Холестерин, ммоль/л	3,27±0,19	3,25±0,18
Хлориды, ммоль/л	103,32±2,67	96,61±1,43
Мочевая кислота, мкмоль/л	298,55±20,12	235,19±19,04*
Калий, ммоль/л	5,25±0,41	5,23±0,48
Натрий, ммоль/л	147,21±4,14	157,63±5,18
Гамма-глутамилтранспептидаза (ГТ), ед./л	14,18±4,32	13,81±2,19
Щелочная фосфатаза, ед./л	10057,61±606,23	13321,45±747,84*
Магний, ммоль/л	0,98±0,06	1,05±0,08

Примечание – * $P<0,05$

Так, содержание общего белка у цыплят опытной группы составляло 37,23±1,61 г/л, в контроле – 31,23±1,66 г/л, что выше на 19,2 % ($P<0,05$). Подобная тенденция характерна и для альбуминов: их содержание в контроле было 10,18±0,33 г/л, в опыте – 13,57±0,31 г/л, глобулинов – 20,13±1,45 г/л и 24,64±1,47 г/л соответственно. Следует также отметить, что в опытной группе происходило снижение

мочевой кислоты до 235,19±19,04 мкмоль/л, в контроле – 286,55±40,35 мкмоль/л.

По приведенной информации можно судить о снижении распада и повышении синтеза протеина, что приводит к усилению анаболических процессов в организме цыплят под воздействием пробиотика. Содержание АСТ в обеих группах цыплят существенно не превышало нормативных показателей, однако следует заметить,

что в опытной группе этот показатель достигал $236,28 \pm 10,17$ ед./л (при нормативном диапазоне для линии ROSS 246,00–208,80 ед./л), а в контроле этот показатель составлял $283,14 \pm 23,71$ ед./л. АСТ контролирует синтез аминокислот, которые входят в состав клеточных мембран и тканей. Уровень глюкозы в сыворотке крови обеих групп был практически одинаков. Снижение триглицеридов в опытной группе не выходило за пределы физиологической нормы.

В опытной группе отмечена тенденция к увеличению содержания в сыворотке крови ЩФ – на 32,6 % ($P < 0,05$) по отношению к контролю. Известно, что ЩФ играет в остеогенезе важную роль. Если рассматривать увеличение ее содержания с этих позиций, то можно заключить, что активизируется функция остеобластов. Именно в этот период у цыплят происходит активное формирование костной ткани, а также накопление в ней фосфора, который способствует формированию костного матрикса. Об этом свидетельствует и увеличение на 56,7 % ($P < 0,05$) содержания кальция в сыворотке крови по отношению к контролю.

Приведенные результаты говорят о сбалансированном соотношении кальция и фосфора в сыворотке крови. Так, в экспериментальной группе этот показатель составил 1,16, в контроле – 0,78 при норме 1,20–1,50. Соотношение кальция и магния в опыте было в пределах 3,55, в контроле – 2,19. Нормативные показатели для магния в сыворотке крови цыплят-бройлеров составляют 0,80–1,10 ммоль/л. В дополнение к фосфору указанные минеральные вещества являются составными частями матрикса костной ткани.

Таким образом, активизация биосинтетических процессов в организме цыплят-бройлеров с учетом механизма действия пробиотика осуществляется за счет более интенсивного синтеза заменимых, незаменимых аминокислот, стимуляции неспецифической резистентности организма, что отражается на росте и развитии цыплят.

Интерес к изучению ЩФ вызван тем, что этот фермент принимает участие в различных биосинтетических процессах и содержание энзима отражает пролифера-

тивную активность клеток. ЩФ реагирует на изменение в рационе количества и качества белковых и углеводных компонентов. Недостаток биосинтеза ЩФ приводит к нарушению обмена гликогена, натрия и фибриллярных белков. Специфическим активатором ЩФ является магний, данные по содержанию которого приведены в таблице 5.

Нами впервые установлен краниокаудальный градиент активности ЩФ в пищеварительном аппарате цыплят-бройлеров. Анализ активности ЩФ в сосудистом русле пищеварительного тракта показал гистоэнзиматическую гетерогенность микрососудов в зависимости от диаметра и топографии в стенке кишки.

В слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки активность ЩФ в микроциркуляторном русле в контроле составляла $0,98 \pm 0,02$ отн. ед. оптической пл., в опыте – $1,18 \pm 0,02$ отн. ед. оптической пл., в тощей кишке – $1,13 \pm 0,03$ и $1,23 \pm 0,02$ отн. ед. оптической пл., в подвздошной кишке – $1,19 \pm 0,02$ и $1,76 \pm 0,03$ отн. ед. оптической пл. соответственно.

В среднем активность ЩФ в опытной группе превышала контроль на 26,4 % ($P < 0,01$). Своевременное обеспечение органов кислородом, участвующим в биохимических реакциях энергообразования и синтеза, является необходимым условием успешного выполнения их функций.

Впервые нами установлена зональность кровоснабжения слоев кишки. В частности, на примере слизистой и мышечной оболочек двенадцатиперстной кишки выявлено, что кровоснабжение слизистой оболочки в 1,5 раза интенсивнее, чем в мышечном слое. Под влиянием пробиотика среднее межкапиллярное расстояние в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки составляло $44,23 \pm 3,41$ мкм, в контроле – $68,74 \pm 5,36$ мкм, т.е. происходит увеличение плотности капиллярного русла на единицу поверхности (рисунок). Таким образом, межкапиллярное расстояние уменьшилось на 67,3 % ($P < 0,05$). Удельная плотность капилляров в контрольной группе – $0,46 \pm 0,02$ мм²/мм², в опыте – $0,58 \pm 0,03$ мм²/мм², что выше контрольных данных на 26,1 % ($P < 0,05$).

