

*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. Вышеслесского», ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности РАН»

**ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:**

**Ломако Ю.В.** – кандидат ветеринарных наук, доцент

**ЗАМ. ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:**

**Якубовский М.В.** – доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент ААН РБ

**СЕКРЕТАРЬ:**

**Радюш И.С.** – кандидат ветеринарных наук

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:**

**Борисовец Д.С.** – кандидат ветеринарных наук

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

**Кузьминский И.И.** – кандидат ветеринарных наук

**Кучинский М.П.** – доктор ветеринарных наук, профессор

**Лысенко А.П.** – доктор ветеринарных наук, профессор

**НАД НОМЕРОМ РАБОТАЛИ:**

**Лукьянова И.А.**

Ответственность за достоверность данных несут авторы статей. Опубликованные материалы отражают точку зрения авторов и могут не совпадать с точкой зрения редколлегии.

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

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:**

**ПРЕДСЕДАТЕЛЬ**

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

**ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:**

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

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

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

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

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

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

**Нычик С.А.** – доктор ветеринарных наук, профессор (г. Киев)

**Самуйленко А.Я.** – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН (г. Щёлково)

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

**Субботин А.М.** – доктор биологических наук, профессор (г. Минск)

**Ткачев А.В.** – доктор сельскохозяйственных наук (г. Харьков)

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

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

**ВСЕ СТАТЬИ РЕЦЕНЗИРУЮТСЯ**

© «Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария»

**СО ДЕРЖАНИЕ****ЭПИЗООТОЛОГИЯ**

Черник М.И., Радюш И.С., Захарик Н.В. КЛИНИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ АКТУАЛЬНЫХ ДЛЯ БЕЛАРУСИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПЧЁЛ И МЕРОПРИЯТИЯ ПО ИХ ПРОФИЛАКТИКЕ

Андрусевич А.С., Мистейко М.М., Финогенова Е.Г., Стрельченя И.И. ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ИСПЫТАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ «РЕСПИВАК» ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ПАСТЕРЕЛЛЁЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

**ИММУНОБИОЛОГИЯ**

Лысенко А.П., Власенко В.В., Лемиш А.П., Красникова Е.Л., Высоцкий А.Э., Притыченко А.Н., Букова Н.К. МИКОБАКТЕРИИ ТУБЕРКУЛЕЗА С ДЕФЕКТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКОЙ ОБНАРУЖЕНЫ В МОЗГЕ КОЗ СО СПОНГИМОРФНЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ

Стегний Б.Т., Гаврюшенко Е.А., Музыка Д.В. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭПИЗОТИЧЕСКОГО ИЗОЛЯТА ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ

Пустовит Н.А., Пинчук Н.Г. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТА *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, ВЫДЕЛЕННОГО ОТ ПТИЦЫ

Черник М.И., Радюш И.С., Тяпша Ю.И., Дубаневич О.В. ВЫДЕЛЕНИЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА ДЕФОРМАЦИИ КРЫЛА ПЧЕЛЫ МЕДОНОСНОЙ (*APIS MELLIFERA L.*) В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Красникова Е.Л., Андрусевич А.С., Мальчик О.В., Стрельченя И.И. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ MULTIPLEX ПЦР *PASTEURELLA MULTOCIDA* А, В, D ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СЕРОВАРИАНТОВ ПАСТЕРЕЛЛ

Борисовец Д.С., Згиrowsкая А.А., Толяронок Г.Е., Морозов А.М., Герасименко В.И., Дик Е.А. РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГА И ИММУНОСТИМУЛЯТОРА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Згиrowsкая А.А., Борисовец Д.С., Пукач Ю.С., Виршич А.В., Пунтус И.А. ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ 2-ГО ТИПА

**ФАРМАКОЛОГИЯ**

Насонов И.В., Зинина Н.В., Кныш Н.В., Захарик Н.В., Гуринович О.Л., Волчек Л.Т. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСНЫХ АДСОРБЕНТОВ В КОРМАХ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

Насонов И.В. СРАВНИТЕЛЬНАЯ СОРБЦИОННАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ МИКОТОКСИНОВ *IN VITRO*

Гудзь В.П., Белявский В.Н. СОДЕРЖАНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ АНТИБИОТИКОВ В МОЛОКЕ КОРОВ ПОСЛЕ ВНУТРИМАТОЧНОГО И ИНТРАЦИСТЕРНАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ

Мясцова Т.Я., Якубовский М.В. ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА «ПРАЗИФЕН» НА ОРГАНИЗМ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

ВАЛЕРИЙ МИТРОФАНОВИЧ ЛЕМЕШ (К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)

**CONTENTS****EPIZOOTOLOGY**

Chernik M.I., Radyush I.S., Zakharik N.V. CLINICAL MANIFESTATION OF VIRAL BEE DISEASES ACTUAL FOR BELARUS AND ACTIVITIES FOR THEIR PREVENTION

Andrusevich A.S., Misteyko M.M., Finogenova E.G., Strelchenya I.I. PRODUCTION TESTS OF IMMUNOLOGICAL EFFICACY OF «RESPIVAK» FOR PREVENTION OF PASTEURELLOSIS OF CATTLE

**IMMUNOBIOLOGY**

Lysenko A.P., Vlasenko V.V., Lemish A.P., Krasnikova E.L., Vysotsky A.E., Pritychenko A.N., Bukova N.K. MYCOBACTERIA OF TUBERCULOSIS WITH A CELL DEFICIENT WALL ARE FOUND IN A BRAIN OF GOATS WITH SPONGIFORM CHANGES

Stegny B.T., Gavryushenko E.A., Music D.V. BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE EPISOOTIC ISOLATE OF THE VIRUS OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE

Pustovit N.A., Pinchuk N.G. STUDYING THE PROPERTIES OF THE ISOLATE *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, ISOLATED FROM A BIRD

Chernik M.I., Radziush I.S., Tyapsha Y.I., Dubanovich O.V. ISOLATION, CULTIVATION AND IDENTIFICATION OF DEFORMED WING VIRUS OF HONEYBEES (*APIS MELLIFERA L.*) IN THE REPUBLIC OF BELARUS

Krasnikova E.L., Andrusevich A.S., Malchik O.V., Strelchenya I.I. SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF MULTIPLEX PCR *PASTEURELLA MULTOCIDA* A, B, D FOR DETECTING PASTERELLA SEROVIARIANT

Borisovets D.S., Zgirovskaya A.A., Tolyaronok G.E., Morozov A.M., Gerasimenko V.I., Dick E.A. DEVELOPMENT OF A PREPARATION BASED ON BACTERIOPHAGES AND IMMUNES OF THE MULTIVATOR FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF RESPIRATORY DISEASES OF YOUNG HARROW CATTLE

Zgirovskaya A.A., Borisovets D.S., Pukach Yu.S., Virshich A.V., Puntus I.A. ISOLATION, IDENTIFICATION AND CULTIVATION OF THE TYPE 2 CIRCULAR CIRCOVIRUS

**FARMACOLOGY**

Nasonov I.V., Zinina N.V., Knysh N.V., Zakharik N.V., Gurinovich O.L., Volchek L.T. EFFICIENCY OF THE USE OF COMPLEX ADSORBENTS IN THE FEEDS OF CHICKEN-BROILERS

Nasonov I.V. COMPARATIVE SORPTION EFFICIENCY OF PREPARATIONS AGAINST MYCOTOXINS *IN VITRO*

Gudz V.P., Belyavsky V.N. CONTENT OF RESIDUAL QUANTITIES OF ANTIBIOTICS IN COW MILK AFTER INTRAVAGINAL AND INTRACRISTERNAL INTRODUCTION

Myastsova T.Ya., Yakubovsky M.V. INFLUENCE OF COMPLEX PREPARATION «PRASIPHEN» ON THE ORGANISM OF LABORATORY ANIMALS

VALERY MITROFANOVICH LEMESH (TO THE 80-TH BIRTHDAY)

Компьютерная верстка: ЛУКЬЯНОВА И.А.

Подписано в печать 13.12.2018 г.

Формат 60x84<sup>1/8</sup> Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.

Уч.-изд. л. , усл. печ. л. 11,16 Тираж 100 экз. Заказ №

220003, г. Минск, ул. Брикета, 28, E-mail: biev@m.tut.by; KNIR@tut.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 619:638.154.2

Черник М.И., кандидат ветеринарных наук  
 Радюш И.С., кандидат ветеринарных наук  
 Захарик Н.В., кандидат ветеринарных наук

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

## КЛИНИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ АКТУАЛЬНЫХ ДЛЯ БЕЛАРУСИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПЧЁЛ И МЕРОПРИЯТИЯ ПО ИХ ПРОФИЛАКТИКЕ

### Резюме

*В настоящее время вирусозы пчёл представляют одну из актуальных проблем пчеловодства всего мира и привлекают к себе пристальное внимание многих исследователей.*

*Отсутствие данных о распространении вирусозов пчёл в Республике Беларусь, особенностях течения, клинического проявления обусловлено сложностью диагностики вирусных инфекций пчёл и не позволяет своевременно выявлять данные патологии и эффективно использовать потенциал пчелосемей.*

*В статье представлены данные по этиологии, симптоматике, эпизоотологии, диагностике и профилактике вирусных болезней пчёл, а также приводятся общие мероприятия по их профилактике.*

### Summary

*At present, the virose bees represent one of the urgent problems of beekeeping throughout the world and attract the close attention of many researchers.*

*The lack of data on the distribution of bee virosis in the Republic of Belarus, the flow characteristics, clinical manifestation is due to the complexity of diagnosing bee viral infections and does not allow timely detection of these pathologies and efficient use of the potential of bee colonies.*

*The article presents data on the etiology, symptomatology, epizootology, diagnosis and prevention of viral diseases of bees, as well as provides general measures for their prevention.*

*Поступила в редакцию 12.10.2018 г.*

Количество угроз, с которыми сегодня сталкивается пчеловодство, стремительно растёт [2]. Особую опасность для пчеловодства представляют вирусы, которые способны поражать взрослых медоносных пчёл, их личинок и куколок [2, 9, 13, 20]. Из более чем 7000 известных в настоящее время вирусов около 24 выделено из пчёл. Размер вирионов у вирусов, поражающих пчёл, колеблется от 17 до 450 нм, форма разнообразная: нитевидная, многогранная, эллипсоидная, сферическая.

Интенсивное распространение клеща варроа во второй половине XX века резко изменило эпизоотическое состояние по вирусам пчёл. Клещ *Varroa destructor* играет одну из ключевых ролей в распространении вирусных инфекций пчёл. Доказано, что такие вирусы, как кашмир вирус, вирус мешотчатого расплода, вирус острого паралича пчёл, израильский вирус острого паралича и вирус деформации крыла могут быть

переданы клещом *Varroa destructor*.

Установлено, что возбудители нозематоза пчёл *Nozema apis* и *Nozema cerana*, паразитирующие в кишечнике пчёл, способствуют заражению пчёл вирусом черных маточников, нитевидным вирусом и иридовиром [1].

В отсутствие клеща вирусы вызывают скрытые инфекции, и раньше они считались незначительной проблемой для здоровья медоносной пчелы. Попадая в организм пчелы, вирусы могут находиться там длительное время в латентной форме и передаваться от особи к особи без признаков заболевания. Однако при различного рода стрессах они начинают интенсивно размножаться и поражать клетки различных органов, что приводит к гибели хозяина.

На одной пасеке могут циркулировать сразу несколько вирусов, а отдельные штаммы вирусов могут быть очень контагиозны, что приводит к коллапсу пчелиной

семьи, потере огромного количества пчёл и тем самым обуславливает экономический упадок отрасли [2, 9, 13, 20]. Дальнейшее успешное развитие пчеловодства немислимо без изучения вирусов медоносных пчёл и разработки эффективных средств диагностики, лечения и профилактики вирусных болезней пчёл [2, 20].

В данной работе обобщены современные сведения об основных наиболее распространённых вирусных заболеваниях медоносных пчёл, опубликованные в отечественной и зарубежной литературе.

**Мешотчатый расплод** – заболевание предкуколок медоносных пчёл [2]. На территории бывшего СССР болезнь была установлена К.А. Горбачевым в 1917 году.

Возбудитель болезни – РНК-геномный вирус сферической формы диаметром 30 нм (SBV) [2, 3, 13]. Он относится к семейству *Iflaviridae* [13, 20], размножается в живых клетках пчелы и пчелиных личинках [3, 13].

В лабораторных условиях вирус культивируется в культурах ткани медоносной пчелы, а также в первичнотрипсинизированных культурах куриных и мышинных фибробластов, почек обезьян после адаптации вируса к данным системам культивирования. Перевиваемые линии клеток позвоночных невосприимчивы к заражению [2].

Штаммы SBV серологически неидентичны. Местные популяции пчёл более устойчивы к штаммам вируса, выделенным в этой же зоне, по сравнению с завезёнными. В естественных и экспериментальных условиях заражаются личинки рабочих

пчёл, маток и трутней всех возрастов независимо от породы, но наиболее восприимчивы к заражению личинки 2–3-суточного возраста [2, 7]. Продолжительность инкубационного периода составляет 5–6 дней. Возбудитель не вызывает у взрослых пчёл признаков поражения, однако развивается в их организме и передаётся от них при кормлении и уходе за личинками. Размножение вируса происходит в основном в слюнных железах пчёл-кормилиц, которые способны передавать его расплоду и сохранять на протяжении всей жизни [2, 7].

Заболевание пчёл чаще отмечают весной и в первой половине лета после продолжительной холодной погоды при недостатке перги и мёда в семьях. Инфицированные молодые пчелы прекращают кормление личинок, раньше начинают участвовать в медосборе, но плохо собирают пыльцу.

В период активного медосбора признаки заболевания затухают, однако вновь отмечаются осенью или весной следующего года, из зимовки такие семьи выходят ослабленными [2, 3].

Экспериментально доказано, что вирус мешотчатого расплода может передаваться пчелиной маткой через яйцо, при этом матка выглядит совершенно здоровой [1]. Установлено, что до 6 % личинок могут погибать от этого вируса даже в семьях, которые казались абсолютно здоровыми. При невысокой степени поражения болезнь может оставаться незамеченной продолжительное время.



Рисунок 1. – а, б. Отверстия в крышечках запечатанного расплода, поражённого вирусом мешотчатого расплода. Фото. Оригинал

Самые яркие симптомы заболевания появляются через несколько дней после запечатывания ячеек: в поражённых семьях расплод на соте неравномерный, пёстрый; на многих ячейках с печатным расплодом крышечки удалены или имеют одно-два отверстия и выглядят слегка запавшими (рисунок 1).

У недавно погибших личинок головной конец слегка отходит от края ячейки (рисунок 2), тело имеет вид мешка, заполненного зернистой, мутной жидкостью белого цвета.



**Рисунок 2. – Вскрытые ячейки печатного расплода с погибшими личинками. Фото**

Затем происходит потемнение головного конца личинки (рисунок 3), сегментация её сглаживается, объём жидкости увеличивается, личинка приобретает коричневый цвет, упругость её тела постепенно утрачивается при сохранении своей формы.



**Рисунок 3. – Потемнение головного конца личинки. Фото**

В дальнейшем содержимое полости тела становится клейким и бесформенным, предкуколки приобретают тёмно-коричне-

вый или чёрный цвет, высыхают и имеют вид полулунных корочек, лежащих выпуклой (спинной) стороной на стенке ячейки; их можно легко удалить. Количество поражённых предкуколок постепенно нарастает, семьи слабеют [2, 7, 8].

Мешотчатый расплод в семьях пчёл часто протекает совместно с европейским гнильцом. Это приводит к постановке неверного диагноза [2].

Диагноз ставят на основании лабораторного исследования патологического материала [2].

Не меньшую озабоченность у пчеловодов Беларуси вызывает **болезнь деформации крыла**, которая на сегодняшний день получила широкое распространение на пчелопасеках всех стран мира. Вирус деформации крыла установлен в 1983 году [4, 5].

Болезнь деформации крыла пчёл характеризуется появлением пчёл с уродливыми крыльями (рисунок 4), одновременной гибелью куколок и молодых медоносных и восковых (среднеиндийских) пчёл [4, 5].

Возбудитель болезни деформации крыла пчёл (DWV) – довольно нестабильный икосаэдрический вирус диаметром 30 нм семейства *Iflaviridae* [9, 13, 16, 20]. Вирус культивируется в культурах клеток медоносной пчелы. Способность к репродукции в культурах клеток млекопитающих и птиц изучена недостаточно.

DWV обнаружен у карликовой индийской (*Apis florea*) и гигантской медоносной пчел (*Apis dorsata*), шмеля земляного (*Bombus terrestris*), шмеля полевого (*Bombus pascuorum*) [8, 16].

Известно, что DWV отдалённо связан с пикорнавирусами человека [19], генетически тесно связан с вирусом *Varroa destructor* (VDV-1) [20]. Египетский пчелиный вирус (EBV) серологически связан с DWV, однако он не вызывает известных симптомов у взрослых пчёл, куколок или личинок [20]. Отмечена высокая степень сходства DWV и вируса, изолированного в Японии (*Kakugo*-вирус), именно этот изолят и получил название «вирус деформации крыла» [16].

Согласно последним данным основным переносчиком DWV служит клещ *Varroa destructor* [4, 5, 7, 13, 16], тесная ассоциация с клещом *V. destructor* способствовала его распространению в глобальных масштабах [5, 9, 16].

По данным Масленникова В. И. и др. (2018 г.) на территории Северного, Центрального и Южного федеральных округов европейской территории России выявлена тотальная (100 %) инфицированность пчёл вирусом деформации крыла [11].



**Рисунок 4. – Пчела с деформированными крыльями. Фото. Оригинал**

Вирус может размножаться и в организме клеща. Во время размножения варроа внутри ячейки с заражённой куколкой вирус переходит к его потомству. Инфицированные вирусом паразиты обнаруживаются в семьях за несколько недель до проявления признаков заболевания. Инфицированные клещи могут заразить более 80 % куколок пчёл, из которых примерно 20 % погибает, из остальных выходят короткоживущие особи. При паразитировании на взрослых пчёлах инфицированные клещи могут заражать их на 100 %, но продолжительность жизни насекомых при этом не сокращается, что способствует длительному сохранению инфекции в семье.

По последним данным, вирус деформации крыла может размножаться не во всех клещах, следовательно, только некоторые из них являются биологическими переносчиками. Процент их колеблется в разных популяциях. Чем он выше, тем чаще встречаются пчёлы с деформированными крыльями [10].

Болезнь быстро распространяется внутри семьи пчёл, между семьями сосед-

них пасек, особенно при отсутствии медосбора, провоцирующем пчелиное воровство [4]. Заболевание чаще наблюдается во второй половине лета и осенью, когда в пчелиной семье нарастает популяция клеща *V. destructor* [4, 5].



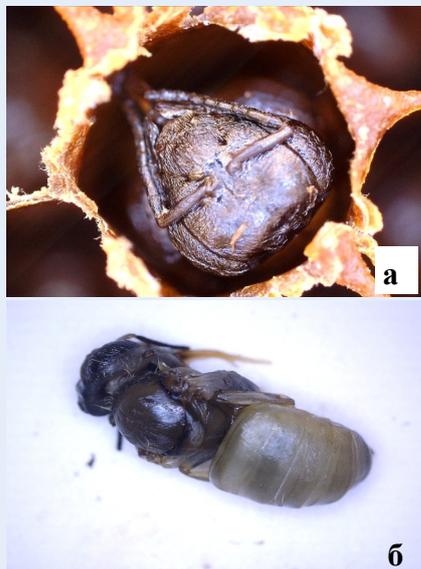
**Рисунок 5. – Укороченное брюшко и деформированные крылья погибшей куколки пчелы. Фото. Оригинал**

В отсутствие *V. destructor* инфекция обычно сохраняется в колонии пчёл на низких уровнях, не приводя к появлению видимых симптомов, однако возбудитель может быть обнаружен на всех стадиях жизни пчелы, а также в маточном молочке, корме, используемом для питания личинок и королевы [9, 16, 21]. Носительство инфекции пчёл бессимптомное. Клещ варроа активизирует вирусную инфекцию. Заражение пчелиной куколки, от клеща, более эффективно, чем личинки от заражённых пчел-кормилиц. DWV передается между пчёлами как горизонтально (через личиночный корм и, возможно, фекалии), так и вертикально (сперма и яйца) [16, 21].

Симптомы зависят от количества вируса. Болезнь протекает с большой гибелью пчёл. При осмотре расплода отмечают его пестроту и то, что его покрывает малое количество пчёл, часть печатных ячеек вскрыта. На дне улья и около него можно обнаружить мёртвых куколок и молодых рабочих пчёл, с деформированными крыльями, укороченным брюшком, уменьшенными размерами тела (рисунки 5, 6).

У внешне здоровых пчёл отмечается паралич конечностей и крыльев, которые расставлены или опущены и волочатся при движении пчелы, наличие почерневших пчёл («лысые» пчёлы) [5, 8, 9, 16, 20]. Се-

мьи слабеют, потери взрослых рабочих пчёл в августе достигают до одной улочки в неделю, семья сокращается с 50–60 тыс. особей до 1000–1500 и погибает. Продолжительность болезни в среднем составляет 1–2 месяца [4].



**Рисунок 6. – а, б. Погибшие куколки, зараженные вирусом деформации крыла . Фото. Оригинал**

По наблюдениям О.Ф. Грובה [10], пчёлы с деформированными крыльями, а часто практически бескрылые появляются из выживших заражённых куколок (деформация крыльев происходит в процессе созревания таких куколок) и могут длительное время активно ползать по сотам. Погибают они непосредственно не от вируса, а после того, как покинут улей, от голода. Еще дольше выживают заражённые пчёлы с укороченным брюшком, способные летать. Но такие пчёлы не переживают зиму.

Для подтверждения диагноза необходимо направить с сопроводительной в областную ветлабораторию не менее 50 пчёл с характерными признаками болезни, которых допустимо консервировать в 50 % глицерине [5].

Материал исследуют в реакции иммунодиффузии со специфической сывороткой [4].

**Острый паралич пчёл** – болезнь взрослых пчёл, вызываемая РНК-геномным вирусом (ABPV) икосаэдрической симмет-

рии диаметром 30 нм, относящимся к семейству *Dicistroviridae* [2, 8, 12, 13].

Ущерб, наносимый острым параличом, складывается из гибели, снижения мёдопродуктивности и прироста семей пчёл на пасеках [2].

Вирус часто обнаруживают в небольших концентрациях у внешне здоровых пчёл. В лабораторных условиях парентеральное введение таким насекомым безбактериальных экстрактов с достаточной вирионной нагрузкой вызывает их гибель на второй день [2, 20]. Вирус острого паралича не размножается в присутствии возбудителей чёрных маточников и мешотчатого расплода и с трудом выделяется от пчёл в осенне-зимний период [2].

Распространению вируса на пасеках способствует клещ *Varroa destructor*. Вирус легко передается клещом куколкам и взрослым пчёлам [10], введенная в тело хозяина слюна паразита провоцирует репликацию вируса при скрытой инфекции пчёл [18]. В теле инфицированных клещей может содержаться до 1259 нг вирусов или 10 млрд вирионов. Для заражения пчелы требуется 100 вирионов при инокуляции в гемоцель. Накопление возбудителя в популяции варроа происходит к осени. Признаки явной инфекции в семье пчёл летом отмечают при наличии 12300, а осенью – 6800 клещей варроа.

Репликация ABPV происходит в нервной ткани, клетках глоточных желез и жирового тела взрослых пчёл. Он образует однообразные цитоплазматические ацидофильные включения в клетках слизистой оболочки средней кишки [2, 3, 8].

Помимо медоносных пчёл, возбудитель обнаружен у шмелей, у которых отмечают дрожание тела, насекомые покидают расплод и погибают [2, 3]. Вирусные частицы острого паралича обнаружены в обножках пыльцы [3].

Он легко передается здоровым насекомым самками клеща *Varroa destructor* [2, 20]. Культивировать ABPV в лабораторных условиях удаётся при парентеральном введении пчёлам вирусосодержащего материала, другие способы заражения менее эф-

фективны [2]. Вирус острого паралича удаётся культивировать на культуре первично-трипсинизированных клеток эмбрионов, а также на личинках и куколках пчёл [3].

ABPV зарегистрирован у медоносных пчёл в ряде стран. Выделенные штаммы из различных мест идентичны [2].

Болезнь протекает латентно или остро. Характер проявления и исход болезни, очевидно, зависят от степени резистентности популяции пчёл в семье. Явная форма поражения отмечается при нарушении условий содержания пчёл, осложнении другими болезнями (варрооз). Заражение внутри семьи происходит при обмене кормом между пчёлами, потреблении перги, смоченной слюной инфицированных насекомых и уложенной в ячейки, а также при укусе клеща *Varroa destructor*, питающегося гемолимфой пчёл. В естественных условиях болезнь может возникнуть в конце зимы, и её часто отмечают в весенне-летний период [2, 3].

В основном поражаются молодые взрослые пчёлы. Они теряют способность к полёту, ползают или подпрыгивают около летка и вблизи улья, иногда скапливаются на прилётной доске [2, 3].

У некоторых пчёл увеличено брюшко, неправильно расположены крылья. Поражённых насекомых чаще наблюдают в утренние часы. В это же время обнаруживают погибших пчёл на дне улья и предлётковой доске. Урон, вызываемый острым параличом в семьях, различен и колеблется от гибели нескольких сотен пчёл до полной гибели пчёл многих ульев и пасек [2, 3].

Болезнь длится от 7–18 дней до 3 мес. В некоторых случаях пчёлы поражённых семей выздоравливают без вмешательства человека, но такие семьи обычно отстают в росте по сравнению со здоровыми. В течение сезона возможны рецидивы заболевания; повторные вспышки болезни протекают более тяжело [2, 3].

Диагностируется острый паралич в реакции иммунодиффузии со специфической сывороткой [2].

Профилактика заболевания складывается из строгого соблюдения правил содер-

жания пчёл, повышения резистентности насекомых. В ряде случаев высокий эффект достигается применением эндонуклеазы [2].

**Хронический паралич пчёл** – вирусное заболевание куколок и взрослых медоносных пчёл, а также доимагинальных форм пчёл-листорезов [2, 3].

Возбудитель хронического паралича пчёл (CBPV) – РНК-геномный вирус эллипсоидной формы размером 20–27×45–70 нм [2, 3, 12]. Вирионы острого и хронического паралича отличаются большой устойчивостью к действию физико-химических факторов [3]. С возбудителем хронического паралича выделен вирус-сателлит диаметром 17 нм, который определяет степень вирулентности CBPV [2, 3]. Часто в организме пчёл одновременно присутствуют CBPV и ABPV, но при 30 °С возбудитель хронического паралича подавляется ABPV, а при 35°С отмечается обратная зависимость [2, 3, 12].

Вирионы хронического паралича культивируются в культуре клеток медоносной пчелы [2, 3].

Экспериментальное заражение пчёл возможно при инокуляции вирусосодержащего материала в тело пчёл, менее эффективно скармливание и опрыскивание. Насекомых можно также инфицировать при переливании гемолимфы от больных пчёл к здоровым и топикальным нанесением материала на поверхность тела пчёл после удаления волосков [2].

Вирус размножается в цитоплазме клеток нервной ткани, тонкой кишки в месте впадения мальпигиевых сосудов, в мандибулярных и гипофарингиальных железах взрослых пчёл. В поражённых клетках образуются скопления полиморфных частиц. Цитоплазматические включения в виде базофильной грануляции в клетках тонкой кишки получили название телец Морисона [2, 3, 12].

Заболевание пчёл хроническим параличом распространено повсеместно, зарегистрировано во многих областях России, Украины, Казахстана и других республиках бывшего СССР [2, 3]. Штаммы вирусов из

различных мест серологически идентичны [2].

Хронический паралич может регистрироваться как в отдельных, так и во всех семьях пчёл пасеки, а также на нескольких пасеках. Гибель пчёл от хронического паралича наблюдается в любое время года. Однако вспышки острого течения болезни чаще регистрируются летом. Возникновению таких вспышек способствуют резкая смена холодной и дождливой погоды на жаркую и недостаток перги в семьях пчёл [2, 3, 12].

Внутри семьи вирус передается от больных пчёл к здоровым при кормовых контактах через слюну. Распространению возбудителя между семьями пасеки способствуют перелёты пчёл и трутней, перестановка сотов пчеловодом. Внешне здоровые семьи часто могут быть носителями вируса [2].

Инкубационный период в среднем составляет от 4 до 10 дней [2, 3, 12].

У большинства заболевших пчёл наблюдают возбуждение, прерывистое дрожание крыльев, насекомые скучиваются у стенки или внизу улья, плохо потребляют корм, теряют способность летать, совершают волчкообразные движения [2, 3, 7, 8, 12, 20]. Здоровые пчёлы часто откусывают волоски с тела больных пчёл, изгоняют их из улья, такие пчёлы скапливаются в большом количестве на предлетковых площадках [2, 3, 12, 20].

Затем наступает паралич отдельных или всех конечностей, и насекомые погибают на 12–20 день после заражения. Характерный признак при данной болезни – появление чёрных, безволосых, блестящих пчёл с уменьшенным брюшком (рисунок 7 [7]), похожих на муравьев [2, 3, 7, 12, 20]. Пчелиные семьи сильно слабеют и плохо развиваются. Однако эти признаки возникают не всегда – часто гибель насекомых происходит внезапно. Развитие признаков заболевания и время гибели насекомых после заражения зависят не только от количества вируса, но и температуры содержания пчёл [2].

У поражённых насекомых отмечается нарушение белкового, жирового и мине-

рального обмена, в гемолимфе увеличивается количество более зрелых гемоцитов при снижении числа молодых форм этих клеток [2, 12].



**Рисунок 7. – Пчёлы, погибшие от вируса хронического паралича пчёл. Фото**

В результате гибели насекомых пчелосемьи сильно слабеют. Продолжительность болезни, степень её выраженности и наносимый отдельным семьям ущерб бывают неодинаковыми. Зачастую после острого течения заболевания хроническим параличом в семьях пчёл развивается нозематоз [2].

Диагноз ставят по обнаружению телец-включений Морисона в протоплазме клеток слизистой оболочки тонкой кишки при окраске гистосрезов или методом иммунофлуоресценции [2, 3, 12], также используют реакцию диффузионной преципитации в агаровом геле со специфической сывороткой или реакцию нейтрализации в культуре тканей или на пчёлах, метод электронной микроскопии [2, 3, 12].

**Филаментовирус** – инфекционное заболевание взрослых особей пчелиной семьи, вызываемое ДНК-содержащим нитевидным вирусом [10].

Вначале это заболевание было установлено и описано как риккетсиоз в Швейцарии, Германии, в Приморском крае России [6].

Clark (1978) впервые показал, что это не риккетсии, а очень крупный нитевидный вирус. Заболевание зарегистрировано во многих странах Европы, Азии, а также в Северной Америке, Австралии, Новой Зеландии. На территории бывшего СССР установлено в различных климатических

зонах. По данным Ю.М. Батуева (1980) выделенные штаммы вируса были серологически идентичны [6].

Вирус ДНК-содержащий, вирионы имеют эллипсоидную или палочковидную форму, размер 70–150 x 330–370 нм, содержат плотно свернутую нить толщиной 30–45 нм и длиной 2860–4500 нм, заключенную в трехслойную оболочку толщиной 10 нм [6].

Вирус также обнаружен в теле клещей варроа и *Acarapis woodi*. Пчелы легче заражаются им в присутствии *Nozema apis* и *Nozema cerana*.

Размножается вирус в жировой ткани и яичниках женских особей пчелиной семьи. Заражение пчел происходит при скармливании вирусосодержащего материала пчелам особенно быстро, если они поражены нозематозом. При заражении болезнь охватывает 50 % пчел. Инфицирование молодых пчел и маток происходит при посадке их в больные семьи. Сформированные вирионы (вирусные частицы) обнаруживаются в нервной ткани, глоточных, восковыделительных и ядовитых железах и средней кишке, а также мёде, полученном от инфицированных пчелосемей. В конечной стадии болезни вирус в большом количестве присутствует в гемолимфе, которая из-за болезни приобретает молочно-белый цвет.

Болезнь чаще регистрируется в конце зимы и весной, а летом и осенью протекает в скрытой форме. Пик заболевания приходится на май–июнь, но вирус может вызывать гибель пчел и в зимний период. Внешние признаки неспецифичны и характеризуются большим количеством подмора, гибелью маток и целых семей в период зимовки. Больные филаментовирусом пчелиные семьи плохо зимуют. Даже при низкой температуре окружающей среды больные пчелы стремятся выползти наружу, при том что пчелы из здоровых семей улья не покидают. В поражённых семьях весной облёт насекомых бывает недружный, около летка много медленно ползающих или неподвижных пчел, брюшко их увеличено.

После заражения на 3–4 день взрос-

лые пчелы становятся вялыми, а к 5-му дню в гемолимфе поражённых пчел обнаруживается вирус, гемолимфа приобретает молочно-белый цвет, становясь мутной. Гибель пчел наступает на 8–12 день. У поражённых маток яйцекладка продолжается до 6 суток, после чего они погибают [6].

В больных пчелиных семьях пчеловод обнаруживает загрязнённые испражнениями крайние соторамки и передние стенки ульев. Семьи постепенно слабеют, иногда погибают, у перезимовавших пчел может быть свыше 50 % поражённых особей. По мере замены старых пчел молодыми число больных насекомых сокращается. Во второй половине лета и осенью гибель пчел от вируса не отмечается, хотя, по нашим наблюдениям, на пасеке он сохраняется, поэтому заболевание может проявляться весной на протяжении многих лет.

**Болезнь чёрного маточника** характеризуется почернением стенок запечатанного маточника (рисунок 9 [8]), содержащего мёртвых предкуколок и куколок маток и рабочих пчел [2, 7, 13, 20]. Больные личинки имеют бледно-жёлтый вид и жёсткую мешкоподобную кожу, очень похожую на мешотчатый расплод. Вирус присутствует у взрослых пчел, но без очевидных симптомов [20].



**Рисунок 9. – Вскрытый маточник с поражённой вирусом куколкой. Фото**

Возбудитель сферический, диаметром 30 нм, РНК-геномный вирус семейства

*Dicistroviridae*. Он часто регистрируется совместно с вирусом мешотчатого расплода [2].