Как в опыте, так и контроле встречались капилляры, не заполненные кровью,

так называемые «пустующие капилляры», удельная плотность которых в эксперименте составляла $0,18 \pm 0,02 \text{ мм}^2/\text{мм}^2$, в контроле – $0,24 \pm 0,02 \text{ мм}^2/\text{мм}^2$.

Таким образом, установлен важный биологический факт: механизм действия пробиотиков состоит не только в регуляции микробиоты, но и оказывает физиоло-

гическое влияние на функционирование пищеварительного тракта.

В частности, увеличение количества капилляров на единицу площади обеспечивает высокую надежность иммунологического барьера алиментарной системы от кормовых токсических веществ и патогенных агентов.



а – контроль; б – опыт

Рисунок – Развитие микроциркуляторного русла двенадцатиперстной кишки у цыплят-бройлеров. Импрегнация серебром. Микрофото. Биоскан

ВЫВОДЫ

1. Изучены особенности механизма действия пробиотика «Промоис» при выращивании цыплят-бройлеров в летний период в условиях Республики Ирак.

2. Установлено, что при введении пробиотика из расчета 50,0 г на 100,0 л питьевой воды живая масса цыплят-бройлеров увеличилась на 8,8 %, среднесуточный прирост – на 8,6 %, в расчете на 1,0 м² площади получено на 14,5 % продукции больше по сравнению с контрольными результатами.

3. Констатируется, что в условиях эксперимента наблюдается активизация эритропоэза, о чем свидетельствует увеличение в крови эритроцитов на 54 %, гемоглобина – на 5,9 %.

4. В белковом обмене наблюдается тенденция к увеличению общего белка на 19,2 %, альбуминов и глобулинов – на 33,3 % и 22,4 % соответственно.

5. Биохимические результаты свидетельствуют о более сбалансированном физиологическом соотношении кальция и фосфора в сыворотке крови: в экспериментальной группе этот показатель составлял 1,16, в контроле – 0,78 при норме 1,20–1,50, соотношение кальция и магния в опыте равнялось 3,55, в контрольной группе – 2,19.

6. Увеличение в сыворотке крови концентрации ЩФ, кальция, фосфора и магния служит матрицей для формирования костного матрикса периферического скелета цыплят-бройлеров.

7. Уточнен и дополнен механизм действия пробиотика при выращивании цыплят-бройлеров, сопровождающийся увеличением активности ЩФ в микроциркуляторном русле пищеварительной системы на 26,4 %, что свидетельствует об активизации биосинтетических процессов.

8. Вторым направлением механизма влияния пробиотика на пищеварительный тракт является стимуляция ангиогенеза, о чем свидетельствуют увеличение плотности капиллярного русла на 26,1 %, уменьшение межкапиллярного расстояния на 67,3 % и нефункционирующих капилляров – на 25,0 %.

9. Установлен важный биологический факт, заключающийся в том, что механизм действия пробиотиков состоит не только в регуляции микробиоты, но и оказывает физиологическое влияние на функционирование пищеварительного тракта.

10. Увеличение количества капилляров обеспечивает более высокую надежность иммунологического барьера в пищеварительной системе от кормовых токсических веществ и патогенных агентов.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бондаренко, В. М. Пробиотики, пребиотики и синбиотики / В. М. Бондаренко, Н. М. Грачева // *Фарматека*. – 2003. – № 7. – С. 56–63.
2. Влияние новых белковых кормов в престартерных рационах на мясные качества цыплят-бройлеров / В. С. Лукашенко [и др.] // *Птицеводство*. – 2020. – № 11. – С. 18–21.
3. Егоров, Б. В. Пробиотики в кормлении сельскохозяйственной птицы / Б. Е. Егоров, Ю. Я. Кузьменко // *Хранение и переработка зерна*. – 2014. – № 3. – С. 39–41.
4. Метапробиотики вместо антибиотиков / Е. А. Ёлдырым [и др.] // *Птицеводство*. – 2020. – № 11. – С. 33–39.
5. Оценка влияния иммобилизации в полимерную матрицу пробиотика и ксиланазы на эффективность кормления птицы / Ж. А. Григорьева [и др.] // *Птицеводство*. – 2020. – № 12. – С. 21–25.
6. Папазян, Т. Престартерное кормление цыплят: проблемы и решения / Т. Папазян // *Птицеводство*. – 2010. – № 3. – С. 2–7.
7. Раннее кормление цыплят-бройлеров / С. М. Салгереев [и др.] // *Птицеводство*. – 2011. – № 6. – С. 25–26.
8. Bearson, B. L. A low pH-inducible, PhPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress / B. L. Bearson, L. Wilson, J. W. Forster // *J. Bacteriol.* – 1998. – Vol. 180, № 9. – P. 2409–2417.
9. Berg, R. D. Probiotics, prebiotics, synbiotics / R. D. Berg // *Trends Microbiol.* – 1998. – Vol. 6. – P. 89–92.
10. Blake, H. H. Probiotics and functional foods in gastrointestinal disorders / H. H. Blake // *Curr. Gastroenterol. Rep.* – 2001. – Vol. 3. – P. 343–350.
11. Fedorak, R. N. Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders / R. N. Fedorak, K. L. Madsen // *Curr. Opin Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 20. – P. 146–155.
12. Fernandes, C. F. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products / C. F. Fernandes, K. M. Shahani, M. A. Amer // *FEMC Microbiol. Rev.* – 1987. – Vol. 466. – P. 343–356.
13. Gibson, G. R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use / G. R. Gibson, R. Fuller // *J. Nutr.* – 2000. – Vol. 130, № 2 (Suppl). – P. 391S–395S.



ВАКЦИНА ИНАКТИВИРОВАННАЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА У ДОМАШНИХ ПТИЦ И ГОЛУБЕЙ

Колныювак Плюс

► **предназначена** для профилактики болезни Ньюкасла у домашних кур и голубей в личных и подсобных хозяйствах

► **содержит** вирусы болезни Ньюкасла (штамм «КМИЭВ-V104» и штамм «КМИЭВ-V42»), инаktivированные формалином, масляный адъювант



WWW.BIEVM.BY

УДК 619:616.9-08+614.3.48

Каменская Т.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент¹

Лукьянчик С.А., кандидат сельскохозяйственных наук¹

Тучковская А.В., зав. сектором неорганических сорбентов и антикоррозионных покрытий²

Шабловский В.О., кандидат химических наук²

Пап О.Г., научный сотрудник²

Борсук Н.Г., стажер²

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

²Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

ПОДБОР КОМПОЗИЦИЙ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ПОРОШКОВОГО ДЕЗИНФЕКТАНТА И ИЗУЧЕНИЕ БИОЦИДНЫХ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАИБОЛЕЕ ПЕРСПЕКТИВНОГО ОБРАЗЦА

Резюме

В статье отражены этапы подбора композиций для создания порошкового дезинфицирующего средства для санации объектов ветеринарного надзора, а также результаты исследования его антимикробной активности и токсичности.

Ключевые слова: дезинфекция, животные, токсичность, антимикробные свойства, пероксомоносульфат калия, клатраты четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) и мочевины, лабораторные животные.

Summary

The article reflects the stages of selecting compositions for the creation of a powder disinfectant for the sanitation of veterinary surveillance facilities and the results of its antimicrobial activity and toxicity.

Keywords: disinfection, animals, toxicity, antimicrobial properties, potassium peroxomonosulfate, quaternary ammonium compound (QAC) and urea clathrates, laboratory animals disinfection, animals, toxicity, hydrogen peroxide, white mice, rabbits.

Поступила в редакцию 31.10.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Получение высоких экономических показателей и использование в полной мере генетического потенциала сельскохозяйственных животных требует не только хорошего уровня кормления и грамотного использования лекарственных препаратов, но и четкого проведения ветеринарно-санитарных мероприятий. При современном промышленном содержании животных из-за высокой концентрации поголовья на ограниченной площади количество микроорганизмов в помещениях резко возрастает, и особенно многократно повышается количество патогенной микрофлоры, которая может быть причиной возникновения массовых болезней, гибели и вынужденного убоя животных. Это наносит большой экономический ущерб животноводству. Поэтому одной из остро стоящих проблем является достижение максимальной защищенности сельскохозяйственных животных и птицы от патогенных микро-

организмов [1–3]. Промышленные методы ведения животноводства с концентрацией большого поголовья скота экономически эффективны и позволяют решить проблему снабжения населения продуктами животноводства. Однако интенсивные технологии, на которых базируется современное животноводство, могут обуславливать накопление, вместе с естественными загрязнителями (аммиак, сероводород), большого количества различной микрофлоры, в том числе патогенной. Превышение порога содержания микроорганизмов в помещениях для животных приводит к увеличению микробной нагрузки и снижению естественной резистентности организма животных и, как следствие, к заболеваемости и падежу.

Несмотря на то, что ассортимент антимикробных препаратов для дезинфекции в последние годы существенно расширился, возрастает количество штаммов микроорганизмов, устойчивых к целым

классам химических соединений. Зачастую используемые дезинфицирующие средства характеризуются нежелательными побочными воздействиями как на животных, так и на человека, окружающую среду, обрабатываемые предметы и поверхности [4–5]. Поэтому создание новых эффективных дезинфицирующих средств является одной из основных проблем дезинфектологии и не утрачивает своей актуальности и в настоящее время, т.к. способствует решению важнейшей экономической и социальной задачи республики – увеличению производства молока и мяса.

В последние годы значительно возрос интерес к пероксидным дезинфектантам на основе стабилизированных композиций карбоновой, надкарбоновой кислоты и пероксида водорода в водной среде. Такие препараты обладают высокой эффективностью и широким спектром биоцидного действия. Применение пероксидных дезинфицирующих средств позволяет воздействовать практически на все известные виды вирусов и бактерий, в том числе и на споровые формы, что дает возможность использовать их для стерилизации, не требуя при этом периодической замены, т.к. они не вызывают резистентности у микроорганизмов. Эти дезинфектанты малотоксичны, эффективны в широком интервале положительных и отрицательных температур [6–9]. Только на территории РФ зарегистрировано более 150 пероксидных дезинфектантов.

Однако пероксидные дезинфицирующие средства в подавляющем большинстве выпускаются в жидкой форме [4]. Технология их получения длительна и сложна, требует строгого соблюдения правил безопасности. Средства характеризуются низкой устойчивостью, при хранении разлагаются под действием света, тепла, щелочной среды, а также ионов тяжелых металлов.