Куколки рабочих пчёл после инъекции вируса прекращают своё развитие и погибают при достаточной вирионной нагрузке. При скармливании личинкам, молодым взрослым рабочим пчёлам и трутням вирусосодержащего материала заражение происходит с трудом. При инъекции вируса взрослым насекомым размножения его не происходит. Также отмечено, что вирус накапливается во взрослых пчёлах в диагностических титрах при наличии у них *Nozema apis* и *Nozema cerana* [2].

Стенки поражённых маточников приобретают тёмно-коричневый или чёрный цвет. В ранних стадиях заболевания куколки рабочих пчёл и маток бледно-жёлтого цвета, хитиновый покров уплотнен. Признаки болезни напоминают поражение мешотчатым расплодом. Болезнь возникает часто в безрасплодных и безматочных семьях при постановке весной рамки с яйцами и закладке нескольких маточников. Количество заражённых вирусом взрослых пчёл в семьях нарастает в течение зимы и весны параллельно с поражением нозематозом и резко падает в мае [2].

Диагноз на болезнь чёрного маточника ставят с помощью реакции диффузионной преципитации в агаровом геле при наличии специфической сыворотки [2].

**Профилактика вирусных заболеваний пчёл.** Меры профилактики вирусных заболеваний пчёл носят общий характер и строятся на выполнении комплекса мероприятий. Для повышения устойчивости пчелиных семей к вирусным болезням необходимо:

- содержать только сильные семьи пчёл в соответствии с ГОСТ 20728-75 «Семьи пчелиные», с необходимым количеством мёда и перги;

- разводить на пасеке пчёл, приспособленных к климатическим и медосборным условиям данной местности (*Apis mellifera carnica* и *Apis mellifera carpathica*);

- обеспечивать пчёл постоянным медосбором за счёт конвейера цветущих ме-

доносов, тем самым повышая естественную устойчивость пчёл к заболеваниям;

- проводить отбор пчелиных семей с учётом инстинкта очистки гнезда;

- размещать пасеки на возвышенных, хорошо аэрируемых участках;

- содержать пчелиные семьи в исправных, окрашенных, пронумерованных ульях на ульевых подставках высотой 40–50 см. Для окраски использовать хорошо различаемые пчёлами белый, голубой и жёлтый цвета. Последнее важно не только для ориентира при возвращении пчёл в ульи, но и для исключения их «блуждания» и связанного с ним перезаражения семей;

- расширять и сокращать летки ульев в соответствии с силой семей;

- в ульях, кроме летковых отверстий, не должно быть никаких щелей. Через щели внутрь улья проникают вредители и паразиты, пчёлы-«воровки», а также охлаждается внутриульевого воздух, что приводит к излишней потере пчёлами энергии на поддержание необходимой температуры и влажности в гнезде;

- соблюдать соответствующие гигиенические правила эксплуатации пчелиных семей и культуру производства в целом;

- проводить замену маток в больших семьях на маток, выведенных из семей благополучных по заболеванию;

- при уходе за пчелиными семьями не допускать несвоевременного расширения гнезд и уменьшения их утепления особенно после выставки из зимовника и в периоды возвратных холодов;

- на территории пасеки для пчёл оборудовать естественный или искусственный источник чистой питьевой воды. В соответствии с ветеринарно-санитарными правилами содержания пчёл на пасеке устанавливают две поилки. В одну наливают чистую воду, в другую – слегка подсоленную с содержанием 0,01 % поваренной соли (1 г соли на 10 л воды);

- без дезинфекции не передавать с одной пасеки на другую ульи, пчеловодный инвентарь, спецодежду и другие пасечные предметы. При поступлении на пасеку быв-

ших в употреблении ульев, медогонок, пчеловодного инвентаря и пасечного оборудования, а также тары под мёд их обязательно дезинфицируют;

- не перемещать с неблагополучной пасеки на благополучные пчелиные семьи, матки, продукты пчеловодства, предназначенные для использования на пасеках;

- удалять на перетопку соты, в которых замечен поражённый расплод, посредством постепенного продвижения их к боковым стенкам улья при расширении гнёзд;

- на пасеках проводить ежегодное обновление гнездовых сотов (не менее 1/3 за сезон) за счёт отстройки пчелами вошины;

- соблюдать гигиену кормления пчелиных семей, следить за динамикой поступления и расходования кормов в гнёздах и, при необходимости, своевременно обеспечивать текущие и предстоящие потребности в мёде;

- для избежания ослабления пчелиных семей уровень кормовых запасов в гнёздах должен быть не менее 6–8 кг на семью. Критический запас мёда в пчелиной семье весной составляет 4 кг. В этом случае необходимо срочно провести подкормку;

- не производить отбор пыльцы от больных семей, так как потребность пчёл в белке при любом заболевании возрастает;

- кормить пчёл доброкачественными и полноценными кормами. Перед сборкой гнёзд запасы мёда проверять на наличие пади. Некачественный корм удалять. Кормовые запасы пополнять сахарным сиропом в концентрации 1,5:1;

- на пасеках оборудовать пасечный домик, где должны быть умывальник, таз, ведро с крышкой, аптечка, мыло, 2 полотенца и 2 халата на каждого работника пасеки. Для защиты от насекомых в окна вставляют рамы с мелкой сеткой и встроенными пчелоудалителями. Складские помещения должны быть чистыми и недоступными для пчёл и ос. В них хранят обеззараженный пчеловодный инвентарь с пасечным оборудованием, необходимый запас сахара, воск, в изолированном месте –

- дезинфицирующие средства. Вошину и вытопленный воск хранят в специальных ящиках отдельно;

- на каждой пасеке, независимо от ведомственной принадлежности, включая пасеки пчеловодов-любителей, должен быть утверждённый ветеринарно-санитарный паспорт;

- соблюдать «Ветеринарно-санитарные правила содержания пчёл» (утверждены постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь № 55 от 16 августа 2012 г.) и «Ветеринарно-санитарные правила по проведению ветеринарной дезинфекции» (утверждены и введены в действие постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь № 68 от 4 октября 2007 г.).

Учитывая то, что клещ *Varroa* является основным переносчиком и рассадником подавляющего большинства вирусных инфекций пчёл, усилия пчеловодов должны быть направлены на максимальное снижение численности данного паразита в пчелиных семьях [4]. Для этого пчелиные семьи обрабатывают различными акарицидами согласно инструкциям по их применению [2, 4].

На благополучных пасеках при появлении вирусных заболеваний пчёл на местности рекомендуется сочетать противоварроатозные обработки с профилактическим применением противовирусных препаратов [2, 4].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема вирусных инфекций весьма актуальна, потому что лечебно-профилактических противовирусных препаратов для пчеловодства практически не существует. Отсутствуют и специфические методы диагностики для выявления вирусов пчёл. Изучение симптоматики, по-прежнему остается, пожалуй, единственным методом диагностики заболеваний на пасеке; однако он имеет ряд недостатков: многие вирусные инфекции не проявляют видимых симптомов во все время болезни или имеют схожие признаки, либо наоборот, одна вирус-

ная инфекция проявляется весьма разнообразно (CBPV). При смешанной же инфекции симптомы очень трудно интерпретировать. Данные затруднения в работе вирусологов приводят к несвоевременной диагностике заболеваний и, как следствие, большим потерям в пчеловодствах. Также проблема своевременной диагностики

заключается в том, что в настоящее время ограничено и само понимание биологических механизмов, лежащих в основе вирусных заболеваний медоносных пчёл.

Все это вынуждает исследователей искать новые пути диагностики и борьбы с вирусными инфекциями пчёл.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Диагностика и профилактика вирусных болезней пчел / Ю.С. Аликин [и др.] // Пчеловодство. – 2011. – № 5. – С. 28–30.
2. Болезни и вредители медоносных пчел: справочник / О.Ф. Гробов, А.М. Смирнов, Е.Т. Попов. – М.: Агропромиздат, 1987. – 335 с.
3. Болезни пчёл и современное пчеловодство [Электронный ресурс] // Мир пчеловодства. – Режим доступа: [www.apeworld.ru](http://www.apeworld.ru). – Дата доступа: 02.08.2018.
4. Болезнь деформации крыла [Электронный ресурс] // Пчеловодство // Борьба с болезнями и вредителями. – Режим доступа: <http://beejournal.ru>. – Дата доступа: 2.08.2018.
5. Болезнь деформации крыла [Электронный ресурс] // Пчеловодство. – Режим доступа: <https://vetvo.ru>. – Дата доступа: 2.08.2018.
6. Вирозы пчёл [Электронный ресурс] // Пчеловодство // Борьба с болезнями и вредителями. – Режим доступа: <https://beejournal.ru>. – Дата доступа: 2.08.2018.
7. Вирусные болезни пчёл [Электронный ресурс] // л Хозяин. – Режим доступа: <http://hozain.by/paseka/virusnye-bolezni-pchel>. – Дата доступа: 2.08.2018.
8. Вирусные заболевания пчёл [Электронный ресурс] // Белорусское сельское хозяйство. – Режим доступа: <http://agriculture.by/articles/zhivotnovodstvo/virusnye-zabolevanija-pchel>. – Дата доступа: 2.08.2018.
9. Вирусные заболевания пчёл [Электронный ресурс] / Пасека. – Режим доступа: <http://paseka.on.kg/topic/767-virusnie-zabolevanija-pchel>. – Дата доступа: 2.08.2018.
10. Вирозы пчел / О.Ф. Гробов [и др.] // Пчеловодство. – 2006. – №7. – С. 26–28.
11. Масленникова, В.И. Оценка вирусной и клещевой нагрузки на пчелиные семьи в России в связи с массовой гибелью пчел / В.И. Масленникова [и др.]: материалы XXII Международного конгресса «Апиславия», 9–13 сент. / ЛАБ ПРИНТ. – М., 2018. – С. 67–68.
12. Паралич пчёл [Электронный ресурс] // Пчеловодство. – Режим доступа: [www.pceloved.ru](http://www.pceloved.ru). – Дата доступа: 2.08.2018.
13. Bailey, L. Honey bee pathology (2nd Ed.) / L. Bailey, B.V. Ball // Academic Press; London, UK. – 1991. – 193 p.
14. Bailey, L. Viruses attacking the honey bee / L. Bailey // Advances in virus research. – Vol. 20. – 1976. – P. 271–304.
15. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite Varroa destructor / Ongus [et al.] // Journal of General Virology. – 2004. – Vol. 85. – P. 3747–3755.
16. de Miranda, J.R. Deformed wing virus / J.R. de Miranda, E. Genersch // Journal of Invertebrate Pathology. – 2010. – Vol. 103. – P. 48–61.
17. Epidemiology of the Thai Sacbrood Virus Disease / R. Arunal [et al.] // Madras Agric. J. – 2016. – Vol. 103 (1-3). – P. 51–56.
18. Hung, A.C.F. The role of viruses in bee parasitic mite syndrome / A.C.F. Hung, J.R.H. Shimanuki, D.V. Knox // Am. Bee J. – 1996. – Vol. 136. – P. 731–732.
19. Localization of deformed wing virus (DWW) in the brains of the honeybee, Apis mellifera Linnaeus / K. S. Shah [et al.] // Virology Journal. – 2009. – P. 6–182.
20. Standard methods for virus research in Apis mellifera / de Miranda [et. al.] // Journal of Apicultural Research. – 2013. – Vol. 52, № 4. – 57 p.
21. Yue, C. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honey bees (Apis mellifera) and mites (Varroa destructor) / C. Yue, E. Genersch // Journal of General Virology. – 2005. – Vol. 86. – P. 3419–3424.

УДК 619:615.371:619:579.843.95

Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук  
Мистейко М.М., кандидат ветеринарных наук  
Финогенова Е.Г., кандидат ветеринарных наук  
Стрельчяня И.И., кандидат ветеринарных наук

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

## ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ИСПЫТАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ «РЕСПИВАК» ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ПАСТЕРЕЛЛЁЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

### Резюме

В статье представлены данные профилактической эффективности ассоциированной вакцины для специфической профилактики респираторных инфекций крупного рогатого скота бактериальной этиологии, вызываемых возбудителями *Pasteurella multocida* серовариант А, *Pasteurella multocida* серовариант В и *Mannheimia haemolytica* в производственных условиях.

### Summary

The article presents the data of preventive efficacy of an associated vaccine for specific prevention of respiratory infections of cattle bacterial etiology caused by pathogens *Pasteurella multocida* serovariant A, *Pasteurella multocida* serovariant B and *Mannheimia haemolytica* in production conditions.

Поступила в редакцию 25.10.2018 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Рентабельное развитие животноводства невозможно без решения проблем ветеринарно-санитарного благополучия. В животноводческих предприятиях значительный удельный вес занимают инфекционные заболевания молодняка с преимущественным поражением систем органов пищеварения и дыхания.

В настоящее время в Республике Беларусь зарегистрировано около 90 болезней животных, вызываемых биологическими агентами. Благодаря усилиям ветеринарных специалистов наша страна стала благополучной по целому ряду инфекционных заболеваний или они находятся под контролем (ящур, сибирская язва, бруцеллез, лейкоз и т.д.). В последние годы в Беларуси заметно улучшилась эпизоотическая ситуация по многим опасным вирусным заболеваниям крупного рогатого скота. Интенсификация молочного животноводства сопровождается концентрацией поголовья на ограниченных территориях. Повышение молочной продуктивности коров часто при-

водит к нарушению обмена веществ, что снижает резистентность организма, способствуя развитию иммунодефицитов, повышающих восприимчивость животных к инфекционным болезням.

Респираторные болезни телят являются следствием воздействия стрессов, нарушений условий содержания и кормления, а также первичного инфицирования одним или несколькими вирусами с последующим размножением в респираторном тракте животных патогенных бактерий. По данным многих авторов, спектр микроорганизмов, участвующих в данной патологии, может достигать до 12 вирусов и более 13 бактерий [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

Вакцинация является важным компонентом противоэпизоотических мероприятий и осуществляется во всех странах с развитым молочным животноводством [8, 9], а ее схемы должны разрабатываться конкретно для каждого хозяйства с учетом индивидуальных особенностей стада [10]. Большое значение имеет политика «закрытия» стада, т. е. недопущение ввода

животных из других источников.

**Целью** проводимой работы является изучение в производственных условиях профилактической эффективности ассоциированной вакцины для специфической профилактики респираторных инфекций крупного рогатого скота бактериальной этиологии, вызываемых возбудителями *Pasteurella multocida* серовариант А, *Pasteurella multocida* серовариант В и *Mannheimia haemolytica* в производственных условиях.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение эффективности вакцины «Респивак» против респираторных инфекций бактериальной этиологии телят проводили в ЛРСУП «Можейково» Лидского района Гродненской области.

Безвредность вакцины определяли на основании клинических, гематологических и биохимических исследований.

Профилактическую эффективность вакцины «Респивак», содержащей антигены *Pasteurella multocida* серовариант А, *Pasteurella multocida* серовариант В и *Mannheimia haemolytica* инактивированные формалином и эмульгированные в масляном адьюванте, испытывали на телятах. Были подобраны по принципу аналогов четыре группы телят по 19 животных в каждой, вакцинацию начинали с 5–10-дневного возраста, при комплектовании телят сборным поголовьем, на 2–5-й день или 10–12-й день после завоза на комплекс. Телятам первой опытной группы в целях профилактики респираторных инфекций вводили внутримышечно вакцину против респираторных инфекций бактериальной этиологии телят в дозе 1,0 см<sup>3</sup>, телятам второй группы – в дозе 2,0 см<sup>3</sup>, телятам третьей опытной группы – в дозе 4,0 см<sup>3</sup>. Телятам контрольной группы (19 голов) применяли вакцину против пастереллеза (производство ОАО «БелВитунифарм», РБ) согласно инструкции по применению.

За животными вели наблюдение, регистрируя при этом местную реакцию на введение препарата, прирост живой массы, заболеваемость и гибель.

До введения и на 14, 21 и 60 дни после введения препаратов проводили отбор проб крови от животных из каждой группы с целью определения поствакцинальных титров антител к *Pasteurella multocida* А, *Pasteurella multocida* В и *Mannheimia haemolytica*. Продолжительность опыта составила 90 дней.

Для изучения эффективности воздействия вакцины «Респивак» на коров (тёлок с 15–16-месячного возраста) было сформировано три группы по 12 голов независимо от срока стельности. Животных первой группы иммунизировали в дозе 1,0 см<sup>3</sup>, второй группы – в дозе 2,0 см<sup>3</sup> и третьей группы – в дозе 4,0 см<sup>3</sup>. До введения и на 14, 21 день после введения вакцины проводили отбор проб крови у животных из каждой группы с целью определения поствакцинальных титров антител к *Pasteurella multocida* А, *Pasteurella multocida* В и *Mannheimia haemolytica*.

Расчет экономического эффекта провели на основании «Методики определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий» (Витебск, 2000 г.).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Комплексный анализ данных, полученных при изучении вакцины, позволяет характеризовать ее как безвредную и умеренно реактогенную.

Местного раздражающего и аллергенного действия вакцина «Респивак» не оказывала, так как на месте введения не наблюдалось припухлости, покраснения кожи и развития инфильтратов. Снижения аппетита у вакцинированных телят не отмечалось.

Одним из показателей иммунологической перестройки организма вследствие введения вакцины является наличие антител, обнаруживаемых серологическими реакциями. С этой целью мы провели исследование сыворотки крови подопытных телят в РА. До введения и на 14, 21 и 60 дни после введения провели отбор проб крови у животных из каждой группы с целью определения поствакцинальных титров антител к *Pasteurella multocida* серотипов А

«КМИЭВ-В 198», В «КМИЭВ-В 199» и *Mannheimia haemolytica* «КМИЭВ-В 200» в реакции агглютинации.

Как видно из приведенной таблицы 1, в опытной и в контрольной группе телят защитный титр антител к штаммам вырабатывался на 14 день после вакцинации. Во второй опытной группе телят через 14 дней после вакцинации титр антител был на 54,7 % к «КМИЭВ-В 198» и на 67,4 % к «КМИЭВ-В 199» выше, чем в контрольной группе.

Через 21 день после вакцинации во всех группах титр антител в сыворотки крови животных продолжал увеличиваться,

но в опытных группах он был выше по сравнению с контрольной на 61,6 % к «КМИЭВ-В 198» и на 39,7 % к «КМИЭВ-В 199». В контрольной группе телят титр антител к штамму «КМИЭВ-В 200» оставался на уровне титров до вакцинации. На 60-е сутки после вакцинации в опытной группе телят титр антител оставались на том же уровне в пределах 7,1 %. Разница в величине титра антител у телят контрольной группы к штамму «КМИЭВ-В 200» резко повысился до  $96,68 \pm 43,32$ , что свидетельствовало о циркуляции эпизоотического штамма *Mannheimia haemolytica*.

Таблица 1. – Титр антител к *Pasteurella multocida* серотипов А, В и *Mannheimia haemolytica* в реакции агглютинации у телят

Штамм	Титр антител							
	Опытная группа I				Опытная группа II			
	до вакцинации	через 14 дней	через 21 день	через 60 дней	до вакцинации	через 14 дней	через 21 день	через 60 дней
КМИЭВ-В 198	1,37±0,22	192,11±45,82	328,53±51,17	281,37±52,03	1,16±0,23	219,05±47,50	304,95±51,90	286,42±50,92
КМИЭВ-В 199	1,68±0,23	122,95±32,12	154,95±37,05	128,00±31,72	1,37±0,22	129,68±31,76	171,79±41,83	131,37±31,52
КМИЭВ-В 200	1,47±0,26	75,79±7,82	104,42±7,28	101,05±7,45	1,05±0,24	82,53±7,47	111,16±6,64	107,79±7,01
	Опытная группа III				Контрольная группа			
КМИЭВ-В 198	1,05±0,24	215,68±47,98	286,42±47,26	289,79±45,71	1,16±0,28	141,58±38,38	188,74±46,01	185,37±37,85
КМИЭВ-В 199	1,26±0,23	121,26±24,78	165,05±36,07	144,84±32,77	1,58±0,29	77,47±8,59	122,95±20,07	134,74±20,56
КМИЭВ-В 200	0,95±0,24	89,26±11,63	117,89±5,50	122,95±15,53	1,37±0,31	1,79±0,34	2,32±0,35	96,68±43,32

Таким образом, применение вакцины «Респивак» в дозе 1,0–2,0 и 4,0 см<sup>3</sup>, обеспечивает длительный и напряженный иммунитет к антигенам *Pasteurella multocida* серотипов А, В и *Mannheimia haemolytica*, входящих в состав вакцины, начиная с 14

дня после вакцинации. Целесообразной иммунизирующей дозой у телят является доза 1,0 см<sup>3</sup>.

Изучение эффективности вакцины «Респивак» для коров (тёлок с 15–16-месячного возраста) было сформировано три

группы. Как видно из таблицы 2, антиген *Pasteurella multocida* серотипов А, В и *Mannheimia haemolytica* вызывал стимуля-

цию иммунной системы организма коров, что сопровождалось выработкой специфических антител.

Таблица 2. – Титр антител к *Pasteurella multocida* серотипов А, В и *Mannheimia haemolytica* в реакции агглютинации у коров

Штамм	Титр антител								
	Опытная группа I			Опытная группа II			Опытная группа III		
	до вакцинации	через 14 дней	через 21 день	до вакцинации	через 14 дней	через 21 день	до вакцинации	через 14 дней	через 21 день
КМИЭВ-В 198	1,83±0,30	176,17±59,37	208,00±34,45	2,50±0,36	234,83±51,79	245,33±60,81	2,67±0,28	218,83±55,34	229,50±53,05
КМИЭВ-В 199	2,50±0,26	216,00±55,58	224,00±44,21	2,83±0,30	213,33±52,45	261,33±64,22	2,67±0,28	245,33±40,04	218,67±51,33
КМИЭВ-В 200	2,67±0,28	202,67±35,96	234,67±41,19	2,50±0,44	224,00±42,06	282,67±58,67	2,50±0,36	192,00±36,10	224,00±50,13

Уровень специфических антител в сыворотке крови был разным и зависел от дозы введения вакцины «Респивак». Наиболее низкий уровень антител синтезировался у коров, иммунизированных в дозе 1,0 см<sup>3</sup>. На 14-й день после иммунизации в этой группе титр специфических антител составил 1:176,17±59,37, 1:216,00±55,58 и 1:202,67±35,96 соответственно к *Pasteurella multocida* серотипов А, В и *Mannheimia haemolytica*, затем он незначительно увеличивался и к 21-му дню он был равен 1:208,00±34,45, 1:224,00±44,21 и 1:234,67±41,19. В опытных группах II и III, где применялась иммунизирующая доза вакцины 2,0 см<sup>3</sup> и 4,0 см<sup>3</sup>, титр антител незначительно отличался. Так, на 14-й день после введения вакцины титр антител у коров II группы составил 1:234,83±51,79, 1:213,33±52,45 и 1:224,00±42,06 соответственно к антигену *Pasteurella multocida* серотипов А, В и *Mannheimia haemolytica*.

Затем к 21-му дню он возрос до 1:245,33±60,81, 1:261,33±64,22 и 1:282,67±58,67.

Полученные результаты исследований позволили заключить, что целесообразной иммунизирующей дозой для коров является доза 2,0 см<sup>3</sup>.

Использование биохимических и гематологических методов исследования позволяет выявить нарушения, возникающие в различных органах и системах организма еще до их клинического проявления, а значит, определить статус групп животных в опыте. Гематологические и биохимические исследования проводили у телят.

Результаты испытаний вакцины показали, что вакцина является слабо реактогенным препаратом, так как после вакцинации у животных опытной и контрольной групп гематологические показатели были в пределах физиологической нормы.

Количество гемоглобина до вакцинации в опытной группе составило  $60,4 \pm 11,55$  г/л, а в контрольной группе –  $61,4 \pm 7,02$  г/л. На 21 день после иммунизации его содержание у телят опытной группы возросло до  $136,57 \pm 1,95$  г/л, а в контрольной – до  $126,71 \pm 3,84$  г/л, но эти изменения были статистически недостоверны.

Количество эритроцитов в начале опыта у телят обеих групп было примерно одинаковым,  $2,76 \pm 0,53 \times 10^{12}$ /л.

В дальнейшем их содержание существенно не изменялось и колебалось в пределах от  $5,43 \pm 0,85 \times 10^{12}$ /л до  $7,33 \pm 0,18 \times 10^{12}$ /л.

Таким образом, количество эритроцитов и гемоглобина в крови телят, иммунизированных предложенной нами вакциной, достоверно не отличались от таковых показателей крови контрольных животных. Число лейкоцитов в крови телят до вакцинации было в пределах  $17,9 \pm 4,35 - 17,3 \pm 3,2 \times 10^9$ /л. На 21-й день после иммунизации мы наблюдали повышение их количества у телят опытной группы до  $29,9 \pm 3,01 \times 10^9$ /л. В дальнейшем количество лейкоцитов в этой группе немного снизилось и на 60-й день исследований составило  $21,6 \pm 2,39 \times 10^9$ /л, а в контрольной группе равнялось  $24,9 \pm 1,60 \times 10^9$ /л.

Однако достоверных изменений в содержании глобулиновой фракции мы не выявили. Более того, на 21-й день после введения отмечено некоторое ее снижение до  $24,2 \pm 3,91$  г/л против  $30,3 \pm 3,81$  г/л в контрольной группе.

При биохимическом исследовании сыворотки крови телят мы не выявили достоверных изменений в содержании глюкозы: ее уровень во все сроки исследований колебался в пределах  $4,64 \pm 1,02 - 6,39 \pm 0,67$  мм/л.

Количество билирубина у телят подопытных групп до вакцинации колебалось в пределах  $15,58 \pm 2,72 - 20,97 \pm 1,17$  мкм/л. Начиная с 21-го дня после введения вакцины, его количество начало снижаться, но это уменьшение было более выраженным у телят контрольной группы.

Содержание холестерина также было в пределах нормы, лишь на 14-й день после введения вакцины у телят опытной группы возросло до  $2,87 \pm 0,54$  мм/л, в то время как у контрольных животных этот показатель был равен  $2,08 \pm 0,24$  мм/л.

При исследовании ферментов (АсАТ, АлАТ), характеризующих функциональное состояние печени, мы установили, что до вакцинации количество аланинаминотрансферазы составило  $41,25 \pm 3,86 - 49,09 \pm 4,27$  ед/л. При исследовании аспартатаминотрансферазы выявлено ее уменьшение после введения вакцины. Если в контрольной группе животных ее содержание составляло  $44,68 \pm 4,05$  ед./л, то у опытных телят активность снизилась до  $25,06 \pm 3,41$  ед./л.

Гамма-глутаматтрансфераза после вакцинации телят наоборот имела тенденцию к росту, ее активность возросла до  $49,0 \pm 2,03$  ед./л, то на 21-й день этот показатель увеличился до  $55,0 \pm 1,6$  ед./л ( $P < 0,05$ ). У телят контрольной группы содержание гамма-глутаматтрансферазы составило  $39,0 \pm 1,95$  ед./л.

Иммунизация телят не оказывала существенного влияния на содержание мочевины, креатинина, ЛДГ.

При исследовании кальция, фосфора, магния, хлоридов и железа, характеризующих минеральный обмен веществ, мы не выявили достоверных изменений между показателями крови опытных и контрольной групп телят. Все они были аналогичны данным животных контрольной группы и не выходили за пределы физиологической нормы. Таким образом, представленные данные показывают, что вакцина «Респи-вак» не оказывала негативного влияния на биохимические показатели и их соотношения, результаты исследований позволяют охарактеризовать ее как безвредную и слабо реактогенную.

О профилактической эффективности вакцины судили по результатам сохранности опытных и контрольных животных, приросту их живой массы.

Результаты производственных испытаний вакцины представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Результаты производственных испытаний на телятах

Показатели	Единицы измерения	Опытная группа I	Опытная группа II	Опытная группа III	Контрольная группа
Количество животных в группах	голов	19	19	19	19
Продолжительность опыта	дней	90	90	90	90
Заболело с признаками респираторных инфекций бактериальной этиологии	голов	1	2	0	4
Пало с признаками респираторных инфекций	голов	0	0	0	0
Вынужденно убито с признаками респираторных инфекций	голов	0	0	1	2
Среднесуточный прирост живой массы 1 гол.	г	483,94	476,52	502,57	452,36
Профилактическая эффективность	%	94,7	89,5	94,7	68,4

Из данных, представленных в таблице, видно: вакцина «Респивак» против респираторных инфекций бактериальной этиологии телят, разработанная РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», является безвредным иммуногенным биопрепаратом, который позволяет предотвратить заболеваемость и гибель телят от *Pasteurella multocida* А, *Pasteurella multocida* В и *Mannheimia haemolytica*. Профилактическая эффективность составила 94,7 %.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Вакцина «Респивак» в дозе 1,0 см<sup>3</sup> для телят и в дозе 2,0 см<sup>3</sup> для коров обеспечивает длительный и напряженный иммунитет к антигенам *Pasteurella multocida* серотипов А, В и *Mannheimia haemolytica*, входящих в состав вакцины, начиная с 14 дня после вакцинации.

2. Вакцина «Респивак» является безвредным иммуногенным биопрепаратом, профилактическая эффективность которого составила 94,7 %.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Крюков, Н.Н. Микробный пейзаж и иммунологическая реактивность у телят, выращиваемых в условиях промышленной технологии / Н.Н. Крюков, А.Т. Семенюта, Э.А. Шегидевич // Тр. ВИЭВ. М., 1984. – Т.60. – С.15–23.
2. Мищенко, В.А. Особенности респираторных инфекций телят / В.А. Мищенко, А.А. Гусев [и др.]. // Ветеринария. – 2000. – № 9. – С.5–6.
3. Басова, Н.Ю. Респираторные болезни молодняка крупного рогатого скота инфекционной этиологии в условиях Северного Кавказа: автореф. дисс.... д-ра вет. наук / Н.Ю. Басова Краснодар. – 2002. – 42 с.
4. Юров, К.П. Профилактика инфекционных болезней телят / К.П. Юров, А.Ф. Шуляк // Болезни сельскохозяйственных животных вирусной и других этиологий и меры борьбы с ними: материалы науч.-прак. конф. – Иркутск, 2001. – С. 9–10.
5. Будулов, Н.Р. Респираторные болезни крупного рогатого скота в Дагестане / Н.Р. Будулов // автореф. дисс.... д-ра вет. наук. – Краснодар. – 2009. – 43 с.
6. Bryson, D.G. The calf pneumonia complex current thoughts on aetiology/ D.G. Bryson// Cattle Practice 2000. – Vol.8. – P.103–107.
7. Brogden, K.A. Polymicrobial Diseases / K.A. Brogden, J.M. Guthmiller // 2002. – ASM Press. – 328 p.
8. Radostits, O.M. The control of infectious diseases of the respiratory and digestive tracts of cattle / O.M. Radostits // Can. Vet. J. – 1991. – Vol. 32. – P. 311–314.
9. Van Oirschot, J.T. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea / J.T. Van Oirschot, C. Brusehke, P. Van Rijn // Vet Micr. – 1999. – Vol. 64. – P.169–183.
10. Kelling, C.L. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines / C.L. Kelling // Vet Clin Food Anim. – 2004. – Vol. 20. – P. 115–129.

УДК 619:616-078:637.12.05-619:616.5-002.525

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор<sup>1</sup>  
 Власенко В.В., доктор биологических наук, профессор<sup>2</sup>  
 Лемиш А.П., кандидат ветеринарных наук<sup>3</sup>  
 Красникова Е.Л., научный сотрудник<sup>1</sup>  
 Высоцкий А.Э., кандидат ветеринарных наук, доцент<sup>1</sup>  
 Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент<sup>1</sup>  
 Букова Н.К., доктор ветеринарных наук, профессор<sup>4</sup>

<sup>1</sup> РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», г. Минск

<sup>2</sup> Винницкий национальный аграрный университет, г. Винница

<sup>3</sup> ЗАО «Консул», г. Брест

<sup>4</sup> ФГБУ ВГНКИ, г. Москва

## МИКОБАКТЕРИИ ТУБЕРКУЛЕЗА С ДЕФЕКТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКОЙ ОБНАРУЖЕНЫ В МОЗГЕ КОЗ СО СПОНГИМОРФНЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ

### Резюме

У коз, павших с признаками поражения центральной нервной системы в мозге обнаружены губкообразные изменения. В пробах мозга обнаружены ДНК и микобактерии туберкулеза с дефектной клеточной стенкой, в клетках мозга и в межклеточном пространстве отмечено накопление микобактериальных антигенов.

Несмотря на то, что пробы мозга, находились в 10 %-ном формалине 1 месяц, 3 года и 5 лет, во всех случаях были выделены микобактерии туберкулеза с дефектной клеточной стенкой. Их жизнеспособность была сопоставима с инфекционностью прионов.

Изоляты микобактерий туберкулеза с дефектной клеточной стенкой из мозга не отличались по морфологии и полипептидному составу от изолятов из туберкулина, FLK-BLV, лимфатических узлов коров, больных туберкулезом. Это указывает на высокую вероятность того, что микобактериальная инфекция в зависимости от инфицирующей дозы, особенностей штамма и генома хозяина, а также состояния иммунной системы может вызывать активный туберкулез, онкогенное действие, поражения мозга, сердечно-сосудистой системы.

### Summary

Spongiform changes are found in a brain of the goats who have fallen with signs of damage of the central nervous system. In samples of a brain DNA and cell wall deficient mycobacteria are found, in cells of a brain and in intercellular space accumulation of mycobacterial antigens is noted.

In spite of the fact that samples of a brain, were in 10% formalin 1 months, 3 and 5 years, in all cases cell wall deficient mycobacteria have been isolated. Their viability was comparable to infectivity of prions.

Isolates cell wall deficient mycobacteria from a brain didn't differ on morphology and polypeptide profile from isolates from a tuberculin, FLK-BLV, lymph nodes of cows, suffering from tuberculosis. It indicates high probability that the mycobacterial infection depending on the infecting dose, features of a strain and owner's genome and also condition of immune system, can cause active tuberculosis, oncogene action, damages of a brain, cardiovascular system.