Необходимость создания высокоэффективных при использовании и стабильных при хранении пероксидных дезинфектантов в настоящее время является очевидной. Перспективными в этом отношении могут быть порошковые дезинфицирующие средства, в которых активными действующими соединениями являются неорганические пероксидные соединения, в частности пероксомоносульфат калия. Это продукт многотоннажного производства, используется в пищевой промышленности, косметологии,

бытовой химии, при получении пластмасс, пестицидов, а также в дезинфицирующих составах. Преимущества пероксомоносульфата калия по сравнению с пероксидом водорода и надкислотами заключаются в стабильности при хранении, простоте и безопасности в обращении при наличии высокой реакционной способности. В связи с этим дезинфицирующие средства на его основе уничтожают вирусы, бактерии и грибы даже при низких рабочих концентрациях вещества. Пероксомоносульфат калия вызывает окисление микробных гликопротеинов, полипептидов и нуклеиновых кислот, вступает в реакцию с сульфгидрильными группами белков, находящихся в капсидах вирусов.

До настоящего времени на рынке дезинфицирующих средств РБ и РФ присутствовали следующие порошковые препараты, в состав которых в качестве активно действующего соединения входил пероксомоносульфат калия: «Вирубой С» (РФ), «Виркон» (Германия), «Вирекс» (Великобритания), «Экоцид С» (Словения), «Дидицид» (РБ) и т.д. [7]. Возникает необходимость изыскания относительно дешевых, экологически безопасных средств, производимых на местной базе, доступных по стоимости и не уступающих зарубежным по эффективности, обладающих высоким антимикробным, дезодорирующим эффектом, применение которых не требует ограничения при реализации животноводческой продукции.

Целью данной работы явились исследования по созданию нового порошкового дезинфектанта, включающего в свой состав в качестве активно действующего вещества пероксомоносульфат калия и клатраты четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) и мочевины, а также изучение его антимикробных и токсикологических свойств.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Клатратные соединения впервые появились в классификации активно действующих веществ, которые целесообразно применять при разработке рецептур стерилизующих средств, в 2009 г., затем информация была включена в учебные пособия для студентов медицинских ВУЗов. Молекулярные клатраты образуются «хозяевами», имеющими внутримолекуляр-

ные полости. Такие клатраты могут существовать как в растворе, так и кристаллическом состоянии. Обращаясь к возможному механизму действия клатратов мочевины и биоцидного ЧАС, обладающего высокими антимикробными свойствами, можно предположить, что результат связан с множественными эффектами. ЧАС проявляет себя как биоцид, мочевина оказывает дегидратирующее и денатурирующее воздействие. В том месте, где аммониевая соль связывается с бактерией, происходит разрыв мембраны, через который происходит фатальная утечка клеточного содержимого. Молекула действует по типу «клинка», вонзённого в мембрану, создавая разрыв, который не может быть репарирован. На российском рынке присутствует серия дезинфицирующих средств под торговой маркой «Виркон», где в качестве активно действующего соединения используется клатрат мочевины и дидецилдиметиламмония бромида [10]. Однако клатраты «Виркон» выпускаются только в жидком виде, и их использование в качестве составляющих компонентов в порошковых дезинфектантах представляется весьма затруднительным.

Авторы работы получали клатраты мочевины и ЧАС в твердом виде в соответствии со способом, описанным в [11]. В качестве ЧАС в синтезах были использованы товарные продукты – бензалконий хлорид и дидецилдиметиламмония хлорид. Изучалось биоцидное действие как отдельных клатратов, так и их композиций с перексомоносульфатом калия (техническим продуктом, выпускаемым в виде тройной соли $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$). В исследуемых образцах порошковых дезинфектантов использовались также вспомогательные соединения, усиливающие дезинфицирующую активность композиций перексомоносульфата калия и клатратов мочевины, представляющие собой регуляторы кислотности и электролиты. Образцы изучаемых композиций были получены смешением активно действующих составляющих в заданном соотношении с последующим введением вспомогательных компонентов.

Оценку антимикробной активности компонентов и наиболее перспективных композиций проводили согласно [12]. Вначале была изучена эффективность наработанных изучаемых компонентов, которые

входят в создаваемые композиции препарата. Определение биоцидной эффективности проводили методом диффузии в агар. После инкубации тест-культур, подвергнутых обработкам создаваемыми композициями, измеряли зоны задержки роста. После того, как из общего списка изученных композиций были выделены наиболее эффективные, провели изучение антимикробной активности количественным суспензионным методом. Антимикробную активность изучали на тест-культурах бактерий *Staphylococcus aureus* – штамм КМИЭВ-B161; *Escherichia coli* 2005 (0141:K99) – КМИЭВ-B102; *Bacillus subtilis* – штамм КМИЭВ-B205.

В таблице 1 представлены результаты бактериологических испытаний рабочих растворов активно действующих соединений порошкового дезинфектанта, а также их композиций.

Как показали результаты испытаний, синтезированные в качестве активно действующих соединений клатрат мочевины с бензалконий хлоридом и клатрат мочевины с дидецилдиметиламмония хлоридом проявляют достаточно высокую бактериологическую активность. Однако для клатрата мочевины и бензалконий хлорида результаты оказались выше, чем для клатрата мочевины и дидецилдиметиламмония хлорида. Это и послужило определяющим фактором при выборе активно действующего соединения в составе порошкового дезинфектанта наряду с широко известным перексомоносульфатом калия. Композиция, состоящая из 50 % перексомоносульфата калия и 50 % клатрата мочевины с бензалконий хлоридом, не проявила активности в отношении *Bacillus subtilis* (образец 3), хотя другие культуры были чувствительны к образцу. Вместе с тем изменение соотношения активно действующих составляющих (образец 5) и введение регуляторов кислотности привело к увеличению зоны лизиса до 16 мм. Более заметное увеличение зоны лизиса (до 18–20 мм) характерно при введении в состав образца 4 не только регуляторов кислотности, но и электролитов (образец 6), что подтверждает правильность выбора вспомогательных соединений, повышающих активность перексомоносульфата калия и клатрата мочевины с бензалконий

ум хлоридом. Было также показано, что изменение соотношения мочевины и бензалкониум хлорида от 2:1 до 4:1 в составе клатрата приводит к увеличению биоцидной активности растворов порошкового дезин-

фектанта. Оптимальным по своему биоцидному действию оказался образец 7, используемый в качестве базового состава для разработки нового порошкового дезинфектанта.

Таблица 1 – Зоны лизиса тест-культур при воздействии рабочих растворов изучаемых композиций

Состав композиций	К, %	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Клатрат мочевины и бензалкониум хлорида (2:1)	1	25	30	-
	2	25	30	-
	5	25	30	-
Клатрат мочевины и дидецилдиметиламмония хлорида (2:1)	1	20	20	-
	2	22	16	-
	5	22	30	-
Пероксомоносульфат калия – 50 %, клатрат мочевины и бензалкониум хлорида (2:1) – 50 %	1	20	CP	CP
	2	24	14	CP
	5	26	20	CP
Пероксомоносульфат калия – 50 %, клатрат мочевины и бензалкониум хлорида (2:1) – 25 %, регуляторы кислотности – до 100 %	1	20	CP	CP
	2	22	CP	CP
	5	26	18	CP
Пероксомоносульфат калия – 25 %, клатрат мочевины и бензалкониум хлорида (2:1) – 50 %, регуляторы кислотности – до 100 %	1	22	18	14
	2	22	20	14
	5	24	22	16
Пероксомоносульфат калия – 50 %, клатрат мочевины и бензалкониум хлорида (2:1) – 25 %, регуляторы кислотности и электролиты – до 100 %	1	30	22	18
	2	35	22	20
	5	36	24	20
Пероксомоносульфат калия – 50 %, клатрат мочевины и бензалкониум хлорида (4:1) – 25 %, регуляторы кислотности и электролиты – до 100 %	1	28	20	18
	2	30	25	20
	5	33	26	20

Примечание – К – концентрация рабочего раствора; CP – сплошной рост культуры или зона менее 16 мм образец – не работает; 16–19 мм – культура малочувствительна к образцу; 20–24 мм – культура чувствительна к образцу; 25 мм и выше – культура высокочувствительна к образцу

В таблице 2 отражены результаты антимикробной активности отобранного образца дезинфектанта (образец № 7) к тест-культурам в количественном суспензионном методе.

Как видно из таблицы 2, отобранный образец порошкового дезинфицирующего средства обладал высокой степенью антимикробной активности в количественном суспензионном методе как с белковой нагрузкой, так и без нее. Фактор редукции ко всем изучаемым культурам всех изучаемых концентраций был выше 5 логарифмов, что согласно СанПин 21-112-99 соот-

ветствует данной группе дезинфицирующих средств.

На следующем этапе были изучены токсикологические свойства сконструированного образца порошкового дезинфектанта. Исследования по определению острой и хронической токсичности, аллергенных и раздражающих свойств образца порошкового дезинфицирующего средства проводили согласно [13]. Изучение острой токсичности проводили на клинически здоровых мышах. Группу опасности определяли по ГОСТ 12.1.007-76.

Таблица 2 – Антимикробная активность рабочих растворов наиболее эффективного образца порошкового дезинфицирующего средства к тест-культурам в количественном суспензионном методе

Тест-культура	Концентрация рабочего раствора, %	KOE	log	RF
	1,0*	$2,2 \times 10^2$	2,34	5,11
	контроль	$2,8 \times 10^7$	7,45	
	1,0* + л.с.	$2,2 \times 10^2$	2,34	5,00
	контроль с л.с.	$2,2 \times 10^7$	7,34	
<i>Escherichia coli</i>	2,0**	$1,7 \times 10^2$	2,23	5,16
	контроль	$2,5 \times 10^7$	7,39	
	2,0** + л.с.	$1,9 \times 10^2$	2,28	5,10
	контроль с л.с.	$2,4 \times 10^7$	7,38	
	5,0***	$2,2 \times 10^2$	2,34	5,13
	контроль	$3,0 \times 10^7$	7,47	
	5,0*** + л.с.	$2,7 \times 10^2$	2,43	5,10
	контроль с л.с.	$3,4 \times 10^7$	7,53	
	1,0*	$1,8 \times 10^2$	2,25	5,05
	контроль	$2,0 \times 10^7$	7,30	
	1,0 + л.с.	$1,9 \times 10^2$	2,28	5,04
	контроль с л.с.	$2,1 \times 10^7$	7,32	
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,0**	$1,9 \times 10^2$	2,27	5,12
	контроль	$2,5 \times 10^7$	7,39	
	2,0** + л.с.	$2,0 \times 10^2$	2,30	5,09
	контроль с л.с.	$2,5 \times 10^7$	7,39	
	5,0***	$2,5 \times 10^2$	2,39	5,93
	контроль	$2,1 \times 10^8$	8,32	
	5,0*** + л.с.	$1,9 \times 10^2$	2,28	5,16
	контроль с л.с.	$2,8 \times 10^7$	7,44	
	1,0*	$2,4 \times 10^2$	2,38	5,07
	контроль	$2,8 \times 10^7$	7,45	
	1,0* + л.с.	$2,2 \times 10^2$	2,34	5,01
	контроль с л.с.	$2,2 \times 10^7$	7,35	
<i>Bacillus subtilis</i>	2,0**	$2,2 \times 10^2$	2,34	5,11
	контроль	$2,8 \times 10^7$	7,45	
	2,0** + л.с.	$2,0 \times 10^2$	2,30	5,02
	контроль с л.с.	$2,1 \times 10^7$	7,32	
	5,0***	$2,2 \times 10^2$	2,34	5,23
	контроль	$3,7 \times 10^7$	7,57	
	5,0*** + л.с.	$2,0 \times 10^2$	2,30	5,19
	контроль с л.с.	$3,1 \times 10^7$	7,49	