Поступила в редакцию 16.08.2018 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Целенаправленная борьба с туберкулезом остановила к середине XX века пандемию болезни, существенно снизила смертность и заболеваемость, но не привела к исчезновению возбудителей болезни [24]. Микобактерии туберкулеза (МБТ) отличаются резистентностью к неблагоприят-

ным факторам, обладают совершенным механизмом инфицирования, быстро формируют лекарственную устойчивость. При попадании в организм небольших доз МБТ со сниженной вирулентностью их выживание обеспечивается трансформацией в формы с дефектной клеточной стенкой (cell wall deficient – CWD), приспособлен-

ные к длительной персистенции [1, 13, 16, 20]. При этом резко меняется морфология и свойства МБТ [1, 2, 3, 4, 8], вплоть до появления элементарных телец диаметром около 0,22 мкм, проходящих через стерилизующие фильтры [20]. Вероятно, МБТ могут образовывать и более мелкие формы. Удавалось получать рост CWD МБТ из автоклавированной культуральной жидкости *M. bovis* последовательно пропущенной через фильтр Durapore 0,22 мкм и полисульфоновую мембрану Biomax 300K [17]. Способность образовывать спороподобные формы [14], выдерживающие даже автоклавирование, делает МБТ фактически «бесмертными» [17].

Необычные свойства МБТ и их CWD форм дали основание рассматривать их как этиологических агентов заболеваний, которые традиционно не связывают с туберкулезной инфекцией. В опухолях обнаружены CWD (L-) формы МБТ и микобактериальная ДНК, в том числе интегрированная в геном хозяина [13, 16, 21, 22, 25]. CWD МБТ выделены из культуральной жидкости клеток почки эмбриона овцы, хронически инфицированной вирусом бычьего лейкоза (FLK-BLV). Вероятно, то, что считается BLV, может быть вирусоподобными формами CWD МБТ [4]. Получены данные о роли CWD МБТ в развитии саркоидоза, сердечно-сосудистой патологии, сахарного диабета [5, 6, 7, 10, 18]. Известно, что МБТ могут преодолевать гемато-энцефалический барьер [16]. Предполагается, что они могут вызывать симптомы спонгиозной энцефалопатии у крупного рогатого скота [9] и, возможно, быть причиной болезни Альцгеймера [11].

**Цель работы** – исследование связи туберкулезной инфекции и развития поражения мозга с признаками спонгиозных изменений.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали консервированные 10% формалином фрагменты головного мозга 2 коз, павших (с интервалом в 2 года) с признаками поражения центральной нервной системы (ЦНС). Бешенство и листериоз бы-

ли исключены.

**Микроскопия.** Гистологические срезы мозга приготовлены по общепринятой методике и окрашены гематоксилин-эозином.

Мазки-отпечатки проб мозга фиксировали 2 ч при 65 °С, окрашивали по Цилю-Нильсену и дифференцирующим иммунопероксидазным (ДИП) методом [30], включавшим:

- подавление эндогенной пероксидазы 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и охлажденным метанолом – 20 мин;
- окраска карболовым фуксином Kinuon – 5 мин;
- обесцвечивание солянокислым спиртом – 70 сек;
- окраска 0,3 %-ным метиленовым синим – 2 мин;
- нанесение конъюгата пероксидазы с аффинно-очищенными антителами к *M. bovis* (в ЗФР с 0,02 % твина 20) – 1,5 ч;
- нанесение субстратного раствора (10 мг 3,3'-диаминобензидина «Fluka» в 2 мл ДМСО, 10 мл деионизованной воды, 10 мкл 33 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) – 15 мин.

На каждом этапе мазки промывали водой с 0,02 % твина 20.

При ДИП окраске кислотоустойчивые (КУ) МБТ окрашивались в красный, не кислотоустойчивые (НКУ) CWD МБТ и антигены МБТ в коричневый, немикобактериальная микрофлора и клетки тканей в синий цвет [32].

**Микроскопию** проводили на микроскопе «Olympus 51BX».

**Посев проб мозга.** Первый посев проб мозга проведен после 1-месячной консервации проб в 10 % формалине. Повторный посев проб мозга, находившихся в 10 % формалине, проведен через 5 лет (мозг № 1) и через 3 года (мозг № 2).

Для посева использовали стимулятор роста ВКГ (патент Украины №43467) стимулятор роста и питательную среду Mus Cel DW [11, 13, 21].

Пробы мозга (3–4 г) извлекали из формалина, помещали в стерильные емкости со 100 мл стерильной воды. Через 12 ч их гомогенизировали в 10 мл стимулятора

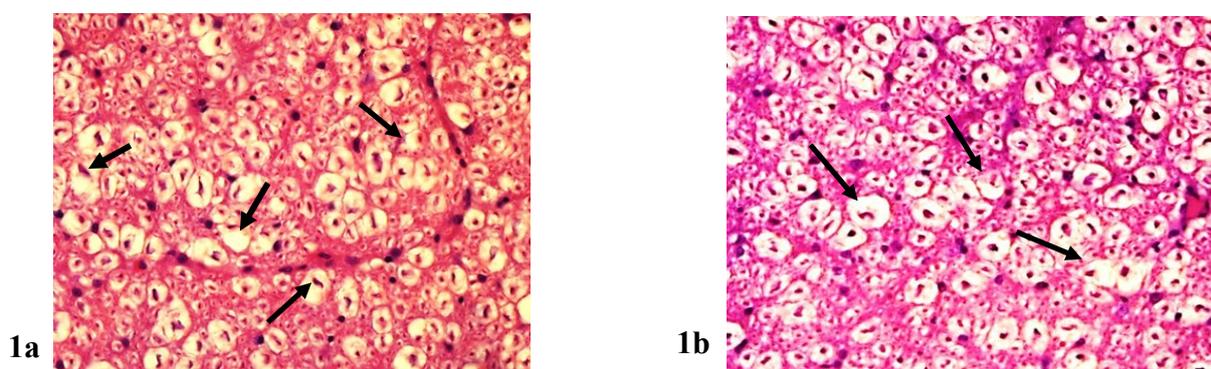
роста. Гомогенаты инкубировали 48 ч при температуре 37 °С и высевали по 300 мкл на пробирки со средой МусСел DW. Посевы инкубировали при температуре 37 °С 10 дней.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** Гомогенаты мозга и суспензии культур в лизирующем буфере прогревали 5 мин при температуре 95 °С. ДНК из лизатов выделяли на колонках с сорбентом (ИБОХ НАН РБ). Амплификацию проводили по стандартному протоколу с праймерами 16s RNA и MPB 70 («Праймтех») на C1000TM ThermoCycler (BioRad), электрофорез амплификатов – в 2 % агарозе (Sigma). Результаты учитывали на Molecular Imager GelDoc TM XR+ (BioRad). Для исследования **полипептидного профиля** бактериальную массу изолятов 3-кратно отмывали 0,5%-ным раствором фенола при 14 тыс. об/мин, прогревали в 2х буфере для нанесения 5 мин при температуре 99 °С и подвергали электрофорезу в 15 % ПААГ-ДСН (Laemmli, 1970).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В гистосрезках мозга на уровне верхнего отдела и варолиевого моста обнаружены стазы и тромбозы сосудов, расширение просвета сосудов, периваскулярная инфильтрация, клеточные муфты из лимфоидных клеток и единичных гистиоцитов, пролиферация клеток глии и губчатость мозга (рисунок 1).

При микроскопии отпечатков мозга обнаружены частично кислотоустойчивые (красного цвета) шаровидные формы (рисунок 2а, 2d), которые в мозге № 1 встречались в больших количествах, а в мозге № 2 – реже. В одном случае такая шаровидная форма была связана с частично кислотоустойчивой (КУ) палочкой, которая могла быть отнесена к микобактериям (рисунок 2b). Такая связь и частичная КУ шаровидных форм позволило предположить, что это сферопласты микобактерий, тем более, что при ДИП окраске, они приобретали специфический коричневый цвет (рисунок 2с).



**Рисунок 1. – Гистологические срезы мозга коз. 1а – мозг № 1, 1b – мозг № 2. Заметна губчатость мозга (стрелки). Окраска гематоксилин-эозин, 10×20**

При ДИП окраске в отпечатках обоих проб мозга, помимо шаровидных форм, были выявлены красно-коричневые (рисунок 2с) и коричневые палочки (рисунок 3), которые чаще встречались в мозге № 2 (рисунки 3, 4) и имели почти идентичную морфологию (рисунок 3).

В обоих образцах мозга были выявлены структуры, с которыми связывались антитела к *M. bovis*: тяжи (4а), клетки с коричневыми включениями в цитоплазму (4а–4е), часто окруженные коричневой «сетью» (4е), обширные сетевидные обра-

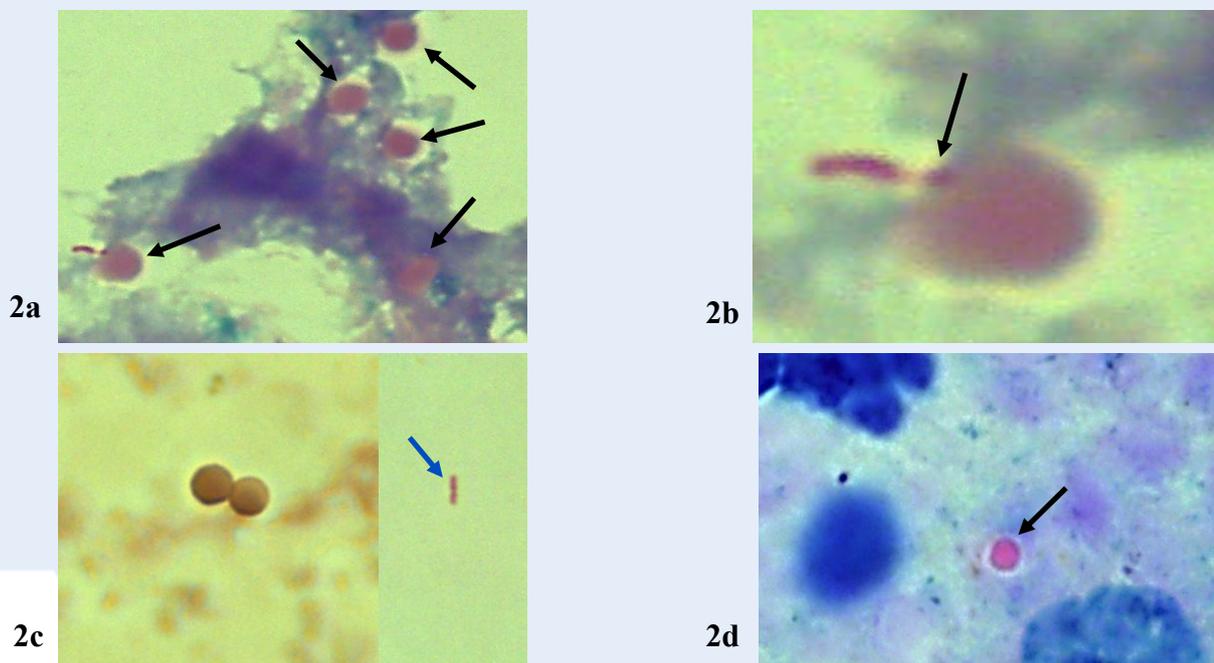
зования (рисунок 4b). Это указывает на то, что CWD МБТ персистировали в клетках мозга и в межклеточном пространстве с накоплением антигенов МБТ и, возможно, с образованием сетеподобных CWD МБТ.

Исследование гомогенатов мозга в ПЦР показало присутствие в них ДНК МБТ. Обе пробы дали реакцию с праймерами 16 s RNA и с MPB 70 *tuberculosis-bovis complex* (рисунок 5).

После отмывки фрагментов мозга стерильной водой, гомогенизации, 48 ч инкубации гомогенатов в стимуляторе роста

(37 °С) посева на среду МусСел DW через 3–5 суток был получен рост мелких стекловидных колоний. В мазках роста мозга № 1 были обнаружены частично КУ (красно-коричневые) и НКУ (коричневые) палочки

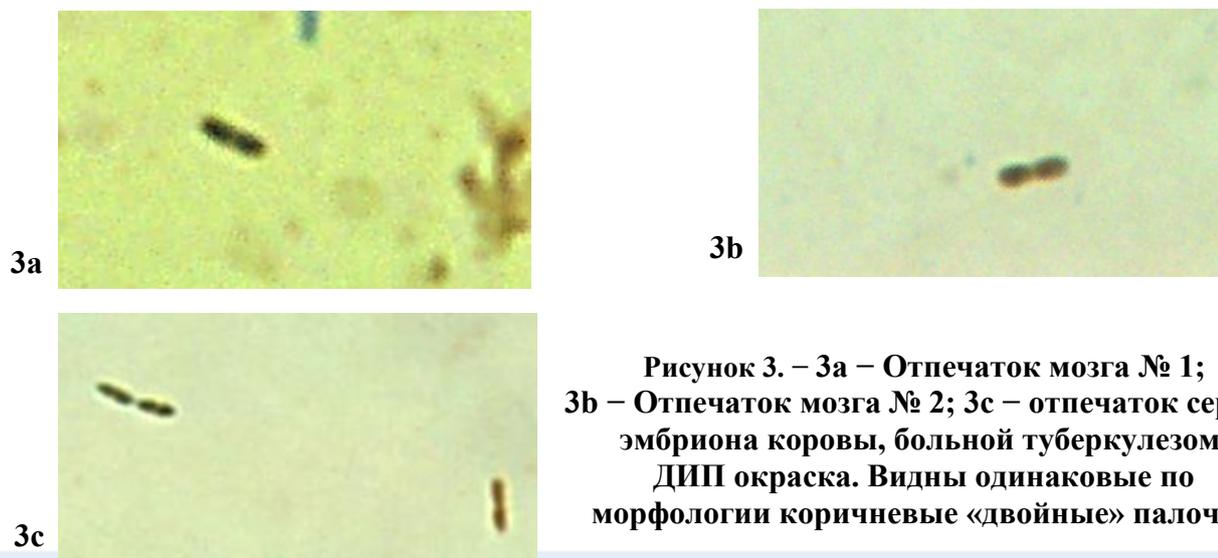
(рисунок 5а), иногда встречались типичные КУ палочки (рисунок 5b). В процессе роста была заметна трансформация частично КУ палочек в НКУ формы (рисунок 6).



**Рисунок 2.** – 2а – отпечаток мозга № 1, видны красные (КУ) шаровидные формы (стрелки); 2b – увеличенный фрагмент рисунка 2а. Красная КУ палочка, связанная с шаровидной формой, Ц-Н, 10×100; 2с – отпечаток мозга № 1, ДИП окраска.

Видны коричневые шаровидные формы и красная палочка, 10×100;

2d – Отпечаток мозга № 2. Видна красная (КУ) шаровидная форма, Ц-Н, 10×100



**Рисунок 3.** – 3а – Отпечаток мозга № 1; 3b – Отпечаток мозга № 2; 3с – отпечаток сердца эмбриона коровы, больной туберкулезом.

ДИП окраска. Видны одинаковые по морфологии коричневые «двойные» палочки

В мазках роста мозга № 2 преобладали НКУ палочки. После нескольких пересевов изоляты из мозга № 1 и № 2 были представлены одинаковыми формами: некистозустойчивыми длинными биполярными палочками, толстыми «пустыми» палочка-

ми, короткими биполярными палочками и веретенообразными формами (рисунок 7). Клетки с такой же морфологией были обнаружены в мазках экспериментально полученных CWD *M. bovis Vallee* (7с–7d).

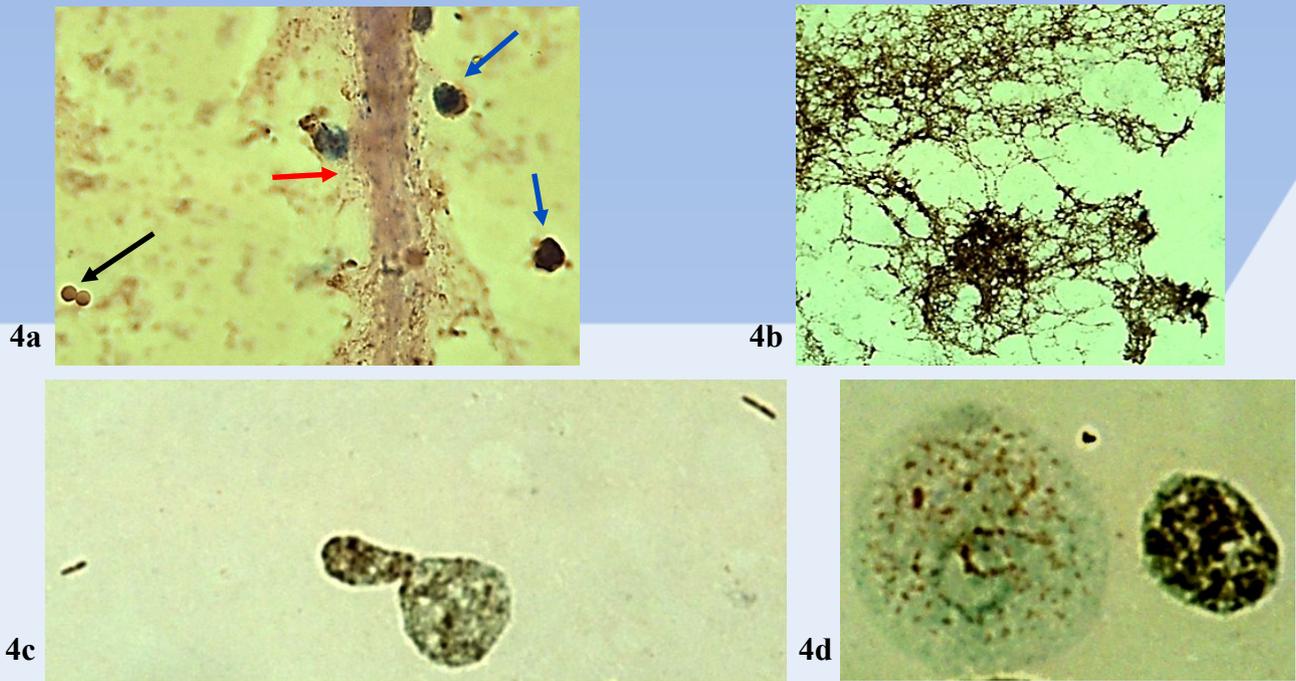


Рисунок 4. – 4а отпечаток мозга № 1, виден коричневый тяж (красная стрелка), коричневые сферопласты (черная стрелка), клетки с темно-коричневой цитоплазмой (синие стрелки); 4b – отпечаток мозга № 1, коричневая сетевидная структура; 4c – отпечаток мозга № 2, видны клетки с коричневыми включениями в цитоплазму и коричневые палочки; 4d – отпечаток мозга № 2, видны клетки с коричневыми включениями; 4e – отпечаток мозга № 2, видны клетки, окруженные коричневой сетевидной структурой. ДИП окраска, 10×100

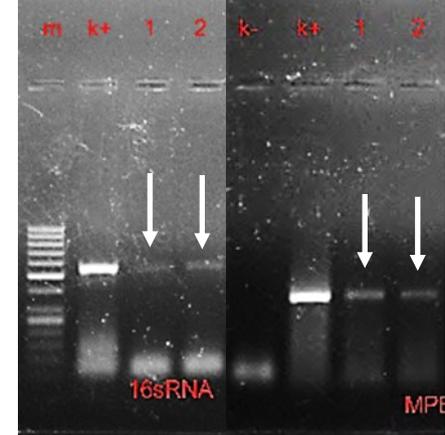
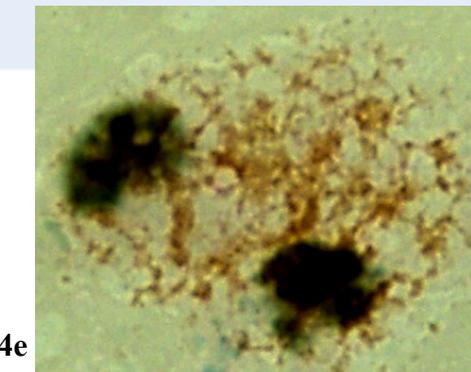


Рисунок 5. – Электрофорез амплификатов ДНК из гомогенатов проб мозга № 1 (1) и № 2 (2), k – отрицательный контроль, k+ – положительный контроль

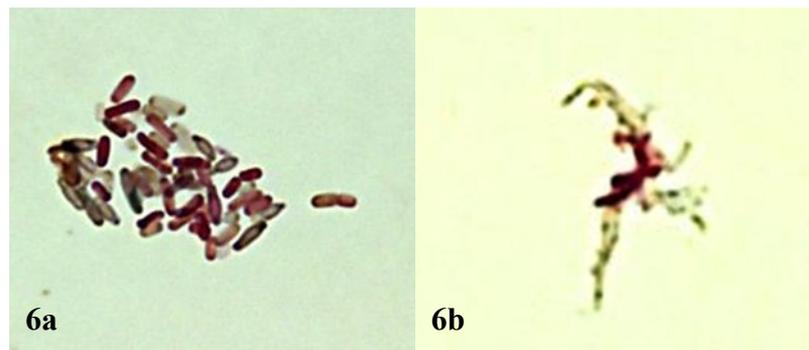
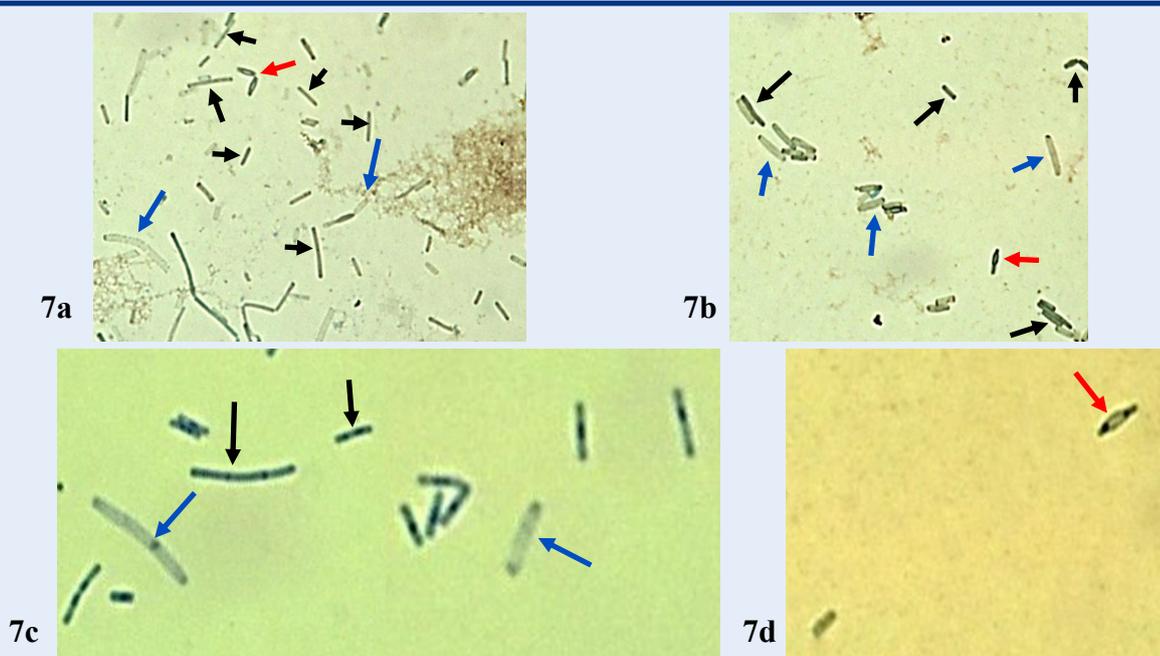
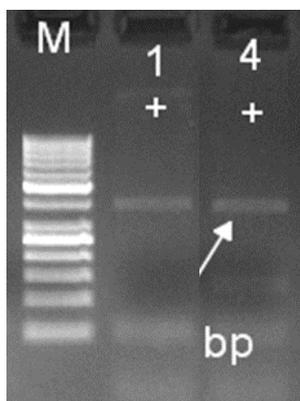


Рисунок 6. – Первичный рост посева мозга № 1 на среде MycCel DW.  
6а – видны частично кислотоустойчивые (красно-коричневые) и некислотоустойчивые (коричневые) палочки.  
6б – видно несколько красных КУ палочек, окруженных коричневыми НКУ палочками. ДИП окраска, 10×100



**Рисунок 7. – 7а – рост посева мозга № 2; 7б – рост посева мозга № 1. Длинные и короткие биполярные, иногда с зернами, палочки (черные стрелки), толстые «пустые» палочки (голубые стрелки), веретенообразные формы (красные стрелки); 7с–7д – CWD *M.bovis* Vallee. Длинные и короткие биполярные, иногда с зернами палочки (черные стрелки), толстые «пустые» палочки (голубые стрелки), веретенообразные формы (красные стрелки)**

Принадлежность изолятов из мозга № 1 и № 2 к МБТ подтверждена в ПЦР (рисунок 8).



**Рисунок 8. – Электрофорез амплификатов ДНК изолятов с праймерами MPT 70 tuberculosis-bovis complex: 1 – изолят из мозга № 1; 4 – изолят из мозга № 2**

Изоляты из мозга были полиморфными, но встречавшиеся формы были такими же, как и в CWD МБТ из других источников. В мазках могли одновременно встречаться длинные и короткие биполярные,

относительно тонкие зернистые палочки, толстые «пустые» палочки, веретенообразные формы, коккоиды (рисунок 7). Такие же формы были обнаружены и у CWD МБТ из эталона ППД туберкулина [17], антиген вируса лейкоза (АГВЛ) [4], а также от больных туберкулезом людей и коров [2]. В частности, на рисунке 9 представлена обнаруженная в изолятах из мозга, туберкулинов, АГВЛ и крови человека, больного туберкулезом, весьма характерная форма из двух связанных между собой палочек с разной степенью КУ, представляющая, вероятно, или процесс деления, или образование разных форм CWD МБТ.

Оба изолята из мозга имели одинаковые полипептидные профили (рисунок 10.1–10.2), которые были практически идентичны профилю изолята из эталона ППД туберкулина *M. bovis* (рисунок 10.3). Лишь в незначительных деталях они отличались от профиля изолятов из АГВЛ (рисунок 10.4–10.5) и CWD *M. bovis* BCG (рисунок 10.6).



9a

9b

9c



9d

Рисунок 9. 9a – изолят из мозга № 1 (частично КУ палочка красно-коричневого цвета делится с образованием НКУ палочки коричневого цвета); 9b – клетки с подобной морфологией обнаружены в изолятах из эталона ППД; 9c – АГВЛ; 9d – изолят из крови человека, больного туберкулезом; 9b – образование палочковидной биполярной формы веретенообразной клеткой (красная стрелка)

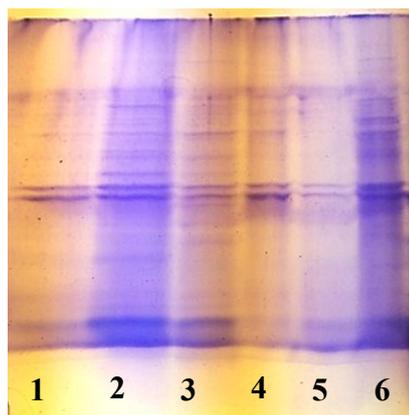
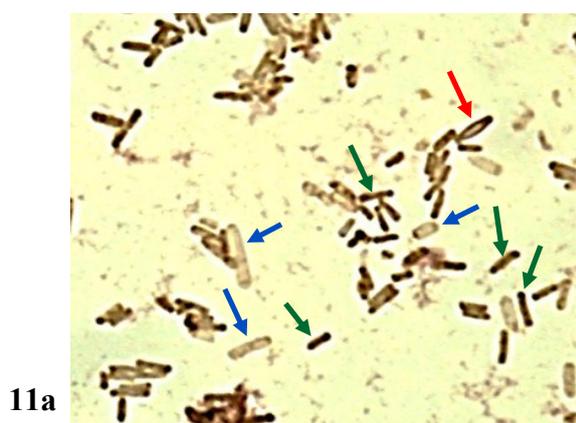


Рисунок 10. – Электрофорез ПААГ-ДСН 15 % лизатов:

- 1 – изолят из мозга № 1;
- 2 – изолят из мозга № 2;
- 3 – изолят из эталона ППД туберкулина;
- 4 – изолят из АГВЛ с. 30;
- 5 – изолят из АГВЛ с.27;
- 6 – CWD *M. bovis* BCG



11a

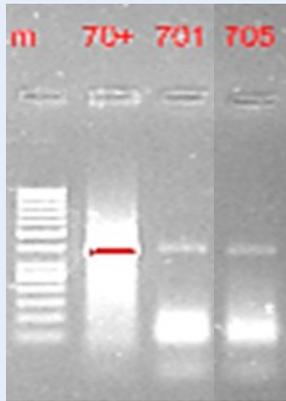


11b

Рисунок 11. – 11a – рост посева мозга № 1, 11b – рост посева мозга № 2. Длинные и короткие биполярные, иногда с зернами, палочки (зеленые стрелки), толстые «пустые» палочки (голубые стрелки), веретенообразные формы (красные стрелки). МусСел DW, ДИП окраска 10×100

Особый интерес представили результаты посева проб мозга после 5 и 3-летнего нахождения в 10 % формалине. Через 2 дня после посева обеих проб в стимуляторе роста стало заметно помутнение поверхности питательной среды, но видимых колоний не обнаружено. После «слепого» пересева

обе пробы дали рост мелких, сливающихся колоний. В мазках были обнаружены полиморфные палочковидные формы (рисунок 11), такие же, как были выделены и при первом посеве (рисунок 6, 7). В ПЦР с праймерами MPV 70 было подтверждено, что изоляты относятся к МБТ (рисунок 12).



**Рисунок 12. – Электрофорез амплификатов ДНК изолятов из проб мозга 5 и 3 года, находившихся в 10 %-ном формалине с праймерами MPV 70 *tuberculosis-ovis* complex; m – маркер молекулярной массы; 70+ положительный контроль; 701 – изолят из мозга № 1; 705 – изолят из мозга № 2**

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что менингоэнцефалиты возникают при заносе в мозг МБТ с кровью из туберкулезных очагов в легких и лимфатических узлах. У павших коз во внутренних органах туберкулезных изменений не было. Несмотря на то, что в пробах мозга присутствовала ДНК МБТ, не было обнаружено специфических для туберкулеза эпителиоидно-клеточных гранул с казеозным некрозом, но были найдены губкообразные изменения.

В тканях мозга не найдено типичных КУ МБТ, но в больших количествах обнаружены различные формы CWD МБТ, отмечено накопление антигенов МБТ в цитоплазме клеток и в межклеточном пространстве. По нашему мнению, именно персистенция трансформированных (CWD) МБТ могла стать причиной губкообразных изменений в мозге и развития симптомов заболевания. Вероятность этого подтверждает возникновение симптомов спонгиморфной энцефалопатии (BSE) у коровы, инфицированной *Mycobacterium bovis* [18]. Известно, что МБТ могут образовывать элементарные тельца размером менее 0,22 мк [20], которые могут преодолеть гемато-энцефалический барьер и инфицировать клетки мозга.

Посев консервированных проб мозга на среду Гельберга закономерно дал отри-

цательные результаты. CWD МБТ были выделены благодаря использованию стимуляторов роста и питательной среды Мус Сел DW. Известно, что МБТ в тканях, фиксированных 10 % формалином, определенное время могут сохранять жизнеспособность. Сообщалось о выделении 3 культур МБТ (2,17 %) из 138 проб фиксированного патологического материала [12], но при исследовании музейных проб, длительно находившихся в 10 % формалине, во всех случаях получен отрицательный результат. В проведенных исследованиях CWD МБТ были выделены из проб мозга, находившихся в 10% формалине 5 лет и 3 года. То есть, жизнеспособность CWD МБТ была сопоставима с инфекционностью прионов.

Механизм восстановления жизнеспособности CWD МБТ после летальных воздействий детально не изучен. Предполагается, что защитные формы МБТ, образовавшиеся под действием неблагоприятных факторов, активизируются стимулятором роста (ВКГ или МусСел DW) и растут в виде CWD форм, а иногда и КУ клеток на питательной среде с компонентами, необходимыми для их роста. Оба стимулятора роста и питательная среда МусСел DW ранее успешно использовались для выделения CWD МБТ из туберкулинов и лейкозных антигенов [4, 17].

Полученные результаты в известной степени подтверждают предположение [9], что туберкулезная инфекция и CWD МБТ могут быть причиной губкообразных поражений мозга. CWD МБТ изоляты из мозга практически не отличались по морфологии, антигенному и полипептидному составу от CWD МБТ изолятов из туберкулина, АГВЛ, людей и животных, больных туберкулезом. Вероятно, что при попадании МБТ в организм возникающие эффекты (активный туберкулез, онкогенное действие, поражения мозга, сердечно-сосудистая патология и другие эффекты) зависят, от инфицирующей дозы, особенностей штамма и в значительной степени от генома хозяина и состояния его иммунной системы. В частности, прослеживается определенная связь латентной туберкулезной инфекции и болезни Альцгеймера [11].

Как правило, заболевание развивается у пожилых людей с возрастными иммунодефицитами. В мозге накапливаются труднодеградируемые продукты метаболизма CWD МБТ, в том числе В-амилоид [19]. Косвенное подтверждение этому – заметное влияние рифампицина на агрегацию и нейротоксичность В-амилоида [11, 19].

В современных условиях типичные МБТ скорее играют роль инвазивной (заражающей) формы, которая в большинстве случаев вызывает латентную туберкулезную инфекцию, трансформируясь в организме в CWD МБТ, пожизненно персистирующие в организме. Нельзя исключать, что в глобальном масштабе персистенцию CWD МБТ может вызывать массовое применение вакцины БЦЖ и туберкулина [17].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Власенко, В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности / В.В. Власенко. – Винница: Наука, 1998. – 350 с.
2. Феномен изменчивости микобактерий туберкулеза и его использование для обнаружения туберкулезной инфекции. Туберкулез – глобальная катастрофа человечества / А.П. Лысенко [и др.]: материалы I Международной заочной научно-практической конференции 24 марта 2014 г. – Ростов-на-Дону, 2014. – С.176–198.
3. Лысенко, А.П. Выявление микобактерий туберкулеза в тканях с помощью дифференцирующей иммунопероксидазной окраски. Туберкулез и болезни легких / А.П. Лысенко, В.В. Власенко, А.П. Лемшиш [и др.]. – 2014. – № 10. – С. 55–58.
4. Лысенко, А.П., Власенко, В.В., Красникова, Е.Л., Брокмeyer, Л. Микобактерии обнаружены в культуральной жидкости почки эмбриона овцы, инфицированного вирусом бычьего лейкоза. / Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. Международный научно-практический журнал РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского». – 2018. – № 1. – С. 7–18.
5. Alavi H.A., Moscovic E.A. Immunolocalization of cell-wall-deficient forms of *Mycobacteria tuberculosis* complex in sarcoidosis in sinus histiocytosis of lymph nodes draining carcinoma. *Histol Histopathol.* 1996, Jul; 11(3): 683–694.
6. Almenoff, P.L., Johnson, A., Lesser, M., Mattman, L.H. (1996): Growth of acid fast L forms from the blood of patients with sarcoidosis. *Thorax*, 51, 530–533.
7. Anestad, G., Hoel, T. Atherosclerosis and tuberculosis: are they both chronic infectious diseases. *Scand J Infect. Dis.* 2001;33:797.
8. Beran, V., Havelkova, M., Kaustova, L., Dvorska, J., Pavlik, I. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Veterinarni Medicina*, 51, 2006 (7): 365–389.
9. Broxmeyer, L. Is mad cow disease caused by a bacteria. *Medical Hypothesis* (2004) 63, 731–739.
10. Broxmeyer, L. Diabetes mellitus, tuberculosis and the mycobacteria: two millennia of enigma. *Medical Hypothesis* (2005); 65 (3): 433–9.
11. Broxmeyer, L. Alzheimer`s Disease – How Its Bacterial Cause Was Found and Then Discarded. Create Space, USA, 2016.
12. Gerston, K.F., Blumberg, L., Tshabalala V.A., Murray, J. (2004) Viability of mycobacteria in formalin-fixed lungs. *Hum pathol* 35: 571–575.

13. Guliang H, Tefu L. *Mycobacterium tuberculosis* L-forms. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 1999, 10, P. 129–133.

14. Ghosh, J., Larsson, P., Singh, B., Pettersson, B.M.F., Islam, N.M., Sakhar, S.N., Dasgupta, S., Kisebom, L. *Sporulation in mycobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009, 106, 26, P.10781–10786.

15. Huaman, M., Henson, D., Ticona, E., Sterling, T.R. and Garvy, B.A. *Tuberculosis and cardiovascular disease: linking the epidemics. Tropical Disease, Travel Medicine and Vaccines 2015* 1:10

16. Mattman, L. *Cell Wall Deficient Forms – Stealth Pathogens*. Boca Raton: CRC Press; 1993.

17. Lysenko, A.P., Vlasenko, V.V., Broxmeyer L. [et al.]. *The tuberculin skin test: how safe is safe? The tuberculin contains unknown forms capable of reverting to cell-wall-deficient mycobacteria. Clinical and Experimental Medical Sciences*. 2014, 1, 2, no. 1–2, P.55–73.

18. Roels, S., Walravens, C. *Mycobacterium bovis meningitis in a cow with clinical signs of BSE. Vet Rec* 2003; 152(26) 6807-8

19. Schartz, Ph. *Amyloid degeneration and tuberculosis in the aged. Gerontologia* 1972; 8(5-6): 321-62.

20. Slavchev, G., Michailova, L., Markova, N. *Stress-induced L-forms of M. bovis: challenge to survivability. New Microbiologica*. 2013, 36, P.157–166.

21. Song, L.Y., Yan, W.S., Zhao, T. *Detection of Mycobacterium tuberculosis in lung cancer tissue by indirect in situ nested PCR. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2002; 22:992–993.

22. Tian, Y.S., Hao T., Cao B. [et al.] *Clinical End-Points Associated with Mycobacterium tuberculosis and Lung Cancer: Implications into Host- Pathogen Interaction and Coevolution. Bio Med Research Intern. Vol. 2015 (2015) 9pp.*

23. Tomiyama, T., Satoshi, A. *Rifampicin prevents the aggregation and neurotoxicity of amyloid B protein in vitro. Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204(1):76-83.

24. *WHO Report Global Tuberculosis Control 2010 World Health Organization; WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 2010; 218pp p.16.*

25. Yang, B., Tian, Y., Cui, X., Zhang, W. [et al.] *Detection of Mycobacterium tuberculosis L-forms and MPB64 gene in breast cancer tissues. J. of Practical Medicine*. 2013. 15: 2552-2555.

ВАКЦИНА ИНАКТИВИРОВАННАЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА, ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ, ПАРАГРИППА-3 И ПАСТЕРЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

**«БЕЛВИРОПАСТ»**

\* состоит из штаммов вирусов инфекционного ринотрахеита, диареи, парагриппа-3, штаммов бактерий *Mycobacterium avium* (*Pasteurella*) *haemolytica* тип А и *Pasteurella multocida* тип А, эмульгированных в масляном адъюванте;

\* применяют для профилактической иммунизации крупного рогатого скота против указанных болезней;

\* нетелей вакцинируют за два месяца до отела двукратно с интервалом 21–28 суток внутримышечно в дозе 3,0 см<sup>3</sup>;

\* телят 8–12-дневного возраста иммунизируют двукратно с интервалом 15–20 суток внутримышечно в дозе 1,0 см<sup>3</sup> или с 35–45 дневного возраста иммунизируют двукратно с интервалом 21–28 суток внутримышечно в дозе 2,0 см<sup>3</sup>;

\* телят, для комплектования ферм (комплексов), завезенных из других мест, вакцинируют в период карантинирования на 2–5 день после завоза двукратно в объеме 2,0 см<sup>3</sup> с интервалом 21–28 дней;

\* иммунитет формируется к 21 дню после вакцинации;

\* выпускают по 10,0; 20,0; 50,0; 100,0; 200,0 или 400,0 см<sup>3</sup>;

\* срок годности вакцины – 18 месяцев с даты изготовления.

**НОВИНКА!!!**

УДК 619:616.98:578.82/.83(477.75)

Стегний Б.Т., доктор ветеринарных наук, профессор, академик НААН Украины  
Гаврюшенко Е.А., младший научный сотрудник  
Музыка Д.В., доктор ветеринарных наук

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭПИЗОТИЧЕСКОГО ИЗОЛЯТА ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ

### Резюме

В статье приведены данные о результатах изучения биологических свойств эпизоотического изолята «Южна-Холдинг» вируса инфекционной бурсальной болезни, который был изолирован на одной из птицефабрик в г. Симферополь, АР Крым, Украина в 2010 году. Специфичность выделенного эпизоотического изолята подтверждена положительными результатами в реакции нейтрализации и способом бляшкообразования. Полевой изолят показал высокую адаптационную способность к культивированию в первично-трипсинизированных культурах птичьих фибробластов. Максимальный титр инфекционной активности изолята «Южна-Холдинг» составил  $8,65 \lg \text{TCD}_{50}/\text{cm}^3$  при культивировании в культуре клеток фибробластов перепелиных эмбрионов в пятом пассаже. Патогенность изолята «Южна-Холдинг» была подтверждена в биопробе на цыплятах породы Борковская барвистая в возрасте 47 суток. При заражении цыплят введением интраназально/окулярно нативной экстраэмбриональной жидкости (1пассаж) в дозе  $0,400 \text{ cm}^3$  изолят вызывал характерные клинические признаки и типичные патологоанатомические изменения.

### Summary

This article represents research data about biological characteristics of «Yuzhna-Holding» infectious bursal disease isolate, obtained in Simferopol, AR Crimea, Ukraine in 2010. The specificity of this epizootic isolate is confirmed with positive results in neutralization reaction as well as with plaque-assay method. The field isolate has shown its high adaptive capability for cultivation in primarily trypsinized chicken fibroblast cell cultures. The highest infective activity titer of «Yuzhna-Holding» isolate was  $8,65 \lg \text{TCD}_{50}/\text{cm}^3$  on fifth passage when cultivating in QEF CC. The pathogenicity of «Yuzhna-Holding» isolate was proved with bioassay on 47-day old chickens of «Borkivska barvysta» breed. The isolate caused typical clinical signs and internal lesions when intranasal/ocular inoculating of  $0,400 \mu\text{l}$  of native extra embryo liquid.

Поступила в редакцию 17.10.2018 г.

### ВВЕДЕНИЕ

В связи с интенсивным и стремительным развитием современного птицеводства возрастает спрос потребителя на высококачественную продукцию, а доступные цены диктуют производителям повышение интенсификации и концентрации производства. Все это приводит к значительному давлению на организм птицы, которая имеет определенный генетический потенциал. Стремление производителей к достижению большей прибыли и высокой эффективности повышает риски возникновения инфекционных болезней. Одним из таких является изменчивое, широко распространенное, экономически ущербное для птицеводства заболевание – инфекци-

онная бурсальная болезнь [1, 2].

Инфекционная бурсальная болезнь (болезнь Гамборо) вызывается бирнавирусом, поражающим цыплят преимущественно в 2–15-недельном возрасте и сопровождается диареей, поражением фабрициевой бursы, реже других лимфоидных органов, почек, наличием кровоизлияний в грудных мышцах, крыльях, бедрах. Вирус проявляет тропизм к лимфоидным клеткам, вызывает их разрушение и блокирует иммунный ответ [5].

Существуют две формы заболевания – клиническая и субклиническая.

Клиническая форма характеризуется внезапным началом, острым течением, резким повышением, а затем быстрым сниже-

нием смертности. При этом наблюдаются обширные разрушения лимфоцитов в фабрициевой бурсе и других лимфоидных органах.

Субклиническая форма заболевания чаще проявляется у цыплят до двухнедельного возраста, не сопровождается специфическими симптомами, но характеризуется продолжительным угнетением иммунитета. На фоне пониженного иммунитета у переболевшей птицы отмечают снижение эффективности вакцинации против других инфекционных болезней [3].

Преимущественное большинство вспышек инфекционной бурсальной болезни в мире и в Украине связано с циркуляцией высоковирулентных штаммов вируса. Но болезнь могут вызывать и варианты штаммы, которые возникают вследствие изменения вирулентности и патогенности возбудителя. Проблема повторных вспышек бурсальной болезни под действием новых эпизоотических штаммов возбудителя обращает на себя внимание и побуждает ученых как в мире, так и в Украине к мониторингу и поиску, к всестороннему изучению их биологических свойств для дальнейшего усовершенствования средств профилактики и диагностики инфекционной бурсальной болезни [1, 5, 6].

**Целью** наших исследований было изучение биологических свойств эпизоотического изолята вируса инфекционной бурсальной болезни «Южна-Холдинг», изолированного от цыплят, и подтверждение его специфичности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Материалы:** эпизоотический изолят «Южна-Холдинг» вируса инфекционной бурсальной болезни. Патологический материал был отобран в 2010 году во время вспышки болезни Гамборо среди цыплят бройлеров 39–44-суточного возраста на одной из птицефабрик в г. Симферополь, АР Крым. Летальность среди цыплят составляла 45–70 % от всего поголовья в птичнике. Заболевание цыплят сопровождалось жаждой, угнетением и диареей с фекалиями те-

многo цвета. При проведении патологоанатомического вскрытия вынужденно убитой и погибшей птицы были обнаружены: полосатые кровоизлияния в мышцах бедра, атрофия бursы, кровеносные сосуды кишечника и печени были кровенаполненными, почки были увеличены и заполнены уратами. От цыплят неблагополучного птичника были отобраны пробы сыворотки крови для серологических исследований на НБ, ИБК, результаты которых были отрицательными;

- 9–10-суточные куриные эмбрионы;
- 9-суточные перепелиные эмбрионы;
- первично-трипсинизированные клеточные культуры фибробластов куриных эмбрионов (ФЭК) и фибробластов перепелиных эмбрионов (ФЭП);
- цыплята-бройлеры породы Борковская барвистая в возрасте 47 суток.

**Методы:** первичное выделение вируса проводили на куриных эмбрионах путем внесения в алантоисную полость надсодочной жидкости 10 % суспензии патологического материала (селезенка, печень, почки, bursa Фабрициуса), обработанной антибиотиками, в дозе 0,2 см<sup>3</sup>. Всего для заражения использовали четыре 10-суточных КЭ и два КЭ оставляли для контроля. Инкубировали при температуре 37 °С в течение 5 суток. В процессе инкубации эмбрионы овоскопировали два раза в сутки (утро/вечер).

Первичные клеточные культуры ФЭК и ФЭП готовили из кожно-мышечной ткани 10-суточных куриных эмбрионов и 9-суточных перепелиных эмбрионов по общепринятой методике [4, 9] с некоторыми нашими модификациями.

**Культирование вируса.** Культивирование вируса проводили в клеточной культуре с использованием пластиковых культуральных сосудов емкостью 50 см<sup>3</sup>. Первичные клеточные культуры ФЭП и ФЭК выращивали при температуре 37 °С до формирования сплошного монослоя без признаков дегенерации клеток. Из сосудов с клеточными культурами сливали ростовую среду, монослой промывали солевым раствором Хенкса и вносили вирус в ин-

фицирующей дозе 0,01–1,0 ТЦД<sub>50</sub>/кл. После 1 часа контакта вируса с клетками вносили поддерживающую среду и культивировали вирус при температуре 37 °С. Инфицированные и контрольные культуры ежедневно просматривали под микроскопом на наличие характерных морфологических изменений клеток.

**Определение титра инфекционной активности вируса.** Определение титра инфекционной активности изолята «Южна-Холдинг» проводили в культуре клеток ФЭП согласно общепринятой методике [8]. Для этого готовили разведения вируса от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-10</sup>. Микроскопию зараженных и контрольных клеточных культур проводили ежедневно в течение 6 суток с помощью микроскопа «Биолам П1». На основании учета ЦПД вируса в клеточной культуре ФЭП определяли инфекционный титр вируса методом Рида и Менча. Проверку полученной расплодки вируса на отсутствие посторонней контаминации бактериями и грибами проводили в соответствии с ДСТУ 4483:2005.

**Специфичность** изолята «Южна-Холдинг» подтверждали методом бляшкообразования и реакцией нейтрализации [7, 8].

**Постановку реакции нейтрализации** осуществляли по общепринятой методике. Титр вируса в реакции нейтрализации вычисляли по Риду и Менчу на основании ЦПД в культуре клеток ФЭП через 5–6 суток инкубации после заражения. Титр антител (Ат) соответствовал наибольшему разведению сыворотки (GD Голандия, от цыплят через 17 суток после иммунизации - IVD), которое было способно подавлять активность вируса в культуре клеток.

**Проверку патогенности изолята** проводили путем введения по 400 мкл интраназально/окулярно цыплятам бройлерам вирусосодержащей экстраэмбриональной жидкости (ЭЭЖ). Для заражения была сформирована одна опытная группа (n=5) и одна контрольная группа (n=5). За инфицированными цыплятами наблюдали 17 суток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

С целью освежения полевого изолята «Южна-Холдинг» проводили инфицирование куриных эмбрионов (КЭ) При вскрытии зараженных КЭ были выявлены следующие изменения: задержка роста и развития, гиперемия и кровоизлияния на коже в области головы и крыльев, точечные кровоизлияния в мышцах грудобрюшной полости, подкожный отек на нижней части туловища (рисунок 1).



**Рисунок 1. – Задержка роста и развития эмбриона, гиперемия, кровоизлияния на коже в области головы, крыльев, в мышцах конечностей под действием эпизоотического изолята «Южна-Холдинг»**

Полученная ЭЭЖ первого пассажа на куриных эмбрионах была использована для дальнейшего заражения культур клеток ФЭК и ФЭП. Проведено по 6 пассажей с каждой культурой клеток. Наблюдение за инфицированными культурами с целью определения ЦПД проводили в течение 4 суток. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Полученные результаты указывают на возможное влияние остаточных материнских антител, которые содержатся в коммерческих куриных эмбрионах.

Как показали результаты исследований, первые признаки ЦПД изолята «Южна-Холдинг» в первичной культуре ФЭП проявились во втором пассаже через 48 часов. Характерными были округления клеток.

Таблица 1. – Динамика развития ЦПД под действием изолята «Южна-Холдинг» в первичных культурах клеток птичьих фибробластов

№ п/п	Использованные культуры клеток	Учет ЦПД в монослое			
		время после заражения, ч			
		24	48	72	96
1.	Первичная культура ФЭК (3-тий пассаж)	-	-	-	+
2.	Контроль	-	-	-	-
3.	Первичная культура ФЭП (2-ой пассаж)	-	+	+	+
4.	Контроль	-	-	-	-

Примечание – «-» отсутствие ЦПД; «+» проявление ЦПД

Через 72 часа в культуре ФЭП полевой изолят вызвал образование тяжей и удлинение клеток, а через 96 часов – разрушение монослоя и образование пустот (рисунки 2, 3).

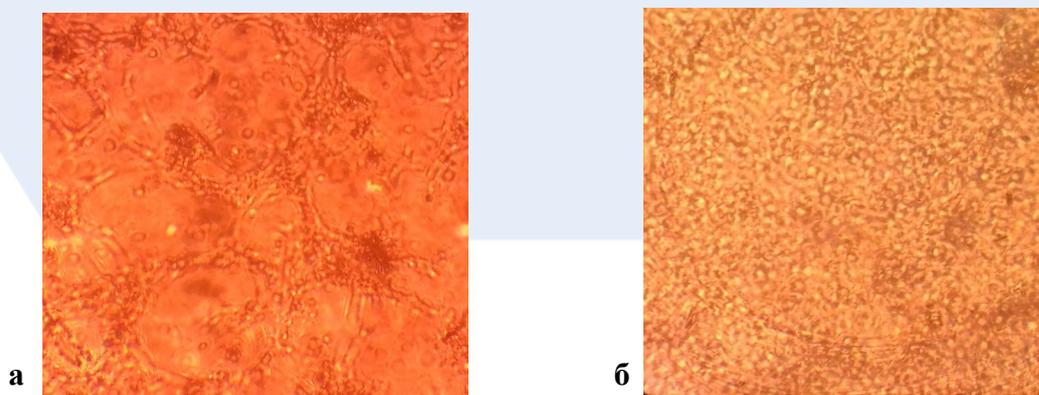


Рисунок 2. – а – ЦПД под действием изолята «Южна-Холдинг» в первичной культуре ФЭП (72 ч); б – контроль

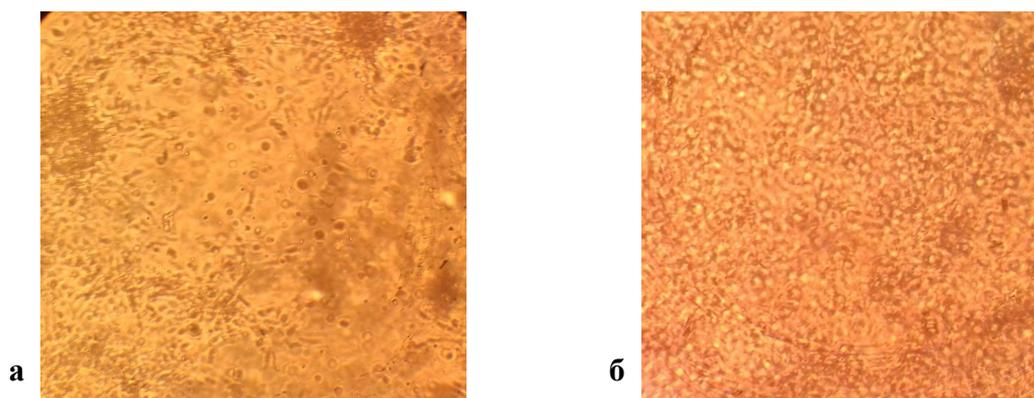


Рисунок 3. – а – ЦПД под действием изолята «Южна-Холдинг» в первичной культуре ФЭП (96 ч); б – контроль

ЦПД в первичной культуре клеток ФЭК полевой изолят «Южна-Холдинг» проявил позже в сравнении с культурой ФЭП и первые изменения в монослое были заметны в третьем пассаже через 96 ч после заражения (рисунок 4).

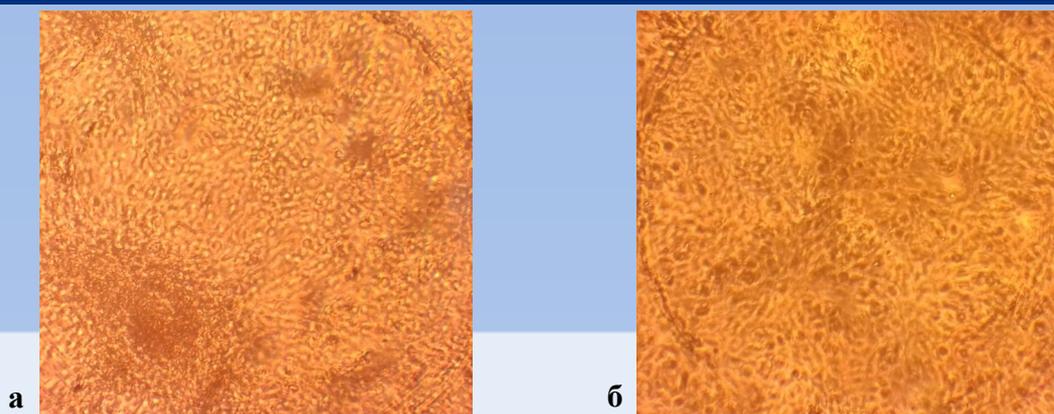


Рисунок 4. – а – ЦПД под действием изолята «Южна-Холдинг» в первичной культуре ФЭК (96 ч); б – контроль

Характерными были округление клеток, их скопления в виде фокусов, но разрушения монослоя не наблюдалось. В контролях цитопатические изменения не проявлялись. Все образцы, которые имели характерные признаки ЦПД, были проверены на отсутствие контаминации бактериальной

микрофлорой на тиогликолевой среде согласно ДСТУ 4483:2005.

Определение титра инфекционной активности изолята «Южна-Холдинг» проводили в культуре клеток ФЭК. Всего было проведено 6 пассажей. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Уровень накопления изолята вируса «Южна-Холдинг» в первичной культуре ФЭК

Культура клеток	Титр вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>				
	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж	4 пассаж	5 пассаж
Первичная культура ФЭК	7,35±0,15	7,40± 0,16	7,65± 0,35	8,3± 0,28	8,65±0,25

В результате проведенных исследований было установлено, что титр инфекционной активности в первичной клеточной культуре ФЭК на достаточно высоком уровне был установлен уже в первом пассаже и составил 7,35±0,15 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. В пятом пассаже титр вируса увеличился до 8,65 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Исследования по дальнейшему определению титра инфекционной активности продолжаются.

Так как возбудитель болезни Гамборо относится к группе бляшкообразующих вирусов, мы исследовали способность эпизоотического изолята «Южна-Холдинг» к бляшкообразованию, применяя общепринятую методику. Для получения бляшек использовали матричную культуру клеток ФЭК с 4 пассажа. Вирусный материал тит-

ровали в разведениях от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-8</sup>. Результаты проведенного теста показали, что эпизоотический изолят «Южна-Холдинг» вируса инфекционной бурсальной болезни обладает способностью к бляшкообразованию, так как мы получили 21 БОЕ (бляшкообразующие единицы) в 10<sup>-7</sup> разведении вируса.

Результаты проведения реакции нейтрализации показали, что специфическая сыворотка нейтрализовала изолят «Южна-Холдинг» в разведении 10<sup>-5</sup>.

С целью проверки патогенности изолята «Южна-Холдинг» было проведено экспериментальное заражение циплят. Результаты экспериментального заражения приведены в таблице 3.

Таблица 3. – Результаты экспериментального заражения цыплят эпизоотическим изолятом «Южна-Холдинг»

№ крылометки	Доза вирусного материала	Проявление клин.призн	Падеж цыплят
опыт:			
206	400 мкл	-	вынуж./убой
207	400 мкл	ч/з 7 суток	ч/з 8 суток
208	400 мкл	-	вынуж./убой
209	400 мкл	ч/з 6 суток	ч/з 7 суток
210	400 мкл	-	вынуж./убой
контроль	-	-	вынуж./убой

Через 6 и 7 суток у двух цыплят проявились типичные клинические признаки инфекционной бурсальной болезни, а именно: жажда, угнетение и диарея с фекалиями темного цвета. Трое цыплят оставались живыми без проявления типичной клинической картины, их подвергли вынужденному убою через 17 суток. При проведении патологоанатомического вскрытия вынужденно убитой и погибшей птицы были обнаружены: полосатые кровоизлияния в мышцах бедра, увеличение бурсы и наложения фибрина в ее полости, ее атрофию в вынужденно убитой птицы кровеносные сосуды кишечника и печень были кровенаполненные, холецистит, точечные кровоизлияния на границе железистого и мышечного желудков, почки были увеличены и заполнены уратами, наблюдалось катарально-геморрагическое воспаление слизистой оболочки тонкого отдела кишечника (рисунки 5, 6, 7).



**Рисунок 5. – Точечные кровоизлияния в мышцах бедра**



**Рисунок 6. – Воспаление бурсы и отложение фибрина**



**Рисунок 7. – Точечные кровоизлияния на слизистой оболочке тонкого отдела кишечника**

Для реизоляции вируса от экспериментально инфицированных цыплят – бройлеров был отобран патологический материал, из которого готовили 10 % суспензию для заражения культуры клеток ФЭП. Было проведено 2 пассажа. Характерные цитопатические изменения изолят «Южна-Холдинг» проявил уже в первом пассаже через 48 часов культивирования в виде округления клеток и образования тяжей.

## ВЫВОДЫ

1. По результатам исследований установлена способность эпизоотического изолята «Южна-Холдинг» вируса инфекционной бурсальной болезни культивироваться на первичных клеточных культурах птичьих фибробластов.

2. Показано, что первичная клеточная культура ФЭП является оптимальной системой для репродукции вируса по сравнению с первичной клеточной культурой ФЭК. Максимальный титр инфекционной активности изолята «Южна-Холдинг» составлял  $8,65 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  при культивировании в КК ФЭП в пятом пассаже.

3. Специфичность выделенного эпизоотического изолята подтверждена положительными результатами в реакции нейтрализации и способом бляшкообразования.

4. Патогенность изолята «Южна-Холдинг» была подтверждена проявлением характерных клинических признаков и типичных патологоанатомических изменений в результате экспериментального заражения восприимчивых цыплят-бройлеров.

5. В результате реинфекции вируса в КК ФЭП цитопатическое действие проявлялось в первом пассаже через 48 часов культивирования в виде округления клеток и образования тяжей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев, А.С. Инфекционная бурсальная болезнь / А.С. Алиев. – СПб., 2010. – 250 с.
2. Бакулин, В.А. Болезни птиц / В.А. Бакулин. – СПб., 2006. – 762 с.
3. Бирман, Б.Я. Инфекционная бурсальная болезнь: эпизоотология, этиология, патогенез, клинические признаки, диагностика, меры борьбы и патанатомия вирусной высококонтагиозной болезни цыплят 3-6-недельного возраста / Б.Я. Бирман. – Минск, 2003. – 111 с.
4. Животная клетка в культуре / под ред. Дьяконова Л.П. – М.: Спутник плюс». – 2009. – 656 с.
5. Кэлнек, Б.У. Болезни домашней и сельскохозяйственной птицы / Б.У. Кэлнек. – М.: Аквариум, 2003. – 1232 с.
6. Коровин, Р.Н. Лабораторная диагностика болезней птиц: справочник / Р.Н. Коровин, В.П. Зеленский, Г.А. Грошева. – М.: Агропромиздат, 1989. – 256 с.
7. Микробиологические и вирусологические исследования в ветеринарной медицине: спр. пособ / А.Н. Головки [и др.]: под общ. ред. А. Н. Головки. – Х.: НТМТ, 2007. – 512 с.
8. Сюрин, В.Н. Диагностика вирусных болезней животных: справочник / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. – М.: Агропромиздат, 1991. – 528 с.
9. Усовершенствование методики культивирования культуры клеток куриных фибробластов / Е.В. Куренкова, Ш.К. Куляшбекова, А.А. Пяткина // тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2007. – Т. 5. – С. 386–392.

## Вакцина «РЕСПИВАК»

ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ПАСТЕРЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА




- вызывает выработку специфических антител у крупного рогатого скота к *Pasteurella multocida* серовариантов А, В и *Mannheimia haemolytica*;
- вводится внутримышечно;
- вакцинацию коров (телок) проводят независимо от срока стельности в дозе 2,0 см<sup>3</sup>;
- телок начинают вакцинировать с 15–16-месячного возраста;
  - телят вакцинируют с 5–10-дневного возраста в дозе 1,0 см<sup>3</sup>;
  - иммунитет наступает через 14–21 день после вакцинации и сохраняется в течение последующих 12 месяцев;
  - выпускают по 10, 20, 50, 100, 200, 400 см<sup>3</sup>;
  - срок годности вакцины – 18 месяцев при температуре от плюс 2 до плюс 8°С.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» 220003, г. Минск, ул. Брикета, 28, тел./факс (+37517) 508-81-31  
По вопросам приобретения Вы можете обратиться в отдел снабжения и сбыта тел. (017) 508-81-35 E-mail: bievm@tut.by

УДК 636.09:579.84:303.64

Пустовит Н.А., и.о. заведующего сектором  
Пинчук Н.Г., кандидат ветеринарных наук

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

## ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТА *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, ВЫДЕЛЕННОГО ОТ ПТИЦЫ

### Резюме

Многие исследования показали, что *C. jejuni* вызывает столько же случаев гастроэнтерита человека, что и *Salmonella* sp. Продукты питания являются важным средством заражения людей. В качестве потенциальных источников инфекции также служат другие продукты животного происхождения. *C. jejuni* была обнаружена на тушах домашней птицы и других домашних животных во всем мире. Методы, разработанные для использования в клинических лабораториях, не обладают необходимой чувствительностью и селективностью и поэтому имеют ограниченное применение при выявлении небольших количеств *C. jejuni* в пищевых продуктах. В данной статье приведены исследования культурально-морфологических и биохимических свойств *C. Jejuni*, выделенного от птицы.

### Summary

Many studies have revealed that *C. jejuni* causes at least as many cases of human gastroenteritis as does *Salmonella* sp. Foods are an important vehicle in human infection. Other animal products also serve as potential sources of infection. *C. jejuni* has been found on the carcasses of poultry and other domestic animals throughout the world. Methods developed for use in clinical laboratories lack the necessary sensitivity and selectivity, and therefore have limited use in detecting small numbers of *C. jejuni* in foods. In this article, studies of the culture-morphological and biochemical properties of *C. Jejuni* isolated from poultry are presented.

Поступила в редакцию 06.08.2018 г.

### ВВЕДЕНИЕ

**Кампилобактериоз** (*Campylobacteriosis*) – инфекционное антропоозоозное заболевание, характеризующееся острым течением, общей интоксикацией и поражением преимущественно желудочно-кишечного тракта и возможной генерализацией патологического процесса. Так, у людей кампилобактерии попадают в организм чаще с контаминированными продуктами питания животного происхождения. Среди всех кампилобактеров наиболее значимые в развитии заболевания у людей *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter coli* [1].

Кампилобактериоз инфекционная болезнь, которая проявляется в форме энтерита, гепатита, септицемии и интоксикации. Кампилобактерии очень чувствительны к действию физико-химических факторов (прямые солнечные лучи, высушивание,

нагревание и т.д.) [2].

Основным природным резервуаром кампилобактеров являются куры, индюки, дикие птицы, грызуны, а также овцы, козы, свиньи, крупный рогатый скот. Бройлеры могут быть инфицированы кампилобактериями до 90 %, индюки – до 100 %, утки – до 88 %, при этом клинические признаки болезни у них отсутствуют. Кампилобактерии у птицы локализуются в основном в кишечнике и выделяются с помётом, инфицируя окружающую среду [2].

Кампилобактеры, являясь микроаэрофилами, не обладают способностью длительно выживать во внешней среде при контакте с кислородом, однако они хорошо сохраняются в водной среде при низких температурах [3].

Основной путь передачи инфекции в организме человека – потребление контаминированного возбудителем недоварен-

ного мяса (особенно птицы), непастеризованного молока или молочных продуктов, а также загрязненной воды. Заражение возможно также через контакт с инфицированными животными или их фекалиями [4].

Поэтому сегодня важной задачей, стоящей перед специалистами ветеринарной медицины относительно кампилобактериоза, является обеспечение эпизоотического благополучия среди поголовья домашних животных, особенно птиц, проведение качественной диагностики и постоянный контроль продуктов питания животного происхождения на наличие кампилобактеров [5].

Для лабораторной диагностики кампилобактериоза основного бактериологического метода с выделением чистой культуры возбудителя может быть недостаточно, поэтому для подтверждения результата используют и другие методы [6].

Проведение исследования материалов на наличие кампилобактерий микробиологическим методом требует значительных затрат времени, ресурсов, приборов и наличия определенных навыков рабочего персонала. Кроме этого, при применении данного метода следует помнить о возможности кампилобактеров существовать в жизнеспособной, но не культивируемой форме, в форме, которую сложно выделить в чистом виде.

Первоочередной задачей бактериологического исследования является выделение чистой культуры. С этой целью используют несколько методов:

- высеив исследуемого материала непосредственно на селективные питательные среды;
- накопление в жидкой питательной среде;
- изолирование отдельных колоний и выделение чистой культуры для подтверждения видовой специфичности;
- подтверждение результата.

Эти актуальные положения и определили выбор направления наших исследований и методы исполнения работы.

**Цель** наших исследований – изучение свойств изолята *Campylobacter Jejuni*, выделенного от птицы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Культурально-морфологические свойства *Campylobacter jejuni* определяли путем культивирования микроорганизма в жидких питательных средах (триптон-соевый бульон (ТСБ Himedia), полужидкий триптон-соевый агар (НТСА), триптон-соевый агар (ТСА Himedia), кампилобакагар (Himedia M-994)) и окраской мазков, изготовленных из суточных культур, по Грамму.

Биохимические свойства штамма определяли путем культивирования в питательной среде «Основа бульона с фенольных красным М-054» производства «Himedia» с арабинозой, глюкозой, дульцитом, мальтозой, лактозой, маннитом, маннозой, рамнозой, салицином, сорбитолом, сахарозой, ксилозой, галактозой, фруктозой, адонитом, инулином, инозитом, целобиозой, мелибиозой, трегалозой.

Антибиотикочувствительность изучали диско-диффузальным методом с использованием стандартных дисков производства «Himedia» с противомикробными препаратами.

Исследования проводили согласно действующему нормативному документу ДСТУ ISO 10272:2007.

Дифференциальную диагностику проводили с помощью определителя Берджи и подтверждали ПЦР.

ПЦР проводили на четырехканальном амплификаторе «Терцик» производства НПФ «ДНК-Технология» (Россия, г. Москва). В состав тест-системы для проведения 55 анализов, включая контрольные образцы, входит набор реактивов для выделения ДНК и набор реактивов для проведения ПЦР на выявление ДНК бактерий рода *Campylobacter spp.*; набор реактивов для проведения электрофоретического анализа продуктов ПЦР.