Примечание – л.с – лошадиная сыворотка; *экспозиция 60 минут; **экспозиция 30 минут; ***экспозиция 15 минут

Первоначально на белых мышах устанавливали максимально переносимую дозу, при которой все животные оставались

живы, а также минимальную дозу, приводящую к гибели всех мышей. Брали также 3 промежуточные дозы.

Острую внутрижелудочную токсичность изучали на шести группах клинически здоровых мышей обоего пола массой 19,0 г, по 10 голов в каждой. Мышам принудительно внутрижелудочно вводили раствор (1 часть образца порошкового дезинфицирующего средства и 2 части 1%-ного крахмального клейстера) натошак: 1-й группе – 0,6 мл, что соответствовало 3020,0 мг/кг по АДВ, 2-й – 0,5 мл, что соответствовало 2520,0 мг/кг по АДВ, 3-й – 0,4 мл, что соответствовало 2010,0 мг/кг по АДВ, 4-й – 0,3 мл, что соответствовало 1510,0 мг/кг по АДВ, 5-й – 0,2 мл (1000,0 мг/кг по АДВ). 6-й группе вводили натошак в желудок 0,6 мл крахмального клейстера (таблица 3). Наблюдение вели в течение 14 суток. ЛД₅₀ рассчитывали по методу Кербера. Группу опасности определяли по ГОСТ 12.1.007-76.

Установлено, что в 1-й группе пали все животные. Гибель мышей наблюдали в течение первых 10 минут после введения препарата. Токсикоз у животных характеризовался выраженным возбуждением, одышкой, цианозом видимых слизистых и кожи. Затем наступало глубокое угнетение и кома, смерть наступала в результате асфиксии. Во 2-й группе падеж составил 80 %. Гибель животных происходила при схожих явлениях токсикоза, что и у мышей 1-й группы. Смерть наблюдалась в течение первого часа после введения. Оставшиеся в живых мыши в течение 2-3 дней отказывались от корма, отмечались признаки адинамии, угнетения, затем их общее состояние постепенно улучшалось, и на 7-е

сутки животные реагировали на внешние раздражители, охотно принимали корм и воду. В 3-й группе падеж составлял 50 %, гибель происходила при схожих явлениях токсикоза, что и у мышей 1-й и 2-й групп, однако признаки проявлялись в меньшей степени. Смерть животных наблюдали в течение последующих 7–10 ч после введения средства. Мыши, оставшиеся в живых, в течение 2 дней отказывались от воды и корма, затем их состояние улучшалось, и на 5-е сутки они принимали корм и воду, реагировали на внешние раздражители. В 4-й группе отмечен падеж 20 % животных, гибель происходила при схожих явлениях, однако признаки проявлялись в меньшей степени. Смерть мышей наблюдали в течение 3–5 суток после введения препарата. Животные, оставшиеся в живых, в течение 2 дней отказывались от воды и корма, затем их состояние улучшалось, и на 3-и сутки они принимали корм и воду, реагировали на внешние раздражители. В 5-й группе все животные после введения препарата оставались живы, признаки интоксикации проявлялись незначительно. В 6-й группе (контрольной) падежа не отмечено. В течение всего опыта животные вели себя адекватно, охотно принимали корм и воду, реагировали на внешние раздражители.

При патологоанатомическом вскрытии павших мышей обнаруживали застойные явления в паренхиматозных органах, наблюдались дистрофия печени, почек, желтушность слизистых оболочек, на слизистой желудка – кровоизлияния.

Таблица 3 – Результаты определения острой токсичности образца порошкового дезинфицирующего средства при внутрижелудочном введении белым мышам

Группа	Доза, мг/кг	Кол-во животных, гол.	Из них		
			погибло	осталось в живых	% гибели
1	3020,0	10	10	0	100
2	2520,0	10	8	2	80
3	2010,0	10	5	5	50
4	1510,0	10	2	8	20
5	1000,0	10	0	10	0
6	-	10	0	10	0

Примечание – в 1–5 группах признаки интоксикации (угнетение, вздутие живота, отказ от корма) и гибель проявлялись в первые 2 дня после введения средства

Таблица 4 – Расчет ЛД₅₀ методом Кербера

Группа	Z	d	Zd
2	9,0	500,0	4500,0
3	7,5	510,0	3825,0
4	6,0	500,0	3000,0
		$\sum (zd)$	11325,0

Среднесмертельную дозу (ЛД₅₀) определяли по формуле:

$$ЛД_{50} = ЛД_{100} - \frac{\sum (zd)}{m},$$

где z – половина суммы числа животных, павших от двух последующих доз;

d – разница в величинах двух последующих доз;

m – количество животных, взятых в опыте на каждую дозу.