Для выделения ДНК был выбран метод лизиса клеток гуанидинтиоционатом с последующей сорбцией дезоксирибонуклеиновой кислоты на сорбенте.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Через 48–72 часа культивирования *Campylobacter jejuni* при температуре плюс  $41,5 \pm 0,5$  °С на ТСА и кампилобакагаре образовывались мелкие, гладкие, выпуклые, блестящие, с ровными краями колонии, в ТСБ – равномерное помутнение с формированием серо-белого диска на поверхности среды. На НСТА рост заметен по ходу укола столбика с формированием серо-белого диска на поверхности среды.

В микроскопических препаратах окрашенные по Грамму, грамтрицательные тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки, расположенные одиночно и парно, в поле зрения попадала и кокковая форма.

Результаты биохимических свойств изолята *Campylobacter jejuni* представлены в таблице 1. Пробирки ежедневно просматривали в пронизывающем свете на протяжении 14 суток.

Таблица 1. – Биохимические свойства выделенного изолята *Campylobacter jejuni*

Название сахара	Результат
арабиноза	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
<b>глюкоза</b>	<b>к<sup>+</sup> г<sup>-</sup></b>
дульцит	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
мальтоза	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
манит	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
манноза	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
рамноза	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
салицын	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
сорбитол	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
<b>сахароза</b>	<b>к<sup>+</sup> г<sup>-</sup></b>
ксилоза	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
галактоза	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
фруктоза	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
адонит	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
инулин	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
иннозит	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
целобиоза	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
мелибиоза	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
трегалоза	к <sup>-</sup> г <sup>-</sup>
<b>лактоза</b>	<b>к<sup>+</sup> г<sup>-</sup></b>

Примечание – к<sup>-</sup> г<sup>-</sup> – не ферментирует сахар к<sup>+</sup> г<sup>-</sup> – ферментирует с образованием кислоты без газа

Согласно исследованиям, выделенный изолят ферментирует глюкозу, лактозу, сахарозу, гидролизует пируват, каталазный тест положительный.

Чувствительность изолята к противомикробным веществам определяют диско-диффузальным методом с использованием стандартных дисков с противомикробными веществами. Степень противомикробной

чувствительности микроорганизмов устанавливают по диаметру зон задержки их роста на среде Мюллера - Хинтона вокруг дисков после инкубации. Диаметр зоны задержки роста измеряют линейкой с точностью до 1 мм, включая диаметр самого диска. По диаметру зон ингибирования микроорганизмы разделяют на чувствительные, средне чувствительные и резистентные.

Результаты антибиотикочувствительности изолята *Campylobacter jejuni* представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Антибиотикочувствительность изолята *Campylobacter jejuni*

Название антибиотика		<i>Campylobacter jejuni</i>
		Зона задержки роста, мм
1	2	3
1.	Амикацин $AK^{10}$	рез. кольцо
2.	Амоксициллин $AMX^{10}$ / Клавулановая кислота	52
3.	Ампициллин/Сульбактам $A/S^{10/10}$	56
4.	Левофлоксацин $LE^5$	22
5.	Моксифлоксацин $MO^5$	28
6.	Неомицин $N^{30}$	рез. кольцо
7.	Амфотерицин $AP^{100U}$	24
8.	Тобрамицин $TOB^{10}$	24
9.	Доксициклина гидрохлорид $DO^{30}$	24
10.	Налидиксовая кислота $NA^{30}$	20
11.	Метронидазол $MT^5$	–
12.	Хлорамфениколь $C^{30}$	20
13.	Ломефлоксацин $LOM^{10}$	54
14.	Амоксиклав $AMC^{30}$	19
15.	Котримоксазол $COT^{25}$	–
16.	Ванкомицин $VA^{30}$	21
17.	Ципрофлоксацин 30 мкг	45
18.	Ампицилин $AMP^{10}$	44
19.	Эритромицин $E^{15}$	49
20.	Азлоцилин $AZ^{75}$	44
21.	Тетрациклин $TE^{30}$	20
22.	Цефалотин $CEP^{30}$	30
23.	Линкомицин $L^2$	50
24.	Натриевая соль бензилпенициллина 10 мкг	48
25.	Фуразолидон $FR^{50}$	16
26.	Цефоперазон $CPZ^{75}$	22
27.	Офлоксин $OF^5$	21
28.	Фурагин 30 мкг	48
29.	Канамицин $K^{30}$	–
30.	Фурадонин 30 мкг	46
31.	Хлортетрациклин $CT^{30}$	рез. кольцо
32.	Пристиномицин $PM^{15}$	30
33.	Цефуросим $CXM^{30}$	23
34.	Рокситромицин $RO^{30}$	25

Продолжение таблицы 2

1	2	3
35.	Клиндамицин 30 мкг	50
37.	Имипенем <i>IPM<sup>10</sup></i>	рез. кольцо
38.	Пенициллин G <i>P<sup>100</sup></i>	21
39.	Норфлоксацин 10 мкг	52
40.	Спирамицин <i>SR<sup>100</sup></i>	26
41.	Сульфадиазин <i>Sz<sup>100</sup></i>	рез. кольцо
42.	Полимиксин-Б <i>Pb<sup>50U</sup></i>	рез. кольцо
43.	Фузидисва кислота <i>FC<sup>30</sup></i>	25
44.	Цефтриаксон 30 мкг	48
45.	Карбеницеллин 100 мкг	20
46.	Нетимицин 30 мкг	42 (рез. кольцо 12)
47.	Тобрамицин 10 мкг	24
48.	Итраконазол 10 мкг	–
49.	Сизомицин 10 мкг	22
50.	Цефазолин 30 мкг	рез. кольцо
51.	Цефтибутен 30 мкг	17
52.	Олеандомицин 15 мкг	24
53.	Гентамицин 10 мкг	15
54.	Колистин <i>CL<sup>10</sup></i>	19
55.	Пиперациллин/Газобактум <i>PIT<sup>100/10</sup></i>	15
56.	Бацитрацин <i>B<sup>8U</sup></i>	20
57.	Окситетрациклин <i>O<sup>30</sup></i>	24
58.	Сульфаметизол <i>SM<sup>300</sup></i>	рез. кольцо
59.	Сульфафеназол <i>Sr<sup>200</sup></i>	26
60.	Стрептомицин <i>S<sup>10</sup></i>	20 (рез. кольцо 32)
61.	Новобиоцин <i>NV<sup>30</sup></i>	–
62.	Офлоксацин 5 мкг	50
63.	Азитромицин 15 мкг	48
64.	Кларитромицин 15 мкг	22
65.	Линезолид 30 мкг	21
66.	Цефамандол 30 мкг	15
67.	Цефтазидим 30 мкг	12
68.	Цефепим 30 мкг	48
69.	Цефотаксим 30 мг	49
70.	Мерепенем 30 мг	50
71.	Цефоперазон 30 мг	52
72.	Ципрофлоксацин 5 мкг	23
73.	Моксифлоксацин 5 мкг	20
74.	Цефалексин <i>CN<sup>30</sup></i>	19

Проявляет чувствительность к антибиотикам пенициллинового ряда (натриевая соль бензилпенициллина, ампициллин, азлоциллин), макролидов (азитромицин и эритромицин), линкозамидов (линкомицин, клиндамицин), фторхинолонов (ципрофлоксацин, норфлоксацин, ломефлоксацин, офлоксацин), ингибиторов  $\beta$ -лактамазы (сульбактам, клавулановая кислота), антибиотиков нитрофуранового ряда (фурагин и фурадонин), а также некоторых цефалоспоринов (цефотаксим, цефепим, цефоперазон, цефтриаксон и т.д.) и мерепенему.

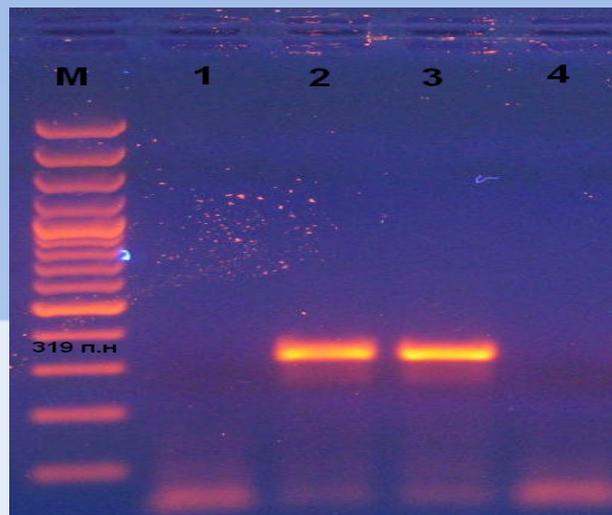
Современные методы молекулярно-генетического анализа, на основе выявления специфических для микроорганизмов нуклеотидных последовательностей ДНК, значительно расширяют возможности выявления в пищевых продуктах трудно культивируемых патогенных микроорганизмов.

Для выполнения ПЦР были использованы два синтетических олигонуклеотидных праймера, подобраны таким образом, что они являются комплементарными двум цепям специфического фрагмента ДНК кампилобактеров разных видов. Правильный выбор олигонуклеотидных праймеров определяет эффективность и воспроизводимость ПЦР.

Разработанные праймеры 16S-F1 и 16S-R2 были созданы в соответствии со всеми требованиями, обладают высокой специфичностью для связывания с участками матричной ДНК, не имеют критической гомологии с другими бактериями и вирусами.

Детекция продуктов ПЦР осуществляется методом электрофореза в агарозном геле при длине амплифицированного специфического фрагмента ДНК *Campylobacter spp.* – 319 п.н.

На рисунке 1 очень ярко светится положительный образец *Campylobacter spp.* (*Campylobacter jejuni*), длина фрагмента 319 п.н. Исследуемый образец *Campylobacter jejuni* дает свечение на данной высоте и поэтому считается положительными.



**Рисунок 1. – Элетрофореграмма выделенного изолята *Campylobacter jejuni*:  
М – маркер размера ДНК;  
1, 4 – негативный контроль;  
2 – позитивный контроль;  
3 – исследуемый образец**

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактерии изолята на TSA и кампилобакагаре образуют мелкие, гладкие, выпуклые, блестящие, с ровными краями колонии, в ТСБ – равномерное помутнение с формированием серо-белого диска на поверхности среды. НСТА – рост заметен по ходу укола и формирует серо-белый диск на поверхности среды.

Согласно проведенным культурально-морфологическим, биохимическим исследованиям, антибиотикочувствительности и подтверждения в ПЦР выделенный изолят относится к роду *Campylobacter* виду *Campylobacter jejuni*.

После проведенных исследований данный изолят был депонирован в депозитории Национального центра штаммов микроорганизмов Государственного научно-контрольного института биотехнологии и штаммов микроорганизмов под номером 685 и названием *Campylobacter jejuni* RS17.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Фотіна, Т.І. Кампілобактеріоз птиці: монографія / Т.І. Фотіна, А.В. Березовський, О.І. Касяненко, Ю.Є. Дворська // Суми: СНАУ, 2010. – 140 с.
2. Інструкція з профілактики та ліквідації кампілобактеріозу птиці: № 1192/19930. – К., 14 жовтня 2011 року.
3. Профилактика кампилобактериоза среди людей: Санитарно-эпидемиологические правила: СП 3.1.7. 2816 – 10. – Москва: постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации, 2010.
4. Prevalence and numbers of *Campylobacter* on broiler carcasses collected at rehang and postchill in 20 U.S. processing plants / M.E. Berrang [et. al.]. // *Journal of Food Protection*. – 2007. – Vol. 70. – P. 1556–1560.
5. Волинець Л.К. Харчові токсикоінфекції / Л.К. Волинець. – К.: Ветеринарна медицина. – 2003. – № 4. – С. 43–44.
6. Инструкция по клинической и лабораторной диагностике кампилобактериоза. – Вологда, 1991.

УДК 619:579.25:616-078:638.15

Черник М.И., кандидат ветеринарных наук  
 Радюш И.С., кандидат ветеринарных наук  
 Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук  
 Дубаневич О.В., старший научный сотрудник

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

### ВЫДЕЛЕНИЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА ДЕФОРМАЦИИ КРЫЛА ПЧЕЛЫ МЕДОНОСНОЙ (*APIS MELLIFERA L.*) В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

**Резюме**

Сложность диагностики вирусных инфекций пчёл обусловлена отсутствием культур клеток тканей пчелы медоносной, коллекций штаммов вирусов, патогенных для медоносных пчел, и тест-систем для молекулярно-генетической идентификации.

Из всех вирусов обнаруженных у медоносной пчелы *Apis mellifera L.*, наибольшее распространение приобрел вирус деформации крыла. Впервые в Республике Беларусь сотрудниками РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского» выделен вирус деформации крыла из тканей пчелы медоносной с использованием первично-трипсинизированной культуры клеток фибробластов эмбрионов кур и проведена его молекулярно-генетическая идентификация.

**Summary**

The complexity of diagnosing viral infections of bees is due to the lack of cultures of honeybee cells, collections of strains of viruses pathogenic for honeybees and test systems for molecular genetic identification.

Of all the viruses found in the honeybee *Apis mellifera L.*, the deformed wing virus has become the most common. For the first time in the Republic of Belarus, employees of the RUE «Institute of Experimental Veterinary Medicine named S.N. Vysheselsky» isolated a deformed wing virus from the tissues of a honeybee using a primary trypsinized culture of chicken embryo fibroblast cells and carried out its molecular genetic identification.

Поступила в редакцию 01.11.2018 г.

**ВВЕДЕНИЕ**

Одной из актуальных проблем пчеловодства всего мира в настоящее время являются вирусные заболевания пчёл. Из обнаруженных у медоносной пчелы *Apis mellif-*

*era L.* двадцати РНК-содержащих вирусов, которые в основном относятся к семействам *Dicistroviridae*, *Iflaviridae* и *Nodaviridae*, наибольшее распространение приобрел вирус деформации крыла – ВДК (defor-

med wing virus, DWV) [7].

Болезнь деформации крыла пчёл характеризуется появлением пчёл с уродливыми крыльями, одновременной гибелью куколок и молодых медоносных пчёл. Возбудитель болезни деформации крыла пчёл – довольно нестабильный икосаэдрический вирус диаметром 30 нм семейства *Iflaviridae*. В соответствии с *Baltimore Classification of Viruses*, ВДК относят к IV группе, или однонитевым РНК-вирусам, которые содержат одну одноцепочечную молекулу положительной (+) РНК [11].

Вирус культивируется в культурах клеток медоносной пчелы. Способность вируса деформации крыла пчёл к репродукции в культурах клеток млекопитающих и птиц изучена недостаточно.

Основными органами-мишенями ВДК служат репродуктивные органы и органы пищеварения пчел. Репликация вирусной РНК обнаружена в образцах биоматериала крыльев, головы, груди, ног, кишечника, в гемолимфе пчел. Вирусную РНК часто находят в телах нейронов, не исключают ее присутствия в глиальных клетках нервной ткани пчел. Сильную специфическую реакцию на ВДК регистрировали в цитоплазме и цитоплазматической мембране большинства клеток жирового тела пчелы [12].

ВДК возможно обнаружить на всех эмбриональных стадиях развития пчелы. В пчелиных семьях с явными признаками заболевания отмечают 100 % инфицированность взрослых рабочих пчел, 95 % – куколок, 80 % – личинок, 47 % – половозрелых трутней. Такая вариабельность вируса на разных стадиях развития пчелы, возможно, объясняется неодинаковой способностью к сопротивлению вирусной инфекции [12].

Болезнь деформации крыла пчёл часто протекает в латентной или субклинической форме. Появление клинических признаков у инфицированных куколок приводит либо к их гибели, либо к появлению взрослых особей с деформированными крыльями, укороченными брюшками, отсутствием пигментации. Такие пчелы становятся нежизнеспособными и, как правило, погибают. Пчелиные семьи, инфициро-

ванные ВДК, ослаблены из-за сильного сокращения продолжительности жизни рабочих пчел и гибели куколок. В погибших семьях обнаруживают большое количество рабочих пчел с деформированными крыльями. Количество рабочих пчел в улье с видимыми признаками ВДК может служить маркером последующей гибели семьи [1, 2, 7, 8, 13].

Известно, что ВДК отдалённо связан с пикорнавирусами человека [11], генетически тесно связан с вирусом *Varroa destructor-1* (VDV-1) [14]. Египетский пчелиный вирус (EBV) серологически связан с ВДК, однако он не вызывает известных симптомов у взрослых пчёл, куколок или личинок [14]. Отмечена высокая степень сходства ВДК и вируса, изолированного в Японии (*Kakugo*-вирус), именно этот изолят получил название «вирус деформации крыла» [13].

Несмотря на эволюционную близость с какуго вирусом (*Kakugo virus*), ВДК отличается от него по вирулентности, тропизму, клиническим проявлениям, географическому распределению.

Идентичность нуклеотидных последовательностей генома ВДК из разных географических районов составляет 98–99 % [9].

Согласно последним данным основным переносчиком ВДК служит клещ *Varroa destructor* [13], тесная ассоциация с клещом *V. destructor* способствовала его распространению в глобальных масштабах [7, 13].

Исследованиями разных коллективов ученых подтверждена большая распространенность ВДК у *Apis mellifera L.* в европейских странах. В Австрии и Франции при обследовании пасек ВДК найден в 91 и 97 % случаев, в Дании вирус выявлен на 57 % пасек; в Чехии – на 31 % [15]. Отмечено доминирование ВДК в большинстве регионов России и в Республике Азербайджан [7]. По данным Масленникова В.И. и др. (2018 г.) на территории Северного, Центрального и Южного федеральных округов европейской территории Российской Федерации выявлена тотальная (100 %) инфицированность пчёл вирусом

деформации крыла [5].

Некоторыми авторами отмечены сезонные различия в распространенности ВДК. Так, весной, летом, осенью инфицированность вирусом взрослых пчел составила 56, 66, 85 %, куколок – 16, 38, 54 % соответственно [13].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на базе РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», в отделе болезней птиц, пчел и физико-химических исследований и в отделе молекулярной биологии.

Для выделения DWV мы отбирали живых взрослых рабочих медоносных пчел и куколок, которые имели клинические признаки болезни (рисунки 1, 2).



**Рисунок 1. – Пчела с деформированными крыльями. Фото. Оригинал**



**Рисунок 2. – Пораженная вирусом деформации крыла куколка пчелы. Фото. Оригинал**

Учитывая тот факт, что геномная РНК DWV в довольно большом количестве выявлена методом гибридизации *in-situ* в зрительных и усиковых нейронах мозга [2, 6, 8, 12], в крыльях, груди, ногах, гемолимфе и жировом теле, а также в репродуктивных

органах и органах пищеварения медоносных пчел [1], в качестве источника вирусного материала мы использовали голову, грудь, ноги и крылья пчел с клиническим проявлением болезни (рисунок 3).

С целью предотвращения бактериального обсеменения материала микроорганизмами находящимися в кишечнике пчел, а также для препятствия воздействия ферментов на культуру клеток брюшко пораженных пчел удаляли асептически.



**Рисунок 3. – Фрагменты тела пчел, используемые для выделения вируса. Фото. Оригинал**

Исследуемый материал в течение 1 часа выдерживали в растворе Хенкса с добавлением антибиотиков в количестве 1000 ЕД бензилпенициллина натриевой соли и стрептомицина на 1 см<sup>3</sup> среды, после чего промывали стерильной дистиллированной водой.

Гомогенизацию материала проводили механическим способом с добавлением питательной среды Игла и ГЛА, в соотношении 1:1 из расчета 1 см<sup>3</sup> среды на четыре образца тканей насекомых или в соотношении 120:1 (по весу). Полученный гомогенизированный материал фильтровали через стерильный марлевый фильтр и использовали в дальнейшей работе в качестве нативного материала.

Полученный нативный материал разводили питательной средой Игла и ГЛА в соотношении 1:1 с содержанием 2 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) в 2 и 20 раз и использовали для заражения мо-

нослоя первично-трипсинизированной культуры фибробластов эмбрионов кур (ФЭК).

В качестве контроля, позволяющего отследить реакцию клеточной культуры на тканевой материал пчел, аналогичным образом готовили материал от заведомо здоровых пчел, отобранных из благополучной по данному заболеванию пасеки. Нативный материал разводили в 2 раза питательной средой Игла и ГЛА в соотношении 1:1 с содержанием 2 % ЭТС и использовали для заражения монослоя первично-трипсинизированной культуры ФЭК.

Получение первично-трипсинизированной культуры ФЭК осуществляли по общепринятой методике [3; 4, с. 100–101]. Для этого использовали развивающиеся куриные эмбрионы в возрасте 10 суток.

Культуральные матрасы со сформировавшимся полным монослоем ФЭК использовали для заражения вирусосодержащим материалом. Для этого сливали питательную среду, монослой клеток дважды промывали раствором Хенкса. В три матраса с культурой ФЭК вносили 1 см<sup>3</sup> разведенного в 2 раза вирусосодержащего материала (группа № 1), в три матраса – 1 см<sup>3</sup> вирусосодержащего материала, разведенного в 20 раз (группа № 2). Кроме этого, в три культуральных матраса с культурой ФЭК вносили 1 см<sup>3</sup> разведенного в 2 раза материала, полученного от заведомо здоровых пчел (контроль) и в три матраса – 1 см<sup>3</sup> поддерживающей питательной среды с содержанием 2 % ЭТС (контроль культуры клеток). После часа экспозиции в шейкер инкубаторе (Environmental Shaker-Incubator ES-20 (BIOSAN, EC)) (плюс 37 °С, 70 RPM) во все матрасы добавляли по 9 см<sup>3</sup> поддерживающей питательной среды с содержанием 2 % ЭТС. Таким образом конечное разведение вирусосодержащего материала в зараженных матрасах группы № 1 составило 1:20, в опытной группе № 2 – 1:200, контроль материала от заведомо здоровых пчел – 1:20.

Культуральные матрасы помещали в термостат при температуре плюс 37 °С и ежедневно просматривали их под микроскопом (Eclipse TS 100F/TS 100F LED (Ni-

con, Япония)).

При поражении не менее 80 % монослоя зараженные матрасы подвергали однократному замораживанию – оттаиванию, после чего собирали вирусосодержащую жидкость и осветляли центрифугированием при 770 g в течение 30 мин.

Контроль стерильности исследуемого материала проводили, используя следующие питательные среды: МПБ, МПА, МППБ и среду Сабуро.

Идентификацию DWV проводили, используя полимеразно-цепную реакцию (ПЦР).

Для обнаружения вируса деформации крыла пчел использовали следующее оборудование и материалы:

а) приборы и расходные материалы: ламинар, бытовой холодильник, термостат, микротермостат «BIOSAN-CH100» (Латвия), амплификатор «С 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США), центрифуги, паровые автоклавы, сухожаровые шкафы, микроцентрифуга высокоскоростная Jouan (Франция) (14000 об/мин), комплект автоматических пипеток «SOCOREX» (Швейцария) 0,1–2 мм<sup>3</sup>, 0,5–10 мм<sup>3</sup>, 20–200 мм<sup>3</sup>, 100–1000 мм<sup>3</sup>, 1–10 см<sup>3</sup> и наконечники к ним (с фильтрами и без фильтров), пробирки типа «эппендорф» вместимостью 0,5 и 1,5 см<sup>3</sup>, вортекс «BIOSAN» (Латвия), пробирки для ПЦР 0,2 см<sup>3</sup> для прибора «С 1000 Thermal Cycler», система для электрофореза «Consort», (Бельгия), Gel Doc XR и программа imageLab Software, BIO-RAD (США), весы RADWAG AS 220/X (Польша), система подготовки воды «Crystal B», ADRONA (Латвия), фильтрационная установка, весы аналитические.

б) реактивы: 5x ПЦР буфер для обратной транскриптазы (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»), рибонуклеазный ингибитор (Fermentas, Литва), Таг-полимераза с PCR буфером 10x (Праймтех), обратная транскриптаза (Fermentas, Литва), олигонуклеотиды (F-DWV, R-DWV), набор реагентов Supermix SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-RAD), 10x TE-буфер pH 8,0 (SIGMA), маркер молекулярного веса «GeneRuler 50

bp Ladder» (Fermentas, Литва), смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (10 мМ) (Fermentas, Литва), агароза (Helicon, Россия), бромистый этидий (SIGMA, США), буфер для нанесения проб; стерильная деионизированная вода.

Для обнаружения генома вируса деформации крыла пчел была подобрана пара праймеров. Подбор праймеров осуществляли по базам данных национального центра биотехнологической информации – GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Множественное нуклеотидное выравнивание проводили с помощью программы AlignX. Специфичность подобранных праймеров проверяли программой BLAST. Были подобраны специфичные праймеры к гену полипротеина вируса деформации крыла пчел. Ориентировочные температуры плавления праймеров рассчитывали по формуле (1).

$$Tm = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T), \quad (1)$$

где

$Tm$  – температура плавления;

$G$  – гуанин;

$C$  – цитозин;

$A$  – аденин;

$T$  – тимин.

Выделение РНК проводили российским набором «АмплиПрайм РИБО-сорб» согласно инструкции по его применению.

Аmplификацию проводили по следующей схеме: 1 цикл: 3 мин – 95 °С; 30 циклов: 0,3 мин – 95 °С; 0,3 мин – 55 °С; 0,3 мин – 72 °С.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Формирование плотного монослоя ФЭК происходило на вторые сутки после высева клеток в матрасы (рисунок 4).

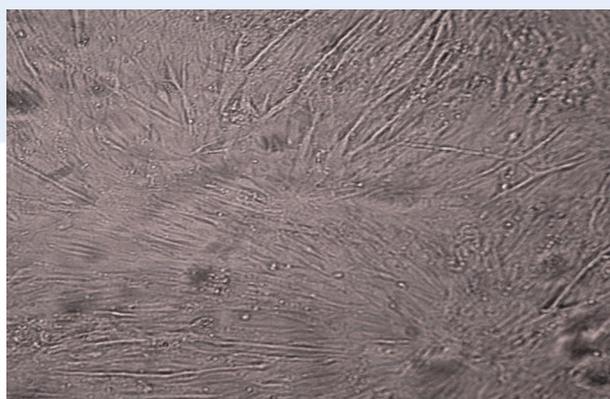
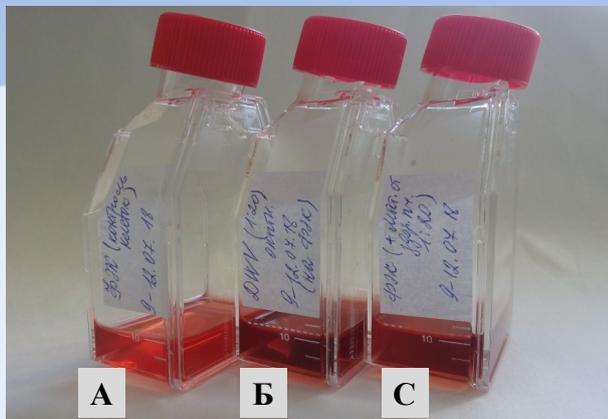


Рисунок 4. – Первично-трипсинизированная культура клеток фибробластов эмбрионов кур (×100) Фото. Оригинал

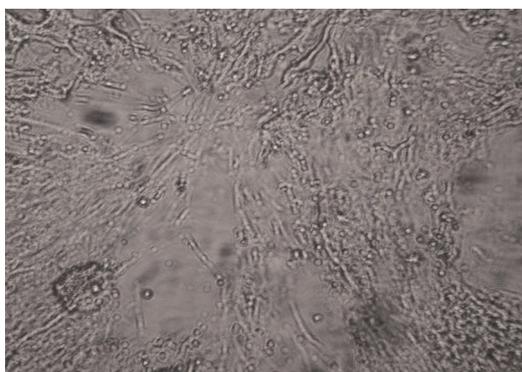
Первые признаки предположительно ЦПД вируса наблюдались через 48–52 часа с момента заражения в виде округления клеток и появления в их цитоплазме мелкой зернистости (поражение монослоя составило не более 10 %), питательная среда оставалась прозрачной, ее цвет соответствовал цвету среды в контрольных матрасах – красный с желтоватым оттенком. Через 72 часа после заражения клеточного монослоя признаки отслоения клеток от субстрата отсутствовали, питательная среда во всех матрасах оставалась прозрачной, красного цвета с желтоватым оттенком, количество округлых клеток с мелкой зернисто-

стью в их цитоплазме составило около 20 %. Через 80 часов после заражения культуры ФЭК культуральная питательная среда в зараженных матрасах сохраняла свою прозрачность, но приобретала оттенок жженого сахара; в матрасах, в которые вносили материал от здоровых пчел, также наблюдали изменение цвета питательной среды, но менее интенсивно. В контрольных матрасах (контроль культуры клеток) питательная среда была прозрачная, красно-желтого цвета (рисунок 5). При микроскопическом исследовании монослоя во всех зараженных матрасах наблюдали следующие изменения: в монослое отмечали

небольшие «стерильные» участки (участки без клеток), которые были окружены клетками округлой формы (поражение монослоя составляло 30–40 %) (рисунок 6), клетки монослоя (80 %) содержали в своей цитоплазме мелкую зернистость.



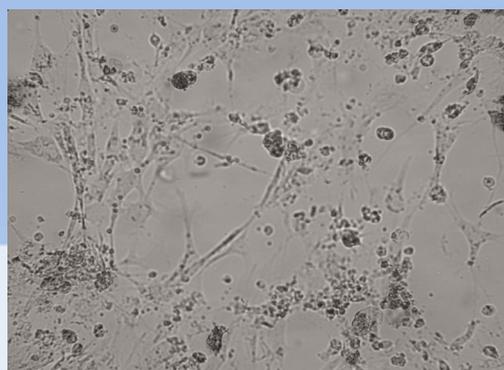
**Рисунок 5. – Изменение цвета питательной среды (рН 7,2–7,4):**  
**А – матрас с культурой ФЭК (контроль клеток); В – матрас, зараженный DWV с конечной концентрацией вирусодержащего материала 1:20;**  
**С – матрас с культурой клеток, содержащий материал от заведомо здоровых пчел с конечной концентрацией 1:20**



**Рисунок 6. – Первично-трипсинизированная культура клеток фибробластов эмбрионов кур (опытные матрасы) (×100) Фото. Оригинал**

Через 96 часов с момента заражения наблюдалось поражение монослоя не менее 80 % с большими очагами отслоения клеток, в некоторых местах в виде пленочек, которые одним краем были прикреплены к субстрату (рисунок 7). Зараженные матра-

сы подвергали замораживанию при температуре минус 20 °С.



**Рисунок 7. – Первично-трипсинизированная культура клеток фибробластов эмбрионов кур (опытные матрасы) (×100). Фото. Оригинал**

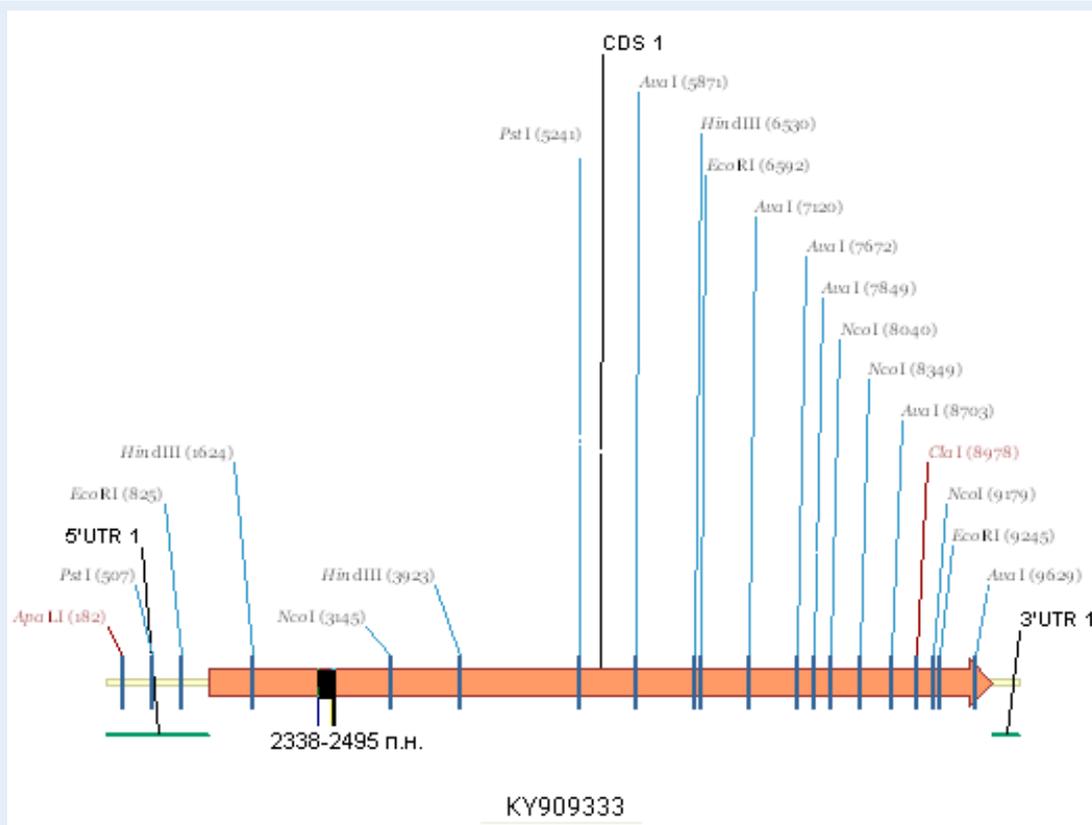
В контрольных матрасах монослой оставался полным и ровным, без признаков клеточной дегенерации, питательная среда сохраняла свою прозрачность, однако, как уже отмечалось выше, в контрольных матрасах, в которые вносили материал от заведомо здоровых пчел, наблюдалось изменение цвета питательной среды.

Полученный в результате культивирования в первично-трипсинизированной культуре ФЭК материал признан стерильным: в течение 10 суток после высева исследуемого материала на питательные среды МПА, МПБ, МППБ (температура инкубации плюс 37 °С), а также на среду Сабу-ро (плюс (22±2) °С) роста микроорганизмов не наблюдалось.

Для идентификации выделенного вирусного материала методом ПЦР были подобраны праймеры к участку генома DWV, кодирующего структурный полипротеин и фланкирующие участок 2338-2495 штамма KY909333 [10] длиной 158 п.н. (рисунки 8, 9).

Длина прямого и обратного праймеров составила 21 нуклеотид, температура плавления плюс 62 °С, GC – содержание – 47,6 %.

При подборе праймеров учитывались следующие критерии: они не должны образовывать шпилек и димеров, не должны быть комплиментарны к вирусам и бактериям, циркулирующим у пчел.



**Рисунок 8. – Фрагмент генома изолята вируса деформации крыла, кодирующего структурный полипротеин, в позиции 2338-2495 п.н.**

```

2301  CСAТAТAAGC AТGТТТAТCС AТТТТТAСCГ AСAAGAAТTГ TGCСAGATТG GACTACTGGC AТТТТAГAТA TGGGTGCTТT GAACATTCGT GTAATТGCTC
GGTATATTCG TACAАAТAGG TAAAAATGGC TGTТCТTAAС AСGGTCTAAC CTGATGACCG TAAAAТCТAТ ACCCACAАA СТТGTAAGCA CATTAAСGAG
2401  CСТTACGGAT GAGTGCTACT GGTGCAACTA CСТGTAATGT CGTCGTGТTТ AТTAAATTAА ATAACAGCGA GTTTACAGGG ACTTCTCTCG GTAAGТТТTА
GGAATGCCTA CTCACGATGA CCACGTТGAT GGACATTACA GCAGCACAАА TAAТТTAAТT TATТGTCGCT CAAATGTCCC TGAAGAAGAC CATTCAAAAT
    
```

**Рисунок 9. – Фрагмент генома штамма KY909333 длиной 158 п.н.**

Подобранные последовательности праймеров дополнительно тестировали на специфичность в программе BLAST с последовательностями всех имеющихся полных геномов вирусов деформации крыла пчел (рисунки 10, 11) и проводили нуклеотидное выравнивание при помощи программы Align (рисунок 12).

Подобранные праймеры комплементарны к нуклеотидным последовательностям штаммов вирусов деформации крыла пчел (не менее чем к 50 штаммам), представленных в базе GeneBank – Национального института здоровья США EMBL – Европейской молекулярно-биологической лаборатории NSBI – Национального центра биотехнологической информации США.

Критерием точного и специфического

обнаружения нуклеиновой кислоты искомого вируса считали, если олигонуклеотид на всей своей протяженности полностью комплементарен искомой части генома и не имеет ошибок, при этом показатели идентичности (Ident) на всей протяженности запроса (Query cover) программы BLAST праймера равны 100 %.

На рисунках 10 и 11 видна 100 % идентичность праймеров (Ident) на всей протяженности (Query cover). Также по результатам множественного выравнивания 18-ти нуклеотидных последовательностей, наиболее отличных между собой, с помощью программы Align мы подтвердили общие видоспецифические участки подобранных праймеров.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Deformed wing virus strain Liaoning-1, complete genome</a>	42.1	204	100%	2e-06	100%	<a href="#">MF770715.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate Vespa crabro DWV PI 2016, complete genome</a>	42.1	263	100%	2e-06	100%	<a href="#">KY909333.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate 85-DWV, complete genome</a>	42.1	281	100%	2e-06	100%	<a href="#">KX373899.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus strain Korea-2, complete genome</a>	42.1	296	100%	2e-06	100%	<a href="#">JX878305.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus strain Korea-1, complete genome</a>	42.1	234	100%	2e-06	100%	<a href="#">JX878304.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus strain SJ structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">JX878286.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus strain GR structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">JX878285.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus strain DG structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">JX878284.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus strain HS1 structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">JX878281.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus strain GS1 structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">JX878280.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus strain CA structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">JX878279.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus strain GN structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">JX878277.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus strain ES structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">JX878275.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus strain NW structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">JX878274.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus strain YD structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">JX878273.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus strain GW structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">JX878272.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate Chilensis A1, complete genome</a>	42.1	234	100%	2e-06	100%	<a href="#">JQ413340.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus clone 2kb-3end-No66-DWV polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	230	100%	2e-06	100%	<a href="#">HM162356.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus clone 5end-6kb-No4-DWV polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	208	100%	2e-06	100%	<a href="#">HM162355.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate R4LY P1R1+ truncated structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">GU903475.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate R4LY 142 structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">GU903474.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate R4LY 126 truncated structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">GU903473.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate R4LY 120 structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">GU903472.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate R4LY 105 structural polyprotein-like gene, partial sequence</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">GU903471.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate R4LY 63 structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">GU903470.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate R4LY 61 truncated structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">GU903469.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate R4LY 20 structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">GU903468.1</a>

**Рисунок 10. – Результаты тестирования прямого праймера F-DWV в программе BLAST**

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Deformed wing virus strain Liaoning-1, complete genome</a>	42.1	273	100%	2e-06	100%	<a href="#">MF770715.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate Vespa crabro DWV PI 2016, complete genome</a>	42.1	257	100%	2e-06	100%	<a href="#">KY909333.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate 85-DWV, complete genome</a>	42.1	226	100%	2e-06	100%	<a href="#">KX373899.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate DWV4_16.90.1 polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">KC138852.2</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate DWV3_24.51.17 polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">KC138854.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus VP3 gene for capsid protein VP3, partial cds, isolate: China-Acc2_dwv</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">AB721547.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus VP3 gene for capsid protein VP3, partial cds, isolate: China-Acc1_dwv</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">AB721546.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus gene for polyprotein, partial cds, isolate: China-8_dwv</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">AB721543.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus VP3 gene for capsid protein VP3, partial cds, isolate: China-7_dwv</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">AB721542.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus VP3 gene for capsid protein VP3, partial cds, isolate: China-6_dwv</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">AB721541.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus VP3 gene for capsid protein VP3, partial cds, isolate: China-5_dwv</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">AB721540.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus VP3 gene for capsid protein VP3, partial cds, isolate: China-4_dwv</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">AB721539.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus VP3 gene for capsid protein VP3, partial cds, isolate: China-3_dwv</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">AB721538.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus gene for polyprotein, partial cds, isolate: China-2_dwv</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">AB721537.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus gene for polyprotein, partial cds, isolate: China-1_dwv</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">AB721536.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus clone 2kb-3end-No66-DWV polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	195	100%	2e-06	100%	<a href="#">HM162356.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus clone 5end-6kb-No4-DWV polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	165	100%	2e-06	100%	<a href="#">HM162355.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate R4LY 126 truncated structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">GU903473.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate R4LY 120 structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">GU903472.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate R4LY 105 structural polyprotein-like gene, partial sequence</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">GU903471.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate R4LY 20 structural polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">GU903468.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate Warwick-2009 polyprotein gene, complete cds</a>	42.1	228	100%	2e-06	100%	<a href="#">GU109335.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate AMDWV1-Russia polyprotein gene, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">GQ422786.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate 12-1D nonfunctional polyprotein gene, partial sequence</a>	42.1	56.5	100%	2e-06	100%	<a href="#">EU779939.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate 7D nonfunctional polyprotein gene, partial sequence</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">EU779938.1</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate CANADA-2 polyprotein genes, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">DQ224311.2</a>
<a href="#">Deformed wing virus isolate CANADA-1 polyprotein genes, partial cds</a>	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	<a href="#">DQ224310.2</a>

**Рисунок 11 – Результаты тестирования обратного праймера в R-DWV в программе BLAST**



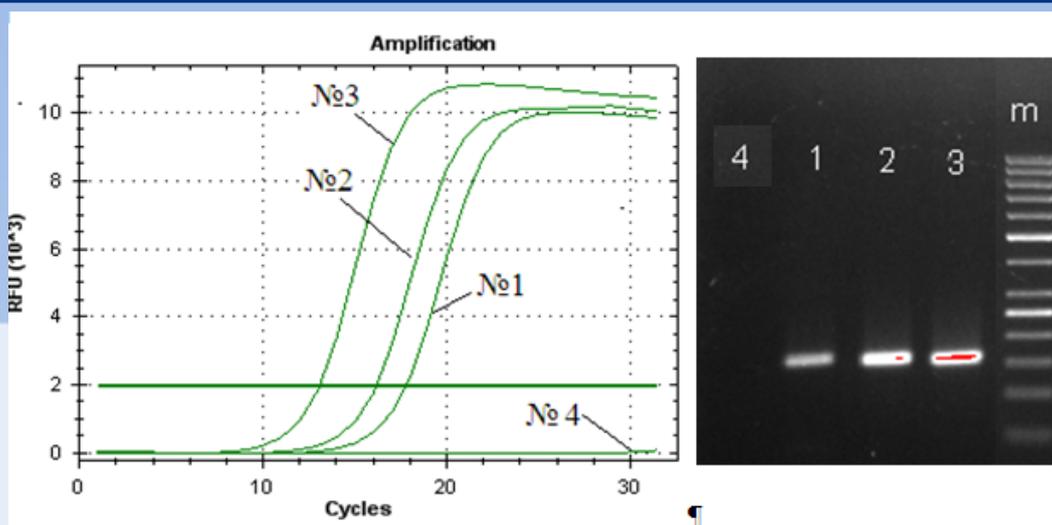
**Рисунок 12. – Мультиплексный анализ прямого F-DWV и обратного R-DWV праймеров с помощью программы Align**

Методом ПЦР провели исследование проб вирусосодержащего материала, полученного от пчел с признаками вирусной деформации крыльев до культивирования в культуре фибробластов развивающихся куриных эмбрионов (нативный материал), а также исследование проб вирусосодержащего материала после культивирования в культуре куриных фибробластов (группа № 1 и группа № 2).

В пробе № 1 флуоресцентный сигнал пересекал черту фонового уровня на 17,75 цикле, № 2 – 16,4 цикле, № 3 – 13,06 цикле. На рисунке 13 видна положительная динамика накопления вируса в культуре фибробластов из развивающихся куриных эмбрионов. Так, по сравнению с вирусным материалом, полученным непосредственно от пчел, в вирусном материале после культивирования в культуре фибробластов куриных эмбрионов наблюдалось увеличение концентрации вируса в 1,9 и 7,4 раза (зараженные матрасы группы № 1 и № 2 со-

ответственно). Это может говорить об успешной изоляции вируса в данной культуре клеток.

В дальнейшем наши исследования будут направлены на адаптацию изолята вируса деформации крыла пчел к культуре фибробластов из развивающихся эмбрионов кур, отработку методов определения титра вируса с использованием данной системы культивирования, изучение его биологических и физико-химических свойств с последующим депонированием штамма вируса в коллекции культур микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Полученный штамм DWV будет использован как стандарт для положительного контроля, с возможностью контроля вирусной нагрузки у пчел на пчелопасеках, в продуктах и материалах пчеловодства, а также при разработке средств лечения и профилактики вирусной деформации крыла у пчел.



№ 1 – разведение 1:200; № 2 – разведение 1:20; № 3 – нативный материал;  
 № 4 – отрицательный контрольный образец

**Рисунок 13. – Обнаружение продуктов амплификации проб исследуемых методом ПЦР для обнаружения РНК-вируса деформации крыла пчел**

### ВЫВОДЫ

1. Впервые Республике Беларусь изолирован вирус деформации крыла из тканей медоносной пчелы с использованием гетерологичной системы культивирования – первично-трипсинизированной культуры фибробластов эмбрионов кур.
2. Проведена молекулярно-генетиче-

ская идентификация выделенного вируса.

3. Проведен скрининг нуклеотидных последовательностей гена, структурного полипротеина, различных штаммов вируса деформации крыла пчел. Подобраны специфичные праймеры для детекции в ПЦР генома вируса деформации крыла пчел.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Вирусные заболевания пчёл [Электронный ресурс] / Белорусское сельское хозяйство. – Режим доступа: <http://agriculture.by/articles/zivotnovodstvo/virusnye-zabolevaniya-pchel>. – Дата доступа: 2.08.2018.
2. Вирусные заболевания пчёл [Электронный ресурс] / Пасека. – Режим доступа: <http://paseka.on.kg/topic/767-virusnie-zabolevaniya-pchel>. – Дата доступа: 2.08.2018.
3. Жавненко, В.М. Практикум по вирусологии: учеб. пособие / В.М. Жавненко, В.Н. Алешкевич, В.И. Науменков; под. ред. В.М. Жавненко. – Минск: Дизайн ПРО, 1998. – 144 с.
4. Ляски, З. Диагностика вирусных болезней животных = Diagnostyka Wirusologiczna Chorob Zwierzat: монография / З. Ляски; пер. с пол. Т.Г. Орлова, Я.С. Ляндесберг; ред. и предисл. В.Н. Сюрин. – М.: Колос, 1980. – 400 с.
5. В.И. Оценка вирусной и клещевой нагрузки на пчелиные семьи в России в связи с массовой гибелью пчел / В.И. Масленникова [и др.] // материалы XXII Международного конгресса «Апиславия»: , 9 – сент. / ЛАБ ПРИНТ. – М., 2018. – С. 67–68.
6. Состояние пчеловодства в России: проблемы и перспективы развития [Электронный ресурс] / Мир пчеловодства. – Режим доступа: [www.apeworld.ru](http://www.apeworld.ru). – Дата доступа: 02.08.2018.
7. Спрыгин, А.В. Угрозы распространения вирусных инфекций у пчел (*Apis mellifera* L.) и роль клеща *Varroa Destructor* в развитии патологий / А.В. Спрыгин [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51, № 2. – С. 156–171.
8. De Miranda, J.R. Deformed wing virus / J.R. de Miranda, E. Genersch // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2010. – Vol. 103. – P. 48–61.
9. Berenyi, O. Phylogenetic analysis of deformed wing virus genotypes from diverse geographic origins indicates recent global distribution of the virus / O. Berenyi [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – Vol. 73, № 11. – P. 3605–3611.

10. Complete Genome Sequence of Deformed Wing Virus Isolated from *Vespa crabro* in Italy [electronic resource] / PubMed. – Mode of access: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). – Date of access: 6.08.2018.
11. Lanzi, G. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.) / G. Lanzi [et al.] // *J. Virol.* – 2006. – Vol. 80, № 10. – P. 4998–5009.
12. Localization of deformed wing virus (DWV) in the brains of the honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus / K. S. Shah [et al.] // *Virology Journal.* – 2009. – P. 6–182.
13. Nielsen, S.L. Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark / S.L. Nielsen, M. Nicolaisen, P. Kryger // *Apidologie.* – 2008. – Vol. 39. – P. 310–314.
14. Standard methods for virus research in *Apis mellifera* / de Miranda [et al.] // *Journal of Apicultural Research.* – 2013. – Vol. 52, № 4. – 57 p.
15. Tentcheva, D. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France / D. Tentcheva [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, № 12. – P. 7185–7191.
16. Yue, C. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honey bees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*) / C. Yue, E. Genersch // *Journal of General Virology.* – 2005. – Vol. 86. – P. 3419–3424.

УДК 619:579.843.95-078

Красникова Е.Л., научный сотрудник  
 Андруевич А.С., кандидат ветеринарных наук  
 Мальчик О.В., научный сотрудник  
 Стрельчя И.И., кандидат ветеринарных наук

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

### ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ MULTIPLEX ПЦР *PASTEURELLA MULTOCIDA* А, В, D ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СЕРОВАРИАНТОВ ПАСТЕРЕЛЛ

#### Резюме

В статье представлены данные по определению специфичности и чувствительности multiplex ПЦР тест-системы для диагностики *Pasteurella multocida* серовариантов А, В, D. Проведены исследования по изучению влияния неспецифической ДНК на амплифицируемость специфических продуктов, изучена взаимоспецифичность праймеров для серовариантов А, В, D, а также образование неспецифических фрагментов без и в присутствии специфической ДНК. Установлен порог выявляемости ДНК для каждого сероварианта *Pasteurella multocida* в мультиплекс системе.

#### Summary

Data on determination of specificity and sensitivity of multiplex PTsR of test system for diagnostics of *Pasteurella multocida* of serovariant of A, B, D are presented in article. Researches on studying of influence of nonspecific DNA on an amplifitsiryemost of specific products are conducted, the mutually specificity of primers for serovariant of A, B, D and also formation of nespetsifichesy fragments without and in the presence of specific DNA is studied. The threshold of detectability of DNA for each *Pasteurella multocida* serovariant in a multiplex is established to system.

Поступила в редакцию 24.10.2018 г.

#### ВВЕДЕНИЕ

Пастереллез – заболевание животных и птиц, опасное и для людей, распространенное во всем мире. Экономический ущерб от пастереллеза складывается из потерь от падежа, вынужденного убоя больных животных и затрат на проведение оздо-

ровительных и профилактических мероприятий. Летальность при этой болезни составляет от 10 до 75 %.

Результаты исследований, проводимых в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», и анализ ветеринарной отчетности Главного

управления ветеринарии Минсельхозпрода Республики Беларусь показали, что пастереллез свиней (7,9 %) занимает третье место после сальмонеллеза (11,15 %) и колибактериоза (8,32 %). В плане проводимых противоэпизоотических мероприятий пастереллез занимает четвертое место (596 565 вакцинаций) после рожи свиней (2 352 849), сальмонеллеза (890 612), лептоспироза (794 198) соответственно. Количество зарегистрированных неблагополучных пунктов по пастереллезу за отчетный период составило 64 хозяйства.

В животноводстве ситуация по пастереллезу так же остается весьма напряженной. Пастереллез возникает среди телят 1–6-месячного возраста с охватом до 70 % и более поголовья. Ежегодно выявляются от 7,1 до 13,6 % неблагополучных пунктов по пастереллезу крупного рогатого скота. У пушных зверей заболеваемость пастереллезом достигает 42 % [1, 2].

Возбудитель болезни относится к роду *Pasteurella*. Все пастереллы являются паразитами или комменсалами на слизистых оболочках верхних дыхательных путей и пищеварительного тракта. Пастереллы часто являются возбудителями вторичных инфекций [3, 4].

Возбудитель болезни неоднороден в антигенном отношении. Выделяют 5 серовариантов *Pasteurella multocida* по капсульному антигену, которые обозначаются заглавными латинскими буквами А, В, D, Е, F, и 16 серовариантов по соматическому антигену, обозначаемых арабскими цифрами от 1 до 16 [3, 4, 5]. Широкое распространение пастереллоносительства, циркуляция слабовирулентных штаммов *Pasteurella multocida* обуславливают актуальность решения проблемы проведения эффективной диагностики пастереллеза.

Бактериологический метод диагностики на основании изучения биохимических свойств бактерий и определения их патогенности для белых мышей не позволяет проводить типирование пастерелл по серовариантам.

Наиболее современным методом, позволяющим идентифицировать микроорга-

низмы за сравнительно короткий промежуток времени, считается ПЦР (полимеразная цепная реакция). Относительная простота исполнения сделали метод ПЦР незаменимым для решения различных задач клинической диагностики, таких как прямое обнаружение и идентификация возбудителей заболеваний, молекулярное типирование и исследование свойств патогенных микроорганизмов. Определение серовариантов возбудителя пастереллеза животных является обоснованием для использования вакцин, включающих конкретный серовариант *Pasteurella multocida* [1, 6].

**Цель работы** – определить чувствительность и специфичность сконструированной мультиплекс ПЦР системы, выявляющей *Pasteurella multocida* и ее серовариантную принадлежность.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе были использованы следующие материалы: изоляты пастерелл из хозяйств РБ, выделенные в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» в период с 2014 по 2017 гг., штаммы бактерий, присутствующих в коллекции музея института *Pasteurella multocida* КМИЭВ 67, *E. coli*, *Pasteurella multocida* КМИЭВ 68, *Salmonella dublin*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis*, *Pasteurella multocida* КМИЭВ 69, *Pasteurella canis*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Actinobacillus seminis*, *Lactobacillus acidophilus*, тест-система для обнаружения и определения серовариантной принадлежности *Pasteurella multocida* (А, В, D) в полимеразной цепной реакции «Multiplex ПЦР *Pasteurella multocida* (А, В, D)». Сконструированная система содержала 4 пары праймеров, специфичных для *Pasteurella multocida*, в том числе серовариантов А, В, D. Для выявления *Pasteurella multocida* использовались праймеры к участку 23 sRNA, размер амплифицируемого продукта 460 п.н., для выявления *Pasteurella multocida* сероварианта А использовались праймеры, амплифицирующие Нуас\_Hiad область генома, содержащую участок гена, кодирую-

щего гиалуронат синтазу, и участок гена, кодирующего UDP глюкоза-6 – дегидрогеназу, размер амплифицируемого продукта 1044 п.н., для выявления *Pasteurella multocida* сероварианта В использовались праймеры, кодирующие участок гена *bcbD*, размер амплифицируемого продукта 760 п.н, для выявления *Pasteurella multocida* сероварианта Д использовались праймеры, кодирующие участок гена *dcb F*, кодирующего гликозилтрансферазу, размер амплифицируемого продукта 657 п.н.

Выделение ДНК проводили согласно инструкции к набору ДНК-ВК (ИБОХ НАНБ, Минск). ПЦР проводили в объеме 25 мкл, амплификационная смесь включала в себя 10х PCR буфер для Taq ДНК-полимеразы, 2 ЕД термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимераза, 5 ед/мкл) (ОДО Праймтех, Минск); смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (25 мМ), 2,5 мМ раствора

MgCl<sub>2</sub> (50 мМ); праймеры по 0,2 мМ каждого, буфер для нанесения проб; стерильную деионизированную воду.

Амплификацию осуществляли на амплификаторе «С 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США), используя следующую программу амплификации: 95<sup>0</sup> – 5 минут, 30 циклов – 95<sup>0</sup> – 1 минута, 55<sup>0</sup> – 1 минута, 72<sup>0</sup> – 1 минута, затем 72<sup>0</sup> – 7 минут. Результаты ПЦР реакции регистрировали путем проведения 30-минутного электрофореза полученных амплификатов в 2 % агарозном геле. Визуализацию результатов осуществляли при помощи прибора Gel Doc XR, BIO-RAD (США).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На первом этапе нами оценивалась специфичность общих праймеров, позволяющих проводить синтез фрагмента, характерного для *Pasteurella multocida*.

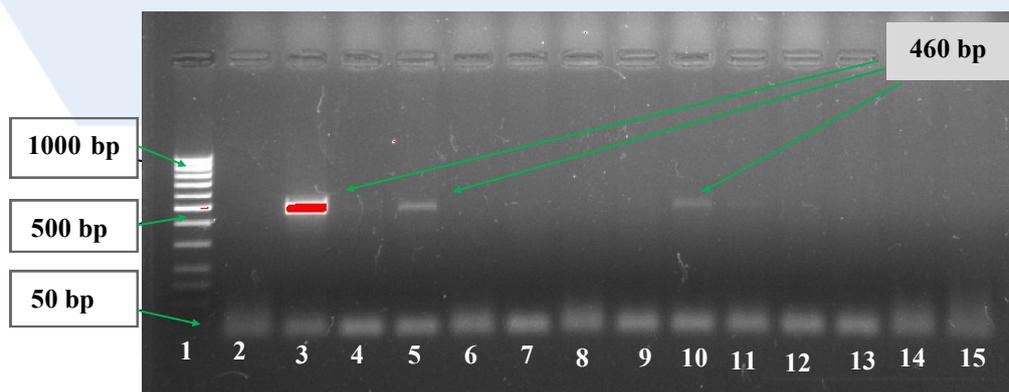


Рисунок 1. – Результат электрофоретического разделения продуктов PCR с общими праймерами (соответственно слева направо):

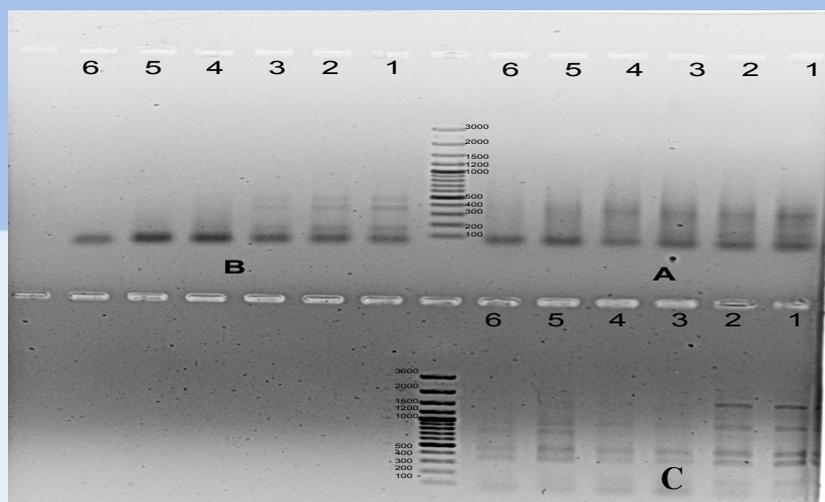
- 1 – Маркер молекулярного веса; 2 – Отрицательный контроль;  
 3 – *Pasteurella multocida* КМИЭВ 67; 4 – *E. Coli*; 5 – *Pasteurella multocida* КМИЭВ 68;  
 6 – *Salmonella Dublin*; 7 – *Salmonella typhimurium*; 8 – *Salmonella enteritidis*;  
 9 – *Salmonella cholerasuis*; 10 – *Pasteurella multocida* КМИЭВ 69; 11 – *Pasteurella canis*;  
 12 – *Klebsiella*; 13 – *Proteus*; 14 – *Actinobacillus seminis*; 15 – *Lactobacillus acidophilus*

Как видно из представленных на рисунке 1 результатов, общевидовые праймеры к участку 23 sRNA являются специфичными только для бактерий вида *Pasteurella multocida*. Они позволяют проводить синтез фрагмента ДНК, характерного только для вышеуказанных бактерий. Таким образом, по наличию наработанного продукта реакции при PCR с общими праймерами можно судить о присутствии *Pasteurella multocida*

в пробах ДНК, выделенных из различного материала.

Затем разрабатываемая ПЦР система была протестирована на возможность образования неспецифичных продуктов амплификации при использовании чужеродных образцов ДНК. В качестве таких образцов в реакционные смеси были добавлены геномные ДНК человека, быка и *E. coli*. Каждая ПЦР проба содержала 24 нг одного из

видов чужеродной ДНК. Реакции амплификации были проведены при диапазоне температуры отжига 50–58,4 °С.



**Рисунок 2. – Электрофорез продуктов амплификации при использовании ПЦР системы по определению серовариантов *Pasteurella multocida* в присутствии образцов геномной ДНК человека (А), быка (В) и *E. coli* (С). Дорожки 1–6 – использование различной температуры отжига праймеров: 1 – 50 °С; 2 – 50,5 °С; 3 – 51,7 °С; 4 – 53,2 °С; 5 – 55,5 °С; 6 – 58,4 °С**

Как видно из рисунка 2, при использовании геномных ДНК человека и быка образование неспецифичных продуктов амплификации прекращается при повышении температуры отжига до 57 °С. При использовании геномной ДНК *E. coli* количество неспецифичных ПЦР продуктов снижается при повышении температуры отжига, но не исчезает полностью. Было предположено, что данные неспецифичные продукты ПЦР исчезнут при добавлении в реакционную смесь целевой ДНК *Pasteurella multocida*. Для подтверждения данного предположения были проведены реакции ПЦР, где к геномным ДНК пастерелл была добавлена ДНК *E. coli* (10 нг на реакцию). Результаты оце-

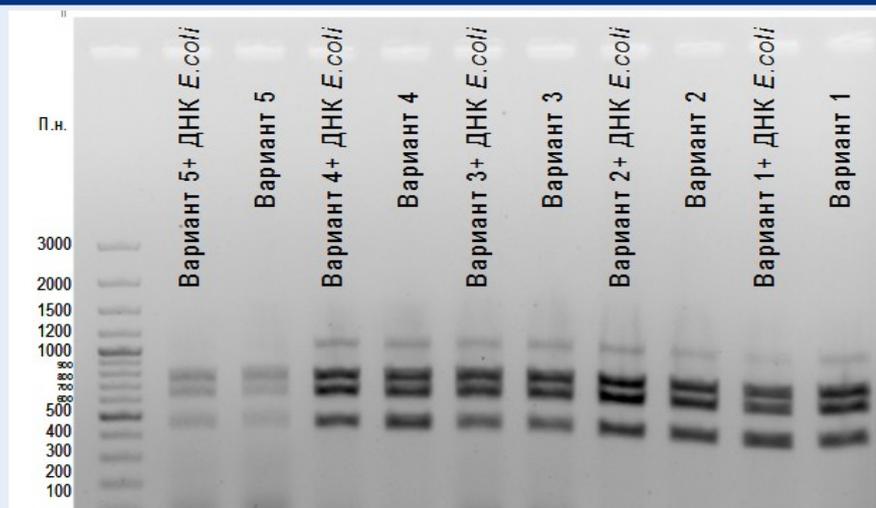
нивали по наличию/отсутствию специфической полосы в агарозном геле на уровне 460 пар нуклеотидов.

Согласно полученным данным (рисунок 3), наличие в реакционной смеси минимальных количеств целевой ДНК пастерелл препятствует образованию неспецифичных ампликонов геномной ДНК *E. coli*.

Для определения пороговых значений концентраций геномной ДНК пастерелл, при которых разрабатываемая ПЦР система способна детектировать *Pasteurella multocida* серовариантов А, В, D, был проведен эксперимент с использованием различных концентраций ДНК пастерелл в пробах (таблица 1).

**Таблица 1. – Варианты количественного соотношения геномной ДНК пастерелл разных серовариантов при пробоподготовке**

<i>Pasteurella multocida</i>	Варианты соотношения количества геномной ДНК				
	1	2	3	4	5
Серовариант А, нг	20	15	10	5	1
Серовариант В, нг	20	15	10	5	1
Серовариант D, нг	20	15	10	5	1



**Рисунок 3. – Электрофорез продуктов амплификации при использовании ПЦР системы по определению серовариантов *Pasteurella multocida* при различных количественных соотношениях геномной ДНК пастерелл серовариантов А, В и D**

Как видно на рисунке 3, чувствительность ПЦР системы составляет 1 нг для серовариантов В и D и 5 нг для сероварианта А.

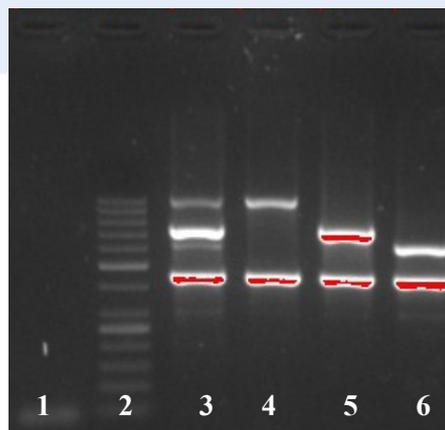
Оценку взаимоспецифичности идентификации пастерелл по серовариантной принадлежности проводили на ранее выделенных из патологического материала отделом ветеринарных технологий и паспортизированных на основании культурально-морфологических, биохимических, тинкториальных, серологических и биологических свойств 3 штаммах, депонированных в музее РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» как:

- штамм *Pasteurella multocida* серовариант А (КМИЭВ-67);
- штамм *Pasteurella multocida* серовариант В (КМИЭВ-68);
- штамм *Pasteurella multocida* серовариант D (КМИЭВ-69).

Данные штаммы используются для производства вакцин.

Из результатов электрофоретического разделения продуктов проведенных multiplex PCR (рисунок 4) видно, что штамм КМИЭВ-67 идентифицирован как *Pasteurella multocida* серовариант А, штамм КМИЭВ-68 идентифицирован как *Pasteurella multocida* серовариант В, а штамм КМИЭВ-69 идентифицирован как *Pasteurella multocida* серовариант D. Это не про-

тиворечит результатам более ранней идентификации бактерий по культурально-морфологическим, биохимическим, тинкториальным, серологическим и биологическим свойствам.



**Рисунок 4. – Электрофоретическая детекция продуктов амплификации проб, исследованных тест-системой для обнаружения ДНК возбудителей пастереллеза:**

- 1 – отрицательный контрольный образец;
- 2 – маркер молекулярного веса;
- 3 – Р+ – положительный мультиплекс-контроль (сверху вниз: *Pasteurella multocida* серовариант А – 1055 п.н.; В – 760 п.н.; D – 657 п.н. *Pasteurella multocida*),
- штамм *Pasteurella multocida* серовариант А (КМИЭВ-67),
- штамм *Pasteurella multocida* серовариант В (КМИЭВ-68);
- 6 – штамм *Pasteurella multocida* серовариант D (КМИЭВ-69)

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Разрабатываемая тест-система специфична для бактерий *Pasteurella multocida*.
2. Тест-система содержит 4 пары праймеров и позволяет определять серовариантную принадлежность *Pasteurella multocida* в рамках серовариантов А, В, D.
3. Попадание неспецифической ДНК в количестве до 24 нг предполагает образо-

вание неспецифических фрагментов при отсутствии ДНК *Pasteurella multocida*, а также температурах отжига менее 55,5 °С.

4. Присутствие ДНК *Pasteurella multocida* ингибирует образование неспецифических фрагментов *E. coli* и выявляет ДНК *Pasteurella multocida* в количестве 1 нг для серовариантов В и D и 5 нг для сероварианта А.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Леммиш, А.П., Финогенов, А.Ю., Андрусевич, А.С. [и др.] Генотипирование штаммов серовариантов *Pasteurella multocida* методом полимеразной цепной реакции / А.П. Леммиш, А.Ю. Финогенов, А.С. Андрусевич [и др.] // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – 2011. – № 3. – С. 14–19.
2. Андрусевич, А.С. Пастереллез пушных зверей (этиологическая структура и специфическая профилактика): дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / А.С. Андрусевич. – Мн., 2008. – 154 с.
3. Ставцева, Л.Я. Серологические методы для выявления капсульных антигенов пастерелл / Л.Я. Ставцева, Т.Е. Попова // Науч. основы пр-ва вет. биол. препаратов / ВНИИ защиты животных. – Щелково, 2000. – С. 255–257.
4. Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review / P.J. Blackall, J.K. Mifflin // Avian Pathol. – 2000. – Vol. 29. – P. 271–287.
5. Dabo, S.M., Taylor, J.D., Confer, A.W. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease // Animal Health Research Reviews. – 2008. V. 8(2). – P. 129–150.
6. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70 / B.J. May [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98. – P. 3460–3465.

**"БЕЛМИКСОВАК"**  
**ВАКЦИНА ЖИВАЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ**  
**МИКСОМАТОЗА КРОЛИКОВ**

- Вакцина изготовлена на основе живого штамма «КМИЭВ-V141» вируса миксомы кроликов, выращенного в перевиваемой культуре клеток CV-1, и представляет собой однородную сухую пористую массу в виде таблетки желтовато-белого цвета
- Вакцину применяют для активной иммунизации кроликов весной до появления основных переносчиков возбудителя болезни – кровососущих насекомых
- Вакцинируют только клинически здоровых животных
- Иммунитет сохраняется в течение 12 месяцев после повторной вакцинации
  - Продукты убоя и мясо от вакцинированных животных реализуют без ограничений независимо от сроков вакцинации
  - Выпускается в стеклянных флаконах вместимостью 8,0 и 10,0 см<sup>3</sup> по 5, 10 или 20 прививных доз
  - Срок годности вакцины – 12 месяцев с даты изготовления. После растворения вакцину использовать в течение 2 часов!
  - Вакцину транспортируют и хранят в сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С

**НОВИНКА!!!**

**ДОСТОЙНАЯ ЗАМЕНА**  
**ИМПОРТУ!**

**WWW.BIEVM.BY**

УДК 619:615.37:636.22/.28

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук  
Згировская А.А., кандидат биологических наук  
Толяронок Г.Е., кандидат ветеринарных наук, доцент  
Морозов А.М., младший научный сотрудник  
Герасименко В.И., ведущий технолог  
Дик Е.А., ведущий ветеринарный врач

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

## РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГА И ИММУНОСТИМУЛЯТОРА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

### Резюме

Статья посвящена разработке препарата на основе клебсиеллового бактериофага и иммуностимулятора липополисахарида, полученного из бактериальной массы бактерий *Bacillus subtilis*.

### Summary

The article is attended to the development of a drug based on *Klebsiella bacteriophage* and immunostimulant lipopolisaccharide derived from the bacterial mass of *Bacillus subtilis*.

Поступила в редакцию 01.11.2018 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Современное промышленное животноводство сопровождается высокой концентрацией животных в одном месте, что приводит к увеличению заболеваемости молодняка инфекционными болезнями, в том числе респираторными, вызванными условно-патогенной микрофлорой. Условно-патогенная микрофлора животного при определенных условиях может приобретать болезнетворные свойства, что приведет к массовому падежу животных, особенно молодняка, так как гуморальный иммунитет у животных в первые 3–4 месяца жизни функционально неразвит. Наблюдения показывают, что отдельные хозяйства и даже целые районы несут весьма значительные потери молодняка, достигающие 20–30 % от числа родившихся телят. Регистрируются как моноинфекции, вызванные сальмонеллами, эшерихиями, клебсиеллами и т.д., так и смешанные инфекции, вызванные различными комбинациями этих бактерий. Лечение респираторных инфекций, вызванных условно-патогенной микрофлорой, включает применение антибиотиков. Одна-

ко в последнее время все чаще сталкиваются с резистентностью бактерий к антибиотикам. В связи с этим интенсифицируются исследования по разработке и совершенствованию альтернативных методов лечения и профилактики респираторных заболеваний. Одним из таких методов является применение бактериофагов. Основными достоинствами бактериофагов являются высокая чувствительность к ним бактерий, даже устойчивых к антибиотикам. Бактериофаги не вызывают побочных эффектов, свободно проникают в ткани организма животного, не подавляют рост нормальной микрофлоры, не ослабляют иммунитет, не развивают устойчивость бактерий, сочетаются с любыми лекарственными препаратами, оказывают иммуностимулирующее действие. Отсутствуют противопоказания к применению. Важным является применение препаратов, которые не ограничивают использование мяса и молока для пищевых целей.

Таким образом, представляется обобщенным применение бактериофагов для

сельскохозяйственных животных, т.к. они экологически безопасны и не оказывают отрицательного влияния на качество животноводческой продукции.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Пробы для выделения бактериофагов отбирали в филиале «Бегомельский» ОАО «Витебскдрев» Докшицкого района, филиале «Зеленая Нива» ОАО «Керамика» Витебского района, фермерском хозяйстве «Юхновец» Докшицкого района.

Перед выделением бактериофагов проводили подготовку отобранного материала. Смывы со слизистых оболочек носа от больных респираторными заболеваниями телят освобождали от крупных частиц с помощью центрифугирования, а потом фильтровали с помощью бактериальных фильтров.

Патологический материал предварительно измельчали, растирая его в ступке со стерильным кварцевым песком, эмульгировали в изотоническом растворе натрия хлорида или бульоне, освобождали от крупной взвеси и пропускали через бактериальные фильтры.

Накопление бактериофагов осуществляли в колбах емкостью от 250 до 1000 мл, содержащих бульон Хоттингера с рН 7,4–7,6. Бульон засеивали соответствующей микробной культурой *Klebsiella pneumoniae* и маточным бактериофагом одновременно. Для засева использовали 18-часовые агаровые культуры, которые вносили в бульон из расчета 50 млн. микробных тел на 1 мл среды. Бактериофаг добавляли в количестве не более 0,3 % по отношению к объему питательной среды. В случае невысокого титра бактериофагов ( $10^3$  по Аппельману) повышали количество бактериофагов, используя метод обогащения. Полученные бактериофаги вносили в 2–3-часовую бульонную культуру соответствующего микроорганизма. Среду с засеянными в ней культурой и бактериофагом культивировали при температуре 37 °С 18–24 часа. Бактериофаги активно размножаются внутри бактериальных клеток, увеличиваясь в ко-

личестве и вызывая их лизис, что внешне проявляется полным просветлением среды. Полученный лизат фильтровали через бактериальные фильтры для удаления оставшихся микробных клеток.

Выделение бактериальных липополисахаридов проводили методом щелочного термогидролиза гидрооксидом натрия по В.М. Новикову (1986). Для этого проводили накопление бактериальной массы *Bacillus subtilis* на мясо-пептонном агаре в течение 2 суток при температуре +37 °С. Бактериальную массу смывали изотоническим раствором натрия хлорида и проводили термогидролиз 1 % раствором гидроксида натрия при температуре +100 °С в течение 60 минут. После остывания реакционной смеси удаляли центрифугированием бактериальные клетки и в дальнейшей работе использовали надосадочную жидкость. Отделение липополисахарида проводили путем изменения рН до 1,0–2,0 5 % раствором соляной кислоты. После выпадения осадка липополисахарида отделяли его центрифугированием и растворяли дистиллированной водой при рН 9,0.

Полученную субстанцию бактериальных липополисахаридов стерилизовали путем мембранной фильтрации через стерилизующие фильтры Filtrapur 0,20  $\mu$ m.

Определение вирулентности бактериофага методом Аппельмана проводили по следующей схеме: в ряд пробирок наливали по 4,5 мл мясо-пептонного бульона; в первую из них добавляли препарат в количестве 0,5 мл, тщательно перемешивали пипеткой и в количестве 0,5 мл переносили в следующую пробирку, из второй – 0,5 мл в третью и т.д. В результате получали разведения бактериофага 1:10; 1:100; 1:1000, до 1:1000000. Во все пробирки, включая и контрольную, содержащую только 4,5 мл бульона, вносили по 250 млн микробных тел суточной культуры соответствующих бактерий, затем культивировали их 18–20 часов в термостате, после чего проводили учет результата. Степень лизиса отмечали плюсами следующим образом: четыре плюса (++++) – абсолютная прозрачность среды, равная стерильному бульону;

три плюса (+++) – почти полная прозрачность, лишь незначительно отличающаяся от стерильного бульона; два плюса (++) – муть, значительная по сравнению со стерильным бульоном, но незначительная по сравнению с контрольной пробиркой; один плюс (+) – явная муть, но все же более слабая, чем в контрольной пробирке, минус (-) – муть, как в контрольной пробирке.

Определение литической активности бактериофагов на плотной питательной среде по методу Грациа заключалось в следующем: питательный агар разливали в чашки Петри и подсушивали в термостате. Готовили полужидкий питательный агар в пробирках в объеме 3–4 мл, растопив его на водяной бане. Готовили десятикратные разведения бактериофага в изотоническом растворе хлорида натрия. В дальнейшем 0,5 мл каждого разведения бактериофага смешивали с таким же объемом суточной бульонной культуры чувствительных к бактериофагу бактерий и выливали эту смесь в пробирку с полужидким агаром температурой 45 °С. Приготовленной смесью заливали поверхность первого слоя агара в чашке Петри, которую инкубировали при 37 °С в течение суток. Не зараженные бактериофагом бактерии, размножаясь, образовывали сплошной газон роста на поверхности питательного агара. Каждая инфицированная бактериофагом бактерия подвергается лизису и освобождает потомство бактериофага, которое внедряется в интактные клетки бактерий, и весь цикл повторяется. В результате лизиса клеток на сплошном бактериальном газоне появляются стерильные пятна (бляшки).

Безвредность бактериального липолисахарида проверяли на белых мышах массой 20–25 г. Мышам опытной группы в количестве 10 голов вводили препарат внутримышечно в дозе 1000 мкг/мл однократно в объеме 1,0 мл. Контрольной группе мышей (10 голов) вводили физиологический раствор по 1 мл. Наблюдение за мышами вели в течение 7 суток, отмечая изменения со стороны общего состояния животного, аппетита, шерстного и кожного покрова и т.д.

Стерильность препарата на основе бактериофага и иммуностимулятора проверяли обычным способом, высевая его на специальные питательные среды: тиогликолевую среду, Сабуро согласно Фармакопее Республики Беларусь. Для анализа использовали по 2 пробирки каждой среды. Препарат считали свободным от бактериальной и грибковой контаминации при отсутствии роста на селективных средах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для создания комплексного препарата для лечения и профилактики респираторных заболеваний молодняка крупного рогатого скота был наработан бактериофаг к *Klebsiella pneumoniae*. Он представляет собой фильтрат бульонной культуры *Klebsiella pneumoniae*, лизированных фагом.

Полученный препарат-бактериофаг имел вид совершенно прозрачной жидкости желтого цвета большей или меньшей интенсивности, содержащей большое количество размножившихся фагов, обладающих специфическими лизирующими свойствами.

Литическую активность бактериофага, его вирулентность, определяли методом титрования на жидкой и плотной питательной среде.

За титр бактериофага при определении методом Аппельмана принимали то наибольшее его разведение, которое вызывало полное растворение соответствующих микробов.

Титр фага по методу Грациа устанавливали подсчетом негативных колоний и умножением полученного числа на степень разведения.

Для создания эффективного комплексного препарата на основе бактериофага использовали фаг с определенной литической активностью (не менее  $10^5$  по методу Аппельмана или  $3,5 \times 10^5$  БОЕ/мл по методу Грациа).

Для комплексного препарата на основе бактериофага в качестве иммуностимулятора использовали липополисахарид, полученный из бактериальной массы *Bacillus subtilis*.

В таблице 1 представлены результаты литической активности экспериментального образца препарата, содержащего клебсиелловый бактериофаг.

Таблица 1. – Результаты исследования литической активности образца препарата, содержащего клебсиелловый бактериофаг

Бактериофаг	Титр по Аппельману	Титр по Грациа, БОЕ/мл
Клебсиелловый	$10^{-5}$	$3,5 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^5$

Для работы готовили раствор липополисахарида в концентрации 700 мкг/мл из высушенного вещества. Безвредность липополисахарида подтверждалась на белых мышах.

Установлено, что полученный полисахарид в указанной концентрации (десятикратная доза) безвреден для белых мышей.

Образец полученного комплексного препарата проверяли в лабораторных условиях на стерильность, безвредность, литическую активность или вирулентность.

Установлено, что полученный комплексный препарат не контаминирован грибковой и бактериальной микрофлорой.

Препарат считали безвредным при условии отсутствия каких-либо клинических проявлений.

Установлено, что полученный препарат безвреден для белых мышей.

Литическая активность является одним из основных свойств препаратов на основе бактериофагов. Литическую активность (титр) препарата оценивали по его способности вызывать лизис бактериальной куль-

туры в жидких или на плотных питательных средах. При определении литической активности по методу Аппельмана титр выражали тем максимальным разведением, в котором испытываемый бактериофаг проявлял свое литическое действие.

Более точным методом оценки активности бактериофага является определение количества бляшкообразующих единиц (БОЕ) фага в мл суспензии (метод Грациа).

Установлено, что литическая активность бактериофага в экспериментальном образце препарата составляла  $10^{-5}$  (клебсиелловый бактериофаг) по методу Аппельмана и  $3,5 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^5$  (клебсиелловый бактериофаг) по методу Грациа.

Изучение влияния комплексного препарата на организм крупного рогатого скота проводили в ОАО «Агрофирма имени Суворова». Животных отбирали в группы с признаками респираторной инфекции.

Результаты исследований лизоцимной, бактерицидной активности крови представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Показатели лизоцимной, бактерицидной активности крови и фагоцитарного показателя

Срок взятия крови	Группы телят	Лизоцимная активность сыворотки крови, %	Бактерицидная активность сыворотки крови, %	Фагоцитарный показатель, %
1	2	3	4	5
До введения	ОГ 1	$8,34 \pm 0,44$	$32,82 \pm 0,51$	$29,6 \pm 2,01$
	ОГ 2	$7,56 \pm 1,00$	$30,43 \pm 0,08$	$23,2 \pm 1,53$
	ОГ 3	$7,81 \pm 0,89$	$33,32 \pm 0,56$	$21,4 \pm 0,50$
	ОГ 4	$8,76 \pm 0,76$	$33,3 \pm 0,64$	$30,6 \pm 3,42$
	ОГ 5	$5,95 \pm 0,41$	$32,85 \pm 1,16$	$24,8 \pm 1,59$
	ОГ 6	$6,89 \pm 0,89$	$33,32 \pm 1,61$	$24,6 \pm 1,80$
	Средние значения	$7,55 \pm 0,73$	$32,67 \pm 0,76$	$25,7 \pm 1,8$

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Через 14 дней после введения	ОГ 1	13,12±1,24	41,92±2,21	32,2±0,80
	ОГ 2	11,17±0,31	31,77±0,8	32,8±0,58
	ОГ 3	8,54±0,39	28,3±2,95	29,0±1,34
	ОГ 4	12,31±0,59	29,02±2,51	32,2±1,01
	ОГ 5	13,82±0,71	41,51±3,5	32,4±1,43
	ОГ 6	10,92±0,77	40,76±2,25	31,0±1,92
	средние значения	11,65±0,66	35,55±2,37	31,6±1,18
Через 21 день после введения	ОГ 1	13,07±1,20	41,28±2,71	40±1,35
	ОГ 2	11,46±0,99	34,79±2,07	27,4±2,01
	ОГ 3	8,71±0,4	32,47±3,7	35,4±0,53
	ОГ 4	12,38±0,54	35,72±3,73	35,2±0,65
	ОГ 5	11,27±0,69	39,0±4,02	39,4±1,0
	ОГ 6	11,14±0,63	34,39±0,71	43±2,3
	средние значения	11,3±0,74	36,28±2,82	36,7±1,31

Как видно из таблицы 2, лизоцимная активность сыворотки крови у животных, получавших препарат, содержащий клебсилловый бактериофаг с титром  $3,5 \times 10^5$  БОЕ/мл и 10 мкг/кг иммуностимулятора в объеме 2 мл, повышалась в 1,5 раза на 14 и 21 сутки после введения. Фагоцитарная активность сыворотки также увеличивалась в 1,23 раза.

Бактерицидная активность сыворотки увеличилась на 14 сутки в 1,4 раза, а на 21 – в 1,1 раза. Эти показатели свидетельствуют об иммуностимулирующей активности препарата.

В таблице 3 представлены результаты содержания Т- и В- лимфоцитов в крови подопытных животных.

Таблица 3. – Влияние комплексного препарата на формирование Т- и В-лимфоцитов

Срок взятия крови	Группы телят	Т-лимфоциты, %	В-лимфоциты, %
До введения	ОГ 1	24,8±1,02	14,4±0,75
	ОГ 2	25,6±0,98	17,0±1,48
	ОГ 3	23,0±1,58	15,4±2,29
	ОГ 4	22,8±2,03	16,6±0,67
	ОГ 5	24,6±2,08	14,8±0,58
	ОГ 6	25,6±1,61	14,8±0,8
	средние значения	24,4±1,28	15,5±1,1
Через 21 день после введения	ОГ 1	30,4±2,16	44,6±2,38
	ОГ 2	29,6±2,56	34,4±0,98
	ОГ 3	30,86±1,16	39,0±2,86
	ОГ 4	40,5±2,19	27,2±2,87
	ОГ 5	30,2±1,06	25,8±2,74
	ОГ 6	38,0±1,67	22,6±2,13
	средние значения	33,25±1,8	32,27±2,32

Как видно из таблицы 3, концентрация Т- и В-лимфоцитов увеличилась в 1,4 и 2,08 раза соответственно на 21 сутки после введения телятам препарата, содержащего клебсиелловый бактериофаг с титром  $3,5 \times 10^5$  БОЕ/мл и 10 мкг/кг иммуностимулятора в объеме 2 мл.

Следует заметить, что во всех подопытных группах состояние животных было лучше, чем в контрольной группе. Хотя этот показатель субъективен, признаки респираторной инфекции у животных опытных групп исчезли на 10 сутки, а в контрольной – через 20 дней. Животные опытных групп более охотно поедали корм.

Для проведения дальнейших исследований по отработке оптимальных терапевтических доз препарата и изучения эффективности препарата для лечения и профилактики респираторных заболеваний у телят была подготовлена и утверждена

«Программа испытаний комплексного препарата на основе бактериофага и иммуностимулятора для лечения и профилактики респираторных заболеваний молодняка крупного рогатого скота».

### ВЫВОДЫ

1. Создан экспериментальный образец комплексного препарата для лечения и профилактики респираторных заболеваний молодняка крупного рогатого скота.

2. Установлено, что созданный образец препарата стерилен, безвреден для белых мышей массой 20–25 г, титр клебсиеллового бактериофага составлял по методу Аппельмана  $10^{-5}$ , а по методу Грациа  $3,5 \times 10^5$ .

3. Установлено, что препарат оказывает иммуностимулирующее действие на организм молодняка крупного рогатого скота.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Определение спектра литической активности бактериофагов методом электрооптического анализа клеточных суспензий / О.И. Гулий [и др.] // Живые и биокосные системы. – 2014. – № 9.*
2. *Митрохина, Е.Н., Золотухин, С.Н., Васильев, Д.А. Биологические свойства бактериофагов E. cloacae № 1487 и E. cloacae № 10005 // Сб. науч. тр. Межрегион. научно-практ. конф. молодых ученых Приволжского федерального округа. – Самара, 2005. – С. 194–196.*
3. *Пожарникова, Е.Н. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов ENTEROBACTER, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения // Автореферат на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Саратов, 2006.*
4. *Садртдинова, Г.Р. Бактериофаги клебсиелл: их роль и значение // Материалы IV Международной научно-практической конференции. – 2014.*
5. *Adams, M. Bacteriophages. M. Medgiz. 1961. – 521 p.*

## наша продукция



УДК 619:578.22:636.4

**Згировская А.А.**, кандидат биологических наук  
**Борисовец Д.С.**, кандидат ветеринарных наук  
**Пукач Ю.С.**, ведущий технолог  
**Виршич А.В.**, ведущий технолог  
**Пунтус И.А.**, младший научный сотрудник

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

## **ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ 2-ГО ТИПА**

### **Резюме**

*Статья посвящена выделению, идентификации и культивированию цирковируса свиней 2-го типа. В результате проведенных исследований нами выделено 2 изолята цирковируса свиней 2-го типа.*

### **Summary**

*The article is attended to isolation, identification and cultivation of PCV type-2. As a result of our research two isolates of PCV-2 were isolated.*

*Поступила в редакцию 01.11.2018 г.*

### **ВВЕДЕНИЕ**

ЦВС – это однонитевый ДНК-вирус малых размеров, округлой формы, устойчивый в окружающей среде, который может культивироваться во многих линиях клеток свиней. Вирус относится к роду *Circovirus* семейства *Circoviridae* (*porcine circovirus* – PCV-2). Размножается в клетках кишечного и дыхательного трактов свиньи, макрофагах (белых кровяных тельцах, которые убивают бактерии, и Т- и В-лимфо- цитах, отвечающих за иммунитет.

Цирковиральная инфекция свиней (*circovirus disease*) – заразная болезнь, сопровождающаяся в одних случаях врожденным тремором у новорожденных поросят, а в других – синдромом мультисистемного послеотъемного истощения поросят (СПМИ). Синдром послеотъемного мультисистемного истощения является многофакторным заболеванием, при этом цирковир вирус свиней 2-го типа (ЦВС-2) играет основную роль в его возникновении. Болезнь характеризуется проявлением комплекса клинических признаков, включающих потерю веса, отставание в росте, одышку, диарею, желтуху и пневмонию, нарушениями со стороны ЦНС. В естественных усло-

виях СПМИ чаще отмечают у поросят 6–15-недельного возраста, у которых регистрируют наибольший отход, при этом пик заболеваемости приходится на 10-недельный возраст.

Инфицирование свиней этим вирусом имеет широкое распространение. Антитела к PCV-2 обнаружены у 53 % свиней в США, 85 % – Германии, 86 % – Великобритании и у 92 % свиней Ирландии. Источником возбудителя инфекции являются больные и латентно инфицированные животные, которые выделяют вирус с фекалиями, мочой, истечениями из носа и глаз, со слюной. Экономический ущерб, наносимый свинокомплексам болезнями, ассоциированными с ЦВС, значительный и обусловлен потерями от недополучения продукции и высокой смертностью поросят послеотъемного периода. Так, в период вспышки болезни заболеваемость поросят 8–13-недельного возраста составляет от 20–40 % до 70–80 %, а летальность – более 80 %. В настоящее время болезнь широко распространена в странах с развитым свиноводством, в том числе и в нашей стране: антитела к ЦВС-2 обнаружены у свиней практически во всех хозяйствах, а

число серопозитивных животных может достигать 100 %.

В профилактике и борьбе с факторными инфекционными болезнями необходимо использовать вакцинацию как вынужденную меру в комплексе с зоотехническими, зоогигиеническими и ветеринарно-санитарными мероприятиями. В нашей стране специфические средства борьбы с цирковирусом свиней не разработаны. Для разработки высокоэффективных вакцин необходимо наличие штамма вируса с высоким титром, что представляется достаточно затруднительным, так как цирковирус сложно культивировать в перевиваемых культурах клеток. Вирус накапливается в низких титрах, визуальное цитопатическое действие вируса на клетку не проявляется, соответственно, возникают проблемы с титрованием вируса, с его выделением и идентификацией на культурах клеток.

В связи с этим подбор чувствительных к вирусу ЦВС-2 перевиваемых культур клеток, использование их для выделения вируса и его идентификации представляется в настоящий момент актуальным.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Известно, что цирковирус свиней 2-го типа способен накапливаться в тканях больных животных в титрах 6,0–7,0 lg ТЦД<sub>50/см<sup>3</sup></sub>. В связи с этим с целью выделения изолятов отбирали животных с выраженными клиническими признаками истощения, дерматита и нефропатии, респираторными нарушениями. У этих животных отбирали образцы биологического материала: сгустки крови, лимфатические узлы, легкие, селезенку, печень и почки. В предварительных исследованиях отобранный биологический материал проверяли в ПЦР на наличие антигена цирковируса 2-го типа. В целях облегчения выделения вируса образцы тканей сразу же после аутопсии замораживали при температуре минус 80 °С.

Для выделения вирусов готовили 15–20 % суспензию тканей на среде Игла МЕМ, растирая ткани со стерильным песком пестиком в ступке. Измельченный об-

разец переносили в среду Игла МЕМ с пенициллином (100 мкг/мл) и стрептомицином (100 мкг/мл), центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут при температуре плюс 4 °С. Надосадочную жидкость отбирали, перед инокуляцией клеточных культур к 2 мл надосадочной жидкости добавляли 100 мкл хлороформа и непрерывно перемешивали в течение 10 минут при комнатной температуре. Эту смесь затем переносили в микроцентрифужные пробирки, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут при температуре +4 °С, после чего собирали инокулят для экспериментов по выделению цирковируса. Все исследования по выделению PCV-2 выполняли на культурах PK-15, SK-6 и *Vero*.

Заражение клеточных линий проводили путем внесения вирусосодержащего материала на частично сформированный монослой клеток (12–14 часов культивирования), на полностью сформированный монослой (24–48 часов культивирования) и в суспензию клеток. В контрольную культуру вирус не вносили. При заражении частично или полностью сформированного монослоя проводили адсорбцию вируса при температуре плюс 37 °С в течение 1 часа, после чего добавляли поддерживающую среду Игла МЕМ, обогащенную 2 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота и 2 mM L-глутамин. В связи с тем, что накопление цирковируса 2-го типа происходит слабо, для стимуляции репликации вируса использовали D-глюкозамин и ДЕАЕ-декстран. D-глюкозамин и ДЕАЕ-декстраном в концентрациях от 10 до 40 мкг/мл обрабатывали монослой клеток в течение 1 часа перед заражением. В случае заражения суспензии перевиваемых клеток монослой диссоциировали посредством трипсинизации (смесью трипсина и версена), клетки переносили в среду Игла МЕМ, содержащую 15 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота с концентрацией клеток 400 000 в 1 мл. Фракции этой суспензии аликвотами по 10 мл смешивали с 2 мл вируса и окончательную смесь переносили аликвотами по 6 мл в 2

фальконовских флакона на 25 см<sup>2</sup>. Эти культуры инкубировали при температуре +37 °С в течение 18 часов в атмосфере СО<sub>2</sub>. После инкубации культуральную среду обрабатывали 40 мкг/мл D-глюкозамина, затем продолжали инкубацию еще в течение 48–72 часов при температуре +37 °С. Один фальконовский флакон с инфицированным монослоем подвергали трем последовательным циклам замораживания/оттаивания. Инфицированные клетки второго флакона обрабатывали раствором смеси трипсина и версена, суспендировали в 20 мл среды Игла MEM с 15 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота, а затем переносили эту суспензию в фальконовские флаконы на 75 см<sup>2</sup> при концентрации 400 000 клеток/мл. В дальнейшем свежеинокулированные флаконы суперинфицировали путем добавления 5 мл лизата, полученного после циклов замораживания/оттаивания инфицированного вирусом монослоя. Проводили 5 слепых пассажей инфицированных клеток.

Накопление вируса в клетках контролировали в ПЦР или в реакции нейтрализации с иммунопероксидазным окрашиванием. Перед проведением очистки и концентрирования вируса проводили его термолизис. Для этого рабочую суспензию вируса помещали в стерильные криопробирки, которые погружали в жидкий азот (температура минус 196 °С), выдерживали их в течение 30 минут до полного замораживания, после чего пробирки переносили в термостат с температурой плюс 37 °С на 30 минут. Эту манипуляцию проводили 3 раза. При такой обработке происходил разрыв тканей клеток и освобождение вируса в культуральную жидкость. Дальше проводили центрифугирование суспензии вируса при 3000 об/мин в течение 30 минут. При этом в осадок уходили обрывки тканей, клеточные элементы, а в надосадочной жидкости оставался вирус

Концентрирования вируса на этой стадии не происходит, а наоборот, часть вируса теряется за счет адсорбции на удаляемых частицах, поэтому очень часто осадок подвергают промывке для освобожде-

ния хотя бы части адсорбированного на нем вируса. Промывку осадка мы проводили дважды. Кроме того, для уменьшения адсорбции низкоскоростное центрифугирование проводили сразу же после термолиза клеток.

Очистку проводили методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы. В работе использовали диапазон рабочих концентраций 10–60 % с шагом концентраций 10 % на фосфатном буфере 0,1 М рН 7,2–7,4. Линейный градиент готовили методом предварительного приготовления ступенчатого градиента. В центрифужные пробирки последовательно вносили равные объемы растворов сахарозы указанных выше концентраций, начиная с большей. Полученный ступенчатый градиент оставляли на ночь при температуре плюс 4 °С для свободной диффузии, в результате чего получали линейный градиент.

На линейный градиент сахарозы наслаивали вирус в объеме 1–1,5 мл и центрифугировали при 80 000 g в течение 2 часов в горизонтальных роторах. Образовавшиеся полосы опалесценции в градиенте сахарозы переосаждали против 0,1 М ФСБ. Полученный очищенный препарат подвергали концентрированию.

Концентрирование вируса проводили с использованием ПЭГ 6000 и 1,15 М хлорида натрия по методу, описанному Грининым А.С. и Титовым И.Н. (1971). Вирус смешивали с ПЭГ 6000 до конечной концентрации 7 %. Суспензию готовили до полного растворения ПЭГа и помещали на 12 часов в холодильник при температуре плюс 4 °С. ПЭГ осаждали при 6000 g в течение 20 минут при 7 °С. Надосадочную жидкость удаляли, а к осадку добавляли 0,1 М ФСБ рН 7,2–7,4 в объеме, не превышающем 1:50 от первоначального.

Дальнейшие исследования заключались в определении биологической активности концентрированного вируса по сравнению с первоначальным титром.

Титрование вируса проводили в 96-луночных планшетах. В лунки планшета вносили суспензию клеток РК-15 в кон-

центрации 180 000 в мл. Через 48 часов в лунках формировался монослой клеток. Готовили десятикратные разведения вируса до концентрации и после нее, начиная с  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ . Из лунок планшета удаляли ростовую среду, вносили по 200 мкл разведений вирусов, используя на каждое разведение по 4 лунки. В контрольные лунки вносили среду, на которой проводили титрование. Инкубировали планшеты при  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  и 5 %  $\text{CO}_2$  в течение 10 суток, после чего учитывали результаты титрования с помощью иммунопероксидазного окрашивания.

Этапы постановки иммунопероксидазного теста для индикации цирковируса 2-го типа:

1. Фиксация клеток в течение 10 минут;
2. Внесение специфичной для цирковируса свиней 2-го типа гипериммунной сыворотки, инкубация в течение 60 минут;
3. Промывка лунок 3 раза буферным раствором;
4. Внесение конъюгата (кроличий антисвиной IgG меченый пероксидазой хрена), инкубация в течение 60 минут;
5. Промывка лунок буферным раствором 3 раза. Внесение раствора субстрата (0,04% 3-амино-9-этилкарбозол в Na-ацетатном буфере) с экспозицией 15–20 минут до проявления окрашивания;
6. Остановка реакции добавлением физиологического раствора;
7. Учет результатов под инвертированным микроскопом.

Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в  $\lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ .

На первом этапе нами была поставлена полимеразная цепная реакция для идентификации изолятов по нуклеиновой кислоте. Реакцию ставили согласно инструкции тест-системы для определения антигена цирковируса.

Следующий этап работы заключался в постановке перекрестного варианта реакции нейтрализации с постоянной дозой сыворотки и разными разведениями вируса с последующим иммунопероксидажным окрашиванием.

Специфичную положительную сыво-

ротку к цирковирису свиней 2-го типа с титром 1:256 инактивировали при температуре  $56 ^\circ\text{C}$  в течение 30 минут. Готовили разведения сыворотки 1:51,2 (5  $\text{НД}_{50/\text{мл}}$ ).

Готовили десятикратные разведения вируса с  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$ . В лунки с круглым дном планшета вносили равные объемы разведений вируса и разведение положительной сыворотки (5  $\text{НД}_{50/\text{мл}}$ ). Параллельно ставили аналогичный опыт с отрицательной сывороткой (контроль). Полученные пробы выдерживали 1 час в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе, после чего смесь вируса и сывороток переносили в планшет с монослоем клеток РК-15, предварительно удалив ростовую среду из лунок, и инкубировали в течение 5 суток.

В связи с тем, что часто сыворотка оказывает токсичное воздействие на клетки, смесь вирусов и сыворотки выдерживали в течение 1 часа для адсорбции при температуре  $+37 ^\circ\text{C}$  в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе, после чего монослой промывали средой, выдерживали планшет в течение 5 минут, удаляли среду и вносили новую порцию среды и инкубировали в течение 5 суток в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе.

Через 5 суток проводили процедуру иммунопероксидажного окрашивания монослоя клеток и учет результатов реакции.

Учет реакции нейтрализации проводили с помощью инвертированного микроскопа, где цитоплазма инфицированных цирковиром клеток окрашена в темно-красный цвет со светлым ядром. В том случае, если образовался комплекс антитело+антиген, клетки монослоя останутся неокрашенными, т.е. вирус нейтрализовался специфическими антителами.

Расчет титра проводили по методу Рида и Менча и выражали в  $\lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ .

Сначала рассчитывали титр инфекционной активности вируса в присутствии специфической и отрицательной сывороток. Число, показывающее, во сколько раз специфичная сыворотка снижает титр вируса по сравнению с контрольной (отрицательной), называется индексом нейтрализации. Индекс нейтрализации представляет собой отношение титра вируса в присутствии контрольной сыворотки к титру

вируса со специфичной сывороткой. Реакцию нейтрализации считали положительной, если индекс нейтрализации равен 2 lg и выше.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Из литературных данных [1, 2, 3, 5] и из наших исследований, проведенных ранее, известно, что РСВ-2 может размножаться и накапливаться в перевиваемых культурах клеток РК-15, SK-6, *Vero*, но накопление вируса проходит слабо и титр вируса не превышает 2,0-2,5 lg ТЦД<sub>50/см</sub><sup>3</sup>. В связи с этим перед нами встала задача повысить чувствительность клеток к РСВ-2.

Известно, что глюкозамин улучшает метаболизм в клетках, ДЕАЕ-декстран (диэтиламиноэтил-декстран) повышает чувст-

вительность перевиваемых клеток к некоторым вирусам, в частности к рабдовирусам.

В связи с этим мы обрабатывали монослой перевиваемых клеток РК-15, SK-6, *Vero* глюкозамин и ДЕАЕ-декстраном в концентрациях от 10–40 мкг/мл. Отработка концентраций препаратов, которыми обрабатывали монослой клеток, имеет большое значение, так как при больших концентрациях глюкозамин и ДЕАЕ-декстран оказывают противоположное действие.

В таблице 1 представлены результаты накопления цирковируса в клетках РК-15, после обработки их глюкозамин и ДЕАЕ-декстраном.