В результате получено:

$$ЛД_{50} = 3020 - \frac{11\,325}{10} = 1888 \text{ мг/кг.}$$

Таким образом, согласно ГОСТ 12.1.007-76 образец порошкового дезинфицирующего средства при внутрижелудочном введении относится к III классу – умеренно опасным веществам.

Для определения хронической токсичности в опыте на белых мышах формировали 4 группы. Животным 1-й группы вводили в течение 10 дней внутрь 1/10 LD₅₀ (188,8/кг по ДВ), 2-й группы – 1/20 LD₅₀ (94,40 мг/кг), 3-й – 1/50 LD₅₀ (37,76 мг/кг), 4-я группа была контрольной (вводили раствор крахмального клейсте-

ра). При проведении опыта учитывали общее клиническое состояние животных, поедаемость корма, прирост живой массы и патологоанатомические изменения в органах по окончании опыта.

Установлено, что внутрижелудочное введение мышам в течение 10 дней 1/10, 1/20 и 1/50 LD₅₀ не вызвало изменений в их поведении, общем состоянии и поедаемости корма. В опытных группах наблюдался отвес животных по сравнению с первоначальным значением: при введении 1/10 ЛД₅₀ масса одного животного была ниже на 1,3 г, при дозе 1/20 ЛД₅₀ – на 0,9 г, при 1/50 LD₅₀ – на 0,4 г. При вскрытии мышей по окончании опыта изменений во внутренних органах не обнаружено.

Изучение острой токсичности при ингаляционном воздействии проводили на белых мышах с использованием статистической заправки в эксикаторе, на дно которого помещали емкость с образцом порошкового дезинфицирующего средства, а сверху на сетке размещали подопытных животных. Острая ингаляционная токсичность (ЛК₅₀) составила 2000 мл/м³, максимальная недействующая доза – 1500 мл/м³ (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты определения острой ингаляционной токсичности образца сухого дезинфицирующего средства для белых мышей

Группа	Количество препарата, мг/м ³	Экспозиция, мин	Количество животных, гол.		
			всего	пало	живых
1	3000	120	6	6	0
2	2500	120	6	4	2
3	2000	120	6	3	3
4	1500	120	6	0	6

Примечание – интоксикация проявлялась угнетением, отказом от корма, учащенным дыханием, взъерошенностью шерсти, гибель наступала в течение 1–3 дней

Ингаляционные обработки белых мышей в герметических камерах в течение 10 дней из расчета 1/10 и 1/20 ЛК₅₀ не вызывали изменений в поведении, общем состоянии и поедаемости корма. В опытных группах, как и при внутрижелудочном введении, наблюдали отвес живой массы по сравнению с первоначальными значениями. Прирост живой массы в 1-й опытной группе мышей (1/10 ЛК₅₀) составил 0,9 г, 2-й (1/20 ЛК₅₀) – 0,7 г, 3-й (1/50 ЛК₅₀) – 0,2 г. При вскрытии животных после окончания опыта у мышей 1-й опытной группы в легких в 50 % случаев отмечалась застойная гиперемия. В других внутренних органах видимые изменения отсутствовали. У мышей 2-й и 3-й опытных групп отклонений от нормы не обнаружено.

Местное раздражающее действие образца порошкового дезинфицирующего средства на кожу исследовали на кроликах. На выстриженные участки кожных покровов размером 2×3 см равномерно наносили 50%-ный водный раствор изучаемого образца в виде аппликации в количестве 0,1 см³ и выдерживали в течение 4 ч. По окончании аппликации остатки средства удаляли ватным тампоном, смоченным теплой водой. За животными вели наблюдение в течение 14 дней. Контрольным животным на выстриженные участки кожи наносили дистиллированную воду. Реакцию кожи регистрировали сразу по окончании экспозиции, через 1 ч и 16 ч после ее окончания. Наблюдали за появлением на коже гиперемии, отека, утолщения кожной складки и расчесов, болезненности при пальпации. Исследования раздражающих свойств показали, что однократное нанесение на кожу изучаемого образца в виде водного 50%-ного раствора реакции в виде эритемы или отека не вызывало.

Для изучения раздражающего действия образца порошкового дезинфицирующего средства на слизистые оболочки и орган зрения провели опыт на трех кроликах живой массой 2,0±0,5 кг. Для этого в нижний конъюнктивальный свод правого глаза однократно вносили изучаемое средство в виде водного 50%-ного раствора, а в левый (контроль) – по 1-2 капли дистиллированной воды (без препарата). За животными наблюдали в течение 2 недель, а первые 8 ч после инстилляций – ежедневно. Ре-

гистрировали признаки раздражения слизистой оболочки (слезотечение, птоз, инъекцию сосудов, набухание век и др.), их выраженность и длительность, состояние век и давали оценку степени выраженности раздражающего действия препарата согласно таблице методических указаний [13].

Установлено, что нанесение на слизистую оболочку глаза кроликов 50%-ного водного раствора образца сухого дезинфицирующего средства, что превышает в 10 раз максимально используемую рабочую концентрацию, вызывало слезотечение, не исчезающее через 24 ч, выраженную инъекцию сосудов конъюнктивы и роговицы, слабый отек век, исчезающий через 24 ч, что соответствует умеренному раздражающему действию на слизистую оболочку глаза кролика (5 баллов). При изучении местного действия порошкового дезинфицирующего средства на кожу установлена слабая (розовая) интенсивность эритемы, наблюдалось отсутствие интенсивности отека кожи, что соответствует 2-му классу выраженности раздражающих свойств при однократном нанесении на кожу (слабое раздражающее действие).