Таблица 1. – Результаты повышения чувствительности клеток РК-15 после обработки D-глюкозамин и ДЕАЕ-декстраном

Состояние монослоя	Титр вируса после обработки РК-15, lg ТЦД <sub>50/см</sub> <sup>3</sup>									
	D-глюкозамин в концентрациях, мкг/мл					ДЕАЕ-декстраном в концентрациях, мкг/мл				
	10	20	30	40	Контроль	10	20	30	40	Контроль
Суспензия клеток	3,0	4,25	4,55	5,75	2,5	3,5	3,75	4,5	2,0	2,5
Монослой 30–50 %	3,0	3,25	4,0	4,5	2,5	2,75	3,25	3,5	2,5	2,5
Монослой 100 %	2,75	3,0	3,5	3,5	2,5	2,5	2,75	2,5	2,0	2,5

Как видно из таблицы 1, обработка суспензии клеток РК-15 ДЕАЕ-декстраном в концентрации 30 мкг/мл приводила к повышению чувствительности клеток. Титр вируса при этом составил 4,5 lg ТЦД<sub>50/см</sub><sup>3</sup>, что на 2 lg выше по сравнению с контролем. При использовании меньшей концентрации (10, 20 мкг/мл) препарата титр вируса был ниже и составлял 3,5–3,75 lg ТЦД<sub>50/см</sub><sup>3</sup>, в то время как при увеличении концентрации препарата до 40 мкг/мл титр вируса снизился на 0,5 lg по сравнению с контролем. При обработке монослоя клеток наблюдалось незначительное увеличение титра вируса от 2,75 до 3,5 lg ТЦД<sub>50/см</sub><sup>3</sup>.

Чувствительность клеток РК-15 к инфицированию цирковирусом значительно повышалась при обработке суспензии клеток D-глюкозамин в концентрации 40 мкг/мл. РСВ-2 накапливался в титре 5,75 lg ТЦД<sub>50/см</sub><sup>3</sup>, что на 3,25 lg выше, чем в

контроле. При обработке сформированного монослоя клеток препаратом в этой же концентрации титр вируса составлял 3,5–4,5 lg ТЦД<sub>50/см</sub><sup>3</sup>. Титр вируса был несколько ниже при уменьшении концентрации глюкозамина до 10–30 мкг/мл и составлял 3,0–4,55 lg ТЦД<sub>50/см</sub><sup>3</sup> при суспензионном способе заражения, при монослойном способе заражения – 2,75–4,0 lg ТЦД<sub>50/см</sub><sup>3</sup>.

Таким образом, анализируя результаты, представленные в таблице 1 можно сделать вывод, что наиболее оптимальным способом заражения культуры клеток РК-15 является суспензионный. При этом способе заражения цирковирус 2-го типа накапливается в максимальных титрах 5,75 lg ТЦД<sub>50/см</sub><sup>3</sup>.

Аналогичные данные были получены и при обработке культур клеток SK-6 и *Vero*. Титр вируса составлял 5,5 lg ТЦД<sub>50/см</sub><sup>3</sup> при обработке суспензии клеток D-глюко-

замином в концентрации 40 мкг/мл.

После обработки методики повышения чувствительности клеток к цирковирусу нами была предпринята попытка выделить из органов больных поросят изолят по методике, описанной выше.

Из литературы известно [1, 3, 5], что для идентификации выделенных вирусов используют серологические реакции РИФ, ИФА, РНГА, РДП, РСК. Наиболее универсальной и дающей более достоверные результаты при идентификации выделенных вирусов является РН, в которой используют те же живые чувствительные системы, на которых и был выделен исследуемый вирус. Для обнаружения и идентификации вирусов, кроме серологических реакций используют прямые методы идентификации вирусных нуклеиновых кислот: ДНК-, РНК-зонды, полимеразную цепную реакцию (ПЦР). С их помощью выявляют нуклеиновые кислоты вирусов.

Было выделено 2 образца вируса. В ПЦР было подтверждено, что эти изоляты относятся к цирковирусу свиней 2-го типа. Нами было проведено 5 слепых пассажей вируса. При титровании инфицированной культуральной жидкости установлено, что титр вируса составлял 1,75–2,3 lg ТЦД<sub>50/см</sub><sup>3</sup>. Следующий этап работы заключался в очистке и концентрировании полученных изолятов. В результате анализа данных [2, 4, 5], касающихся современных технологий очистки и концентрирования вирусов, установлено, что применяющиеся в настоящее время технологические схемы включают

комбинации нескольких методов, которые позволяют добиваться максимальной очистки вируса от различных компонентов клеток. Основным критерием пригодности и эффективности той или иной схемы очистки и концентрирования является степень чистоты и концентрирования вирусного антигена. После осуществления манипуляций по очистке и концентрированию вирусный антиген должен сохранять и, более того, повышать свои антигенные свойства, т.е. биологическую активность, а также быть максимально свободным от балластных белков системы культивирования.

Таким образом, применение наиболее оптимального методического и технического решения для концентрирования и очистки вируса (антигена) от контаминантов систем культивирования и других технологических процессов позволяет исключить механические повреждающие воздействия на вирус, повысить эффективность очистки и выход продукта, снизить реактогенность биопрепарата, использовать возможности масштабирования.

Существует несколько методов очистки: механические, физические, химические и биологические. В нашем случае мы применяли механические, химические и биологические методы. После проведения очистки и концентрирования вируса проверяли его биологическую активность методом титрования в 96-луночных планшетах.

Результаты титрования вируса до концентрирования и после представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Определение степени концентрации вируса по биологической активности

Образец	Титр вируса, lg ТЦД <sub>50/см</sub> <sup>3</sup>	
	до концентрации	после концентрации
1	1,75	3,5
2	2,3	4,5

Таким образом, из таблицы 2 видно, что при проведении очистки и концентрации вируса его биологическая активность увеличилась с 1,75 до 3,5 lg ТЦД<sub>50/см</sub><sup>3</sup> первого образца и с 2,3 до 4,5 lg ТЦД<sub>50/см</sub><sup>3</sup> – второго образца.

После проведения очистки и концентрирования вирусов поставили повторно

полимеразную цепную реакцию для идентификации изолятов по нуклеиновой кислоте. Реакцию ставили согласно инструкции тест-системы для определения антигена цирковируса. Установлено, что оба изолята относятся к роду *Circovirus*.

Известно, что наиболее специфичной является реакция нейтрализации: в боль-

шинстве случаев она позволяет установить как видовую, так и типовую принадлежность вируса. Ее осуществляют различными способами. Чаще всего готовят смесь вируса с сывороткой, которую затем испытывают тем или иным способом на наличие нейтрализованного вируса.

Следующий этап работы заключался

в постановке перекрестного варианта реакции нейтрализации с постоянной дозой сыворотки и разными разведениями вируса с последующим иммунопероксидазным окрашиваем.

Результаты постановки перекрестной реакции нейтрализации представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Постановка перекрестной реакции нейтрализации при идентификации изолятов цирковируса 2-го типа (в 2-х повторностях)

Разведения вируса	Специфичная сыворотка		Специфичная сыворотка	
	изолят №1	изолят №2	изолят №1	изолят №2
10 <sup>-1</sup>	++++	++++	++++	++++
10 <sup>-2</sup>	++++	+++–	++++	+++–
10 <sup>-3</sup>	– + – –	– – – –	+ – – –	– – – –
10 <sup>-4</sup>	– – – –	– – – –	– – – –	– – – –
10 <sup>-5</sup>	– – – –	– – – –	– – – –	– – – –
10 <sup>-6</sup>	– – – –	– – – –	– – – –	– – – –
10 <sup>-7</sup>	– – – –	– – – –	– – – –	– – – –
10 <sup>-8</sup>	– – – –	– – – –	– – – –	– – – –
10 <sup>-9</sup>	– – – –	– – – –	– – – –	– – – –
Титр lg ТЦД <sub>50/см<sup>3</sup></sub>	2,75	2,25	2,75	2,25
Индекс нейтрализации	2,0	2,2	2,0	2,2

Из таблицы видно, то индекс нейтрализации при идентификации изолятов составил 2,0 lg (изолят № 1) и 2,2 lg (изолят № 2).

### ВЫВОДЫ

1. Из патологического материала от больных поросят выделено 2 изолята цирковируса свиней 2-го типа.

2. Установлено, что наиболее оптимальным способом заражения культуры клеток РК-15 является суспензионный. При этом способе заражения цирковирус 2-го типа накапливается в максимальных титрах 5,75 lg ТЦД<sub>50/см<sup>3</sup></sub> после обработки суспензии клеток D-глюкозамином в концентрации 40 мкг/мл.

3. Титр вируса после концентрации ПЭГ 6000 и очистки методом низкоскоростного центрифугирования увеличивался с 1,75 до 3,5 lg ТЦД<sub>50/см<sup>3</sup></sub> первого образца и с 2,33 до 4,5 lg ТЦД<sub>50/см<sup>3</sup></sub> второго образца.

4. Идентификацию выделенных изолятов цирковируса проводили в ПЦР. Установлено, что выделенные изоляты можно отнести к роду *Circovirus*.

5. В перекрестной реакции нейтрализации установлено, что индекс нейтрализации составлял 2,0 lg (изолят № 1) и 2,2 lg (изолят № 2), что свидетельствует о том, что выделенные изоляты относятся к цирковирусу свиней 2-го типа.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Гречухин, А.Н. Цирковирусная инфекция свиней и ее специфическая профилактика / А.Н. Гречухин // *Ветеринария* – 2010. – № 3. – С. 8–11.
2. Джупина, С.И. Факторные инфекционные болезни животных / С.И. Джупина // *Ветеринария*. – 2001. – С. 6–9.
3. Орлянкин, Б.Г. Современные представления о цирковирусах свиней. / Б.Г. Орлянкин, Т.И. Алипер, Е.А. Непоклонов // *С.-х. биология. сер. Биология животных*, 2002. – № 6. – С. 29–37.
4. Сатина, Т.А. Цирковирусные инфекции свиней: Обзор лит. / Т.А. Сатина // *ФГУ ВНИИЗЖ. – Владимир*, 2003. – 101 с.
5. Allan, G.M. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. / G.M. Allan [at. al.] // *J. Comp. Pathol.*, 2008. – Vol. 121. – P. 1–11.

УДК 636.52/.58.053.2:636.085/.087

**Насонов И.В.**, доктор ветеринарных наук, доцент  
**Зинина Н.В.**, кандидат биологических наук  
**Кныш Н.В.**, кандидат ветеринарных наук  
**Захарик Н.В.**, кандидат ветеринарных наук  
**Гуринович О.Л.**, магистр биологических наук  
**Волчек Л.Т.**, научный сотрудник

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

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСНЫХ АДСОРБЕНТОВ В КОРМАХ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

### Резюме

*В статье представлены результаты исследований эффективности новых кормовых добавок «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал» на цыплятах-бройлерах. Введение в рацион цыплят комплексных адсорбентов при профилактических мероприятиях способствуют нормализации обменных процессов и снижает токсическую нагрузку на организм.*

### Summary

*The article presents the results of studies of the effectiveness of new feed additives "Diar Stop Advance" and "Toxinal" on broiler chickens. Introduction to the diet of chickens complex adsorbents during preventive measures contribute to the normalization of metabolic processes and reduces the toxic load on the body.*

*Поступила в редакцию 29.10.2018 г.*

### ВВЕДЕНИЕ

Промышленное птицеводство – одна из немногих специализированных отраслей агропромышленного комплекса, которая представляет собой комплексную интегрированную систему, обеспечивающую все процессы: от воспроизводства птицы до производства готовой продукции и ее реализации [6].

В последнее десятилетие экологической безопасности сельхозпродукции уделяется пристальное внимание. Загрязнение кормов и кормовых смесей грибами-продуцентами микотоксинов, солями тяжелых металлов, пестицидами, радионуклеидами и другими токсическими веществами наносит птицеводству огромный экономический ущерб. Поступая в организм птицы с комбикормами, они являются причиной хронических отравлений: кумулируются в печени, почках, костях, заметно снижая их функциональные способности, а в дальнейшем накапливаются в мясе и яйцах. Птицепродукты, содержащие токсины, вредны

для здоровья потребителей [2, 4].

Хронические интоксикации организма птицы приводят к замедлению роста и развития молодняка, снижению потребления корма, продуктивности бройлеров и кур-несушек.

Сегодня наиболее эффективный способ борьбы с токсинами – введение в корма различных сорбентов [1, 5].

Существует широкий спектр предлагаемых сорбентов – неорганические, органические, комбинированные. В целом выбор адсорбента определяется на практике в первую очередь экономической эффективностью его применения. Затраты на адсорбенты окупаются приростом массы, яйценоскостью, качеством мяса [4].

Сегодня у специалистов хозяйств есть возможность выбрать сорбенты, предварительно оценив их, сопоставив такие показатели, как прочность и скорость связывания микотоксинов, степень адсорбции микроэлементов, витаминов, нормы ввода и другие. Выбор препаратов на современ-

ном рынке велик, предпочтение отдают комплексным препаратам, соединяющим в себе несколько функций.

Применение кормовых добавок в кормлении – важнейшее условие получения максимальной продуктивности и сохранения здоровья сельскохозяйственной птицы. Введение в состав рациона кормовых добавок оказывает влияние на биохимические процессы и физиологическое состояние организма птиц, обеспечивает повышение их сохранности и продуктивных качеств и ведет к снижению риска развития болезней, а также нормализации баланса питательных веществ [3, 7].

Это делает актуальным вопрос поиска новых подходов к составлению рационов, подготовки кормов к скармливанию, способствующих обеспечению организма необходимым количеством витаминов и минеральных веществ, для повышения устойчивости организма к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды и предотвращению интоксикаций.

Производитель ООО «Мол-Интер-Фуд» выпустил на рынок комплексные кормовые добавки «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал».

Кормовая добавка «Диар Стоп Адванс» является активированным комплексным адсорбентом микотоксинов и источником цинка для включения в рацион при профилактических и лечебных мероприятиях, способствующий выведению из желудочно-кишечного тракта патогенных микроорганизмов, повышению иммунного статуса организма, а также для обогащения и балансирования рационов по цинку.

Кормовая добавка «Токсинал» представляет собой комплексный адсорбент микотоксинов и других токсикантов, способствующий нормализации бактериального состава желудочно-кишечного тракта и поддержанию иммунной системы сельскохозяйственных животных и птицы.

Исследования сорбционной активности кормовых добавок по отношению к микотоксинам *in vitro* были проведены сотрудниками УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветери-

нарной медицины». По результатам исследований, кормовые добавки «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал» обладают высокой сорбционной активностью по отношению к широкому спектру микотоксинов (афлатоксина, зеараленона, охратоксина, дезоксиваленола, Т-2 токсина, фумазина, фузариотоксинов) при исследовании методом ИФА с использованием систем RYDAS-CRIN.

**Целью** наших исследований было изучение безопасности и эффективности новых кормовых добавок «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал» на цыплятах-бройлерах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Испытания эффективности кормовых добавок «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал» проводили в отделе болезней птиц, пчел и физико-химических исследований на базе вивария РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Объектом исследований служила птица кросса РОСС-308. Было сформировано две опытные и одна контрольная группы 14-суточных цыплят-бройлеров по 20 голов в каждой. На протяжении всего периода испытаний (28 дней) птице 1-й опытной группы совместно с комбикормом скармливали кормовую добавку «Диар Стоп Адванс», птице 2-й опытной группы – кормовую добавку «Токсинал» согласно инструкциям по их применению в количестве 1,0 г на 1 кг корма и 1,2 г на 1 кг корма соответственно. Птица контрольной группы получала обычный рацион (ОР). Вся птица содержалась в равных условиях, при одинаковом для всех режиме кормления, поения, обогрева и освещения.

За всей птицей было установлено клиническое наблюдение. Контрольное взвешивание проводили в начале опыта, через 14 и 28 дней (перед убоем).

В конце опыта (42-й день) была отобрана кровь для проведения гематологических и биохимических исследований. Кровь брали из подкрыльцовой вены.

Эритроциты и гемоглобин в цельной

крови определяли на эритрогемометре. Цельную кровь стабилизировали 1%-ным раствором гепарина. Биохимические показатели сыворотки крови (содержание общего белка, активность ферментов печени, уровень кальция, фосфора, магния, креатинина, мочевую кислоту) определяли с использованием наборов Cormeu на биохимическом анализаторе Dialab, активность супероксиддисмутазы (СОД) – при помощи набора фирмы «Анализ Х» непрямым спектрофотометрическим методом.

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием компьютерной программы Microsoft Office Exel и программы Statistica 6.0.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты изучения влияния кормовых добавок «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал» на показатели продуктивности цыплят-бройлеров кросса РОСС 308 представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Показатели продуктивности цыплят-бройлеров кросса РОСС 308 при введении в рацион кормовых добавок «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал»

Показатель	Ед. измерения	1-я опытная («Диар Стоп Адванс»)	2-я опытная («Токсинал»)	Контроль (ОР)
Поголовье	гол.	20	20	20
Сохранность	%	100	100	100
Пало	гол	0	0	0
Расход корма	к/ед. на 1 ц	1,93	1,94	1,99

В ходе проведения испытаний установлено, что включение кормовых добавок в комбикорма не оказывало отрицательного влияния на клинический статус, продуктивность и жизнеспособность цыплят-бройлеров. Сохранность в опытных и контрольной группах была 100 %. В опытных группах отмечено небольшое снижение расхода кор-

ма на 3,1 % и 2,5 % в 1-й и во 2-й группах соответственно по сравнению с контрольной группой. В течение всего периода наблюдения птица оставалась жива, активно потребляла корм и воду.

Результаты контрольного взвешивания представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Влияние кормовых добавок «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал» на прирост живой массы цыплят-бройлеров

Группа	Масса цыплят, г			Среднесуточный прирост живой массы, г
	в начале опыта	через 14 дней	через 28 дней	
1-я опытная («Диар Стоп Адванс»)	64,37±1,75	379,28±11,8	2526,4±41,9	58,6
2-я опытная («Токсинал»)	64,75±1,62	351±12,67	2505,57±30,19	58,1
Контрольная (ОР)	62,0±2,04	386±9,2	2427,6±20,3	56,3

Как видно из таблицы 2, при скармливании кормовых добавок «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал» отмечено повышение среднесуточного привеса на 2,3 г в 1-й опытной группе и на 1,8 г во 2-й опытной

группе, по сравнению с контрольной группой. Влияние новых кормовых добавок на гематологические и биохимические показатели крови и сыворотки крови цыплят-бройлеров представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3. – Гематологические показатели цыплят-бройлеров после применения кормовых добавок «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал»

Группа	Показатели		
	Гемоглобин, г/л	Эритроциты, млн/мл	Гематокрит, %
1-я опытная («Диар Стоп Адванс»)	92,2±3,9	2,55±0,2	29,3±0,4
2-я опытная («Токсинал»)	91,4±4,1	2,58±0,3	29,8±0,3
Контроль	87,3±5,8	2,52±0,1	28,6±0,4
Нормы	80–120	2,5–3,5	28–42

Из данных, представленных в таблице 3, следует, что гематологические показатели опытных и контрольной групп находились в пределах физиологической нормы.

Отмечено небольшое повышение значения гемоглобина у цыплят опытных групп (в 1-й группе на 5,6 %, во 2-й – на 4,6 %).

Таблица 4. – Биохимические показатели крови цыплят-бройлеров после применения кормовых добавок «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал»

Группы	АлТ, U/l	АсТ, U/l	СОД, Е/мл	Са, мМ/л	Р, мМ/л	Са/Р	Общ. белок, г/л	Mg, мМ/л	Мочевая кисл., мкМ/л,
Диар Стоп Адванс	14,45±5,15	192,2±17	24,66±5,73**	4,1±0,67	2,58±0,1	1,71	32±1,2	0,95±0,04	162,8±17,9***
Токсинал	9,5±5,24**	174,3±17,12*	26,7±3,47**	3,8±0,35	2,57±0,12	1,2	32,2±0,82	1,04±0,6	180,4±27,6***
Контроль	15,17±4,37	216,5±17,98	37,1±8,15	4,29±0,91	3,04±0,82	1,94	33,07±2,67	1,11±0,028	597±116,7
Норма	5,0–20,0	170,0–360	25–40	2,0–5,0	1,3–3,5	1,4–1,9	25–40	0,66–1,07	200–700

Примечание – \*P≤0,05 по сравнению с показателями контрольной группы; \*\*P≤0,01 по сравнению с показателями контрольной группы; \*\*\*P≤0,001 по сравнению с показателями контрольной группы

Как видно из таблицы 4, биохимические показатели крови у цыплят-бройлеров контрольной и опытных групп находились в пределах норм для этого кросса.

В основе многих токсикологических состояний организма лежат нарушения функционирования ферментных систем. Введение в рацион цыплят-бройлеров кормовой добавки «Токсинал» (2-я опытная группа) способствовало снижению ферментов в сыворотке крови. Нами установлено достоверное снижение активности аланинаминотрансферазы (АлТ) на 49,1 % (P≤0,01) в сыворотке крови цыплят-бройлеров, а активность аспаратаминотрансферазы (АсТ) в этой группе снизилась на 24,2 % (P≤0,05) по сравнению с контрольной группой. При

применении кормовой добавки «Диар Стоп Адванс» (1-я опытная группа) достоверной разницы активности ферментов АлТ и АсТ по сравнению с контрольной группой не наблюдалось. Отмечено снижение АсТ на 12,6 %. Так как степень повышения активности ферментов АсТ и АлТ в крови пропорциональна количеству поврежденных гепатоцитов и может быть результатом некроза клеток, нарушения целостности мембран, вызванной их повреждением (микотоксинами), то можно сделать вывод, что применение кормовых добавок «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал» способствуют нормализации активности ферментов.

Кроме того, в обеих опытных группах

выявлено снижение активности СОД: в 1-й на 66,4 % ( $P \leq 0,01$ ), во 2-й на 72,0 % ( $P \leq 0,01$ ) по сравнению с контрольной группой. Определение активности СОД занимает центральное место в системе ферментной защиты организма и является индикатором окислительного стресса. Снижение активности СОД в опытных группах свидетельствует о высокой сорбционной активности испытуемых кормовых добавок по отношению к токсинам, которые образуются в процессе реакций перекисного окисления липидов.

Мочевая кислота является основным продуктом метаболизма азотосодержащих соединений у птиц. В опытных группах нами установлено достоверное снижение значения мочевой кислоты у цыплят-бройлеров: в 1-й – в 3,7 раза ( $P \leq 0,001$ ), во 2-й – в 3,3 раза ( $P \leq 0,001$ ), что свидетельствует о том, что введение в рацион кормовых добавок приводит к улучшению процесса выделения мочевой кислоты и снижает риск образования подагры.

Применение кормовых добавок «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал» в рационе цыплят-бройлеров не привело к нарушению минерального состава крови. Концентрация кальция, фосфора и магния в опытных группах снизилась незначительно.

Полученные нами результаты исследований свидетельствуют о том, что кормовые добавки «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал» не оказывают отрицательного влияния на организм птицы. Применение сорбентов снижает токсическую нагрузку на организм. Данные добавки можно применять в качестве профилактических средств при контаминации кормов микотоксинами.

## ВЫВОДЫ

Включение кормовой добавки «Диар Стоп Адванс» в количестве 1,0 г на 1 кг комбикорма и «Токсинал» в количестве 1,2 г на 1 кг комбикорма не оказывало отрицательного влияния на продуктивность и жизнеспособность цыплят-бройлеров.

Применение кормовых добавок «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал» сопровождается снижением расхода кормов на 3,1 % и 2,5 % соответственно по сравнению с контрольной группой.

Применение сорбентов приводит к нормализации обменных процессов и снижает токсическую нагрузку на организм цыплят-бройлеров.

Применение кормовых добавок «Диар Стоп Адванс» и «Токсинал» снижает риск образования подагры.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бергиди, Г. *Мукотокс*<sup>R</sup> NG совершенное решение против микотоксинов / Г. Бергиди // *AB V. Периодическое издание компании «Сева Санте Анималь» для птицеводческих предприятий.* – 2013. – № 13. – С. 10–12.
2. Брылин, А. П. *Передовые технологии в борьбе с микотоксинами* / А. П. Брылин, В. Е. Брылина // *Наше сельское хозяйство. Ветеринария и животноводство.* – 2018. – № 6. – С. 38–41.
3. Невская, А. А. «ТоксиНон»: эффективность использования в бройлерном птицеводстве / А. А. Невская, И. А. Лебедева, Л. И. Дроздова // *Птица и птицепродукты.* – 2015. – № 6. – С. 29–31.
4. Околелова, Т. *Эффективность адсорбентов в кормах, контаминированных микотоксинами* // Т. Околелова, Р. Мансуров // *Птицеводство.* – 2013. – № 11. – С. 17–20.
5. Просвирякова, О. *Кормовая добавка «Сорбент-Стимулятор»* / О. Просвирякова, М. Полянский, В. Меньшиков // *Птицеводство.* – 2006. – № 1. – С. 8–10.
6. Фисинин, В. *Современные подходы к кормлению птицы* / В. Фисинин, И. Егоров // *Птицеводство.* – 2011. – № 3. – С. 7–9.
7. Хинрикс, М. *Влияние сорбента микотоксинов Биотокс на продуктивность бройлеров* / М. Хинрикс // *Птица и птицепродукты.* – 2011. – № 4. – С. 49–53.

УДК 619:615-614.9

Насонов И.В., доктор ветеринарных наук, доцент

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

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ СОРБЦИОННАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ МИКОТОКСИНОВ *IN VITRO*

### Резюме

В статье приведены результаты исследований сравнительной сорбционной эффективности сорбентных препаратов «Белветсорб», «Ультрасорб», «Трепел» и «Лигсорб» в отношении микотоксинов *in vitro*.

### Summary

The article presents the results of studies of the comparative sorption efficiency of sorbent preparations «Belvetsorb», «Ultrasorb», «Trepel» and «Ligsorb» in relation to micotoxins *in vitro*.

Поступила в редакцию 01.11.2018 г.

### ВВЕДЕНИЕ

В промышленном птицеводстве состояние здоровья птицы и её продуктивность в большой степени определяется кормлением. Влияние на продуктивность, рост, развитие и иммунологический статус птицы оказывает не только сбалансированность кормов по питательности, но и качественное их состояние.

Ввиду сложной геохимической ситуации, изменения климатических параметров и экологического равновесия, а также в результате отклонений от принятых технологий кормопроизводства, хранения зерна и увеличения объемов мировой торговли, часть производимых в настоящее время кормосмесей может быть одновременно поражено микотоксинами, бактериальными токсинами, метаболитами амбарных вредителей, содержать высокие уровни продуктов перекисного окисления жиров, тяжелых металлов, радионуклидов, нитратов, гербицидов и других высокотоксичных соединений [3].

Данные факторы действуют достаточно медленно, изменения накапливаются месяцами и только тогда становятся ощутимыми, когда выходят за пределы компенсаторных возможностей организма. Технологическое загрязнение окружающей среды приводит к нарастанию степени напряже-

ния механизмов адаптации, снижению защитных сил организма, развитию эндогенной интоксикации [6].

Микотоксины – это вторичные метаболиты микроскопических грибов (плесеней), обладающие токсичными свойствами. Плесневые грибы поражают корма при благоприятных условиях для их роста – оптимальной температуре и влажности. Подходящие условия для роста определенного вида гриба могут сложиться как в поле, так и в зернохранилищах. Микотоксины продуцируются в основном грибами рода *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*. Однако микотоксины выделяются и от многих других видов грибов при определенных условиях роста. Виды и количества продуцированных микотоксинов зависят от штамма гриба, условий роста, а также от наличия или отсутствия других микроорганизмов в той же среде обитания. Микотоксины накапливаются на спорах грибов, фрагментах клетки и субстратах (источники питания) [7].

Следствием размножения плесневых грибов в кормовом сырье являются:

- снижение питательности, поскольку поражающие кормовое сырье грибы используют питательные вещества для своего собственного роста;
- ухудшение вкусовых качеств, т.к. за-

ражение зерна некоторыми видами грибов приводит к появлению характерного отталкивающего запаха плесени и неприятного вкуса, снижающих потребление корма;

- наличие микотоксинов, приводящее к ухудшению здоровья, задержке роста животных и снижению их продуктивности [5].

Применение адсорбентов микотоксинов является наиболее распространенным подходом для профилактики и лечения микотоксикозов животных. Считается, что эти вещества связывают микотоксины, предотвращая их абсорбцию. Микотоксины и агенты экскретируются через кишечник. Эффективная доза включения в рацион адсорбентов микотоксинов будет зависеть от емкости адсорбентов и степени контаминации данного корма. Высокая связывающая способность снижает дозу включения и минимизирует снижение удельного веса питательных веществ при скармливании адсорбентов. Высокая доза включения адсорбентов также может изменять физические свойства корма и нарушать процессы обработки корма, такие, например, как гранулирование, а также изменять фактическую спецификацию рациона [1, 3].

Эффективным связывающим или секвестрирующим веществом считается вещество, способное предотвратить или ограничить абсорбцию микотоксинов из желудочно-кишечного тракта животных. Кроме того, они не должны содержать примесей и запаха. Следует отметить, что не все адсорбенты одинаково эффективны. Многие из них могут нарушать процесс утилизации питательных веществ, и их эффективность подтверждена главным образом только данными, полученными *in vitro*.

Наиболее важное свойство адсорбции – физическая структура адсорбента, т.е. общий заряд и распределение заряда, размер пор и площадь доступной поверхности. С другой стороны, такие свойства адсорбируемых молекул, микотоксинов, как полярность, растворимость, размер, форма и – в случае ионизированных составляющих – распределение заряда и константа диссоциации, также играют важную роль.

Поэтому эффективность каждого процесса адсорбции должна быть изучена в отношении специфических свойств адсорбируемых веществ [6].

Одним из наиболее доступных профилактических способов снижения негативного влияния некачественных кормов на организм птиц является введение в комбикорма энтеросорбентных препаратов [2]. Широкий производственный опыт свидетельствует, что в подавляющем большинстве случаев такой подход обходится намного дешевле, чем лечение многочисленных отравлений.

Энтеросорбция – способ детоксикации кормов. В настоящее время для энтеросорбции микотоксинов применяют различные адсорбенты: минеральные, органические и смешанные по составу (активированный древесный уголь, алюмосиликаты (цеолиты, ГНКАС, глины), полимеры (холестериламин, кросповидон), дрожжи и продукты из дрожжей. Перспективным направлением в детоксикации кормов энтеросорбционным методом является получение адсорбентов, обладающих селективностью к микотоксинам и не сорбирующих такие микронутриенты, как витамины и микроэлементы.

Препараты «Белветсорб» и «Ультрасорб» содержат специальным образом модифицированный активированный уголь марки АУТ-МИ (производитель Светлогорское ПО «Химволокно»). Модификация активированного угля продуктом взаимодействия двух полимеров (сульфат ацетата целлюлозы и хитозана) – интерполиэлектронитным комплексом, с одной стороны, позволяет получить сорбент с более прочными гранулами, а с другой – придать ему амфифильные свойства и высокую поглощательную способность. Такой композит при поглощении токсических веществ способен одновременно нормализовать основные биохимические показатели организма.

Цель работы – провести испытания сравнительной сорбционной эффективности препаратов «Белветсорб», «Ультрасорб», «Трепел» и «Лигсорб», разработанных в Беларуси, в отношении микотокси-

нов *in vitro*.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе применялись химические, аналитические, биохимические, токсикологические, клинические и статистические методы исследования.

В основу опытов была положена методика определения микотоксинов в кормовом сырье растительного происхождения и комбикормах для сельскохозяйственных животных и птицы методом ИФА с помощью тест-системы Ридаскрин.

Для сравнительного анализа в работе использовали сорбенты «Трепел», «Белветсорб», «Лигсорб» «Ультрасорб», разработанные преимущественно с целью сорбции микотоксинов.

В качестве тест-объектов были отобраны наиболее распространенные в кормовом сырье микотоксины: из группы афлатоксинов – афлатоксин В1 (АВ1), из группы трихотеценовых – Т-2 токсин (Т-2), из группы охратоксинов – охратоксин А (ОА), а также зеараленон (Зеар). Микотоксины были представлены в виде государственных стандартных растворов в следующих концентрациях: АВ1 – 9,8 мкг/мл, Зеар – 100,0 мкг/мл, ОА – 9,2 мкг/мл, Т-2 – 100,0 мкг/мл.

Количество сорбента, контактирующего с исходным раствором микотоксинов, определяли исходя из расчетной сорбционной емкости, которая соответствует 10 г/л исходного раствора микотоксинов (1 %). Для увеличения площади активной поверхности перед началом опытов некоторые сорбенты были измельчены в ступке до порошкообразного состояния.

Для определения сорбционной силы сорбентов «Трепел», «Белветсорб», «Лигсорб» и «Ультрасорб» к микотоксинам предварительно требовалось приготовить растворы микотоксинов с концентрациями 2 ПДК (предельно допустимая концентрация).

На 20 мл дистиллированной воды (рН 7,0) добавляли стандартные растворы микотоксинов в следующем объеме: афлатоксин В1 – 8 мкл, зеараленон – 80 мкл,

охратоксин А – 88 мкл, Т-2 токсин – 16 мкл, что соответствует значениям 2 ПДК. После приготовления навески адсорбентов добавлялись в растворы микотоксинов. Концентрация сорбентов составляла 10 мг/мл. Контрольные растворы: на 20 мл дистиллированной воды (рН 7,0) добавляли соответствующий микотоксин в указанных выше количествах. Готовые растворы в закрытых пробирках оставляли на контакт на шуттель-аппарате на 20 минут при комнатной температуре.

После инкубации 5,0 мл смеси фильтровали через бумажные фильтры. Фильтрат использовался для исследования по методу ИФА.

Иммуноферментный анализ (ИФА) – один из лабораторных методов диагностики микотоксинов. Типичная последовательность реакций при использовании готовых реактивов в формате микротитровального планшета следующая:

1. Ферментный конъюгат добавляется к экстракту испытуемого образца;
2. Смесь добавляется к соответствующим антителам, нанесенным на поверхность лунок планшета (микротитровальный планшет, сенсibilизированный антителами);
3. Количество соединенного с токсином конъюгата, связываемое иммобилизованными антителами зависит от количества токсина в образце: чем выше количество токсина в образце, тем ниже будет количество ферментного конъюгата, присоединившегося к антителам, нанесенным на поверхность лунок планшета, и наоборот;
4. Ферментативная активность связанного с поверхностными антителами конъюгата определяется добавлением соответствующего субстрата, что приводит к образованию окрашенных продуктов, концентрация которых обратно пропорциональна концентрации токсина в испытуемом образце.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

После обработки данных