Для изучения сенсibilизирующих свойств порошкового дезинфицирующего средства провели опыт на 6 кроликах живой массой 2,0±0,5 кг, которым на один и тот же участок многократно в течение 15 суток наносили изучаемый образец в виде суспензии с крахмальным клейстером (соотношение 1:2) в количестве 0,1 см³, контрольным животным – крахмальным клейстер без средства. После 14-дневного интервала наносили разрешающую дозу образца порошкового дезинфицирующего средства в том же количестве и проводили учет реакции кожи (эритема, отек кожи, геморрагии, некроз) через 24, 48 и 72 ч.

Ежедневные накожные аппликации образца сухого дезинфицирующего средства кроликам в течение 15 дней в виде суспензии с крахмальным клейстером (соотношение 1:2) в количестве 0,1 см³ и нанесение после 14-дневного перерыва разрешающей дозы не вызывало изменений в реакции организма и состоянии кожного покрова, что говорит об отсутствии сенсibilизирующих свойств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сконструирован рабочий образец порошкового дезинфицирующего средства, состоящий из пероксомоносульфата калия – 50 %, клатрата мочевины и бензалконииум хлорида (4:1) – 25 %, регуляторов кислотности и электролитов – до 100 %.

При изучении антимикробных свойств в количественном суспензионном тесте установлено, что в представленном образце порошкового дезинфицирующего средства в концентрации 1,0 % и выше на тест-культуры микроорганизмов (представителей 1-й, 2-й, 3-й и 4-й групп по чувствительности к дезинфицирующим средствам) фактор редукции был выше 5 логарифмов, в том числе и с белковой нагруз-

кой, что является удовлетворительным показателем для дезинфицирующих средств данной группы.

По результатам исследований установлено, что ЛД₅₀ при внутрижелудочном введении составила 1888 мг/кг, ЛК₅₀ при ингаляционном введении – 2000 мл/м³, что соответствует III классу опасности – умеренно опасным веществам. Изучаемый образец не обладает хронической токсичностью, вызывает умеренное раздражающее действие на слизистую оболочку глаза и слабое раздражающее действие на кожу при однократном нанесении, не оказывает сенсibilизирующего действия на организм животных.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Любов, А. С. Ветеринарно-санитарные мероприятия в местах содержания животных и первичной переработки продуктов животноводства / А. С. Любов, Н. Н. Семенова // Молодежь и наука. – 2018. – № 4. – С. 36–37.
2. Современные направления ветеринарно-санитарной науки в обеспечении биологической и продовольственной безопасности / В. И. Дорожкин [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2018. – № 2. – С. 37–39.
3. Дезинфекционные мероприятия в условиях интенсивного животноводства / Т. Н. Каменская [и др.] // Экология и животный мир. – 2021. – № 1. – С. 45–49.
4. Выбор дезинфицирующих средств: многообразие выбора – многообразие проблем / В. И. Прилуцкий [и др.] // Медицинский алфавит. – 2010. – Т. 1. – № 3. – С. 39–44.
5. Вопросы ветеринарной санитарии в решении проблем экологии / В. И. Дорожкин [и др.] // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2017. – № 3 (23). – С. 6–10.
6. Использование дезинфектанта «Пермокс» для санации животноводческих помещений / А. А. Богуш [и др.] // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: сб. науч. трудов / Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Главное управление образования, науки и кадров, Учреждение образования «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия». – Горки, 2009. – Вып. 12. – Ч. 1. – С. 221–227.
7. Решетникова, Т. И. Эффективность дезинфицирующих средств «Экоцид-С» и «Вироцид», применяемых для аэрозольной дезинфекции помещений в присутствии животных, в целях профилактики респираторных и желудочно-кишечных болезней свиней / Т. И. Решетникова // Вопросы нормативно правового регулирования в ветеринарии. – 2017. – № 4. – С. 43–47.
8. Кривенок, Л. Л. Использование перекисного препарата для дезинфекции помещений и санации животных / Л. Л. Кривенок // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2020. – № 4. – С. 17–21.
9. Антимикробная, противовирусная активность и токсичность средства дезинфицирующего «МС Гипердез» / Т. Н. Каменская [и др.] // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2020. – № 4. – С. 48–53.
10. Иванова, Е. Б. Выбор химических средств на основе клатратных соединений для стерилизации ИМН обеспечивает качество и деликатность процесса стерилизации / Е. Б. Иванова, И. А. Гордюшев // Медицинские изделия. – 2017. – № 4. – С. 33–35.
11. Патент RU 2180222, МПК А61К 31/14, 47/48, 7/16 Антимикробное средство : № 2000104683/14 : заявл. 29.02.2000, опубл. 10.03.2002 / А. Г. Чухаджян, Г. А. Чухаджян, А. Г. Чухаджян; заявитель А. Г. Чухаджян // Официальный бюл. Роспатента № 8.
12. Нормативные показатели безопасности и эффективности дезинфекционных средств : СанПиН 21-112-99 : утв. Главным санитарным врачом Республики Беларусь 06.01.1999 г.
13. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии / НАН Беларуси, Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеслесского; сост. А. Э. Высоцкий [и др.]. – Минск, 2007. – 156 с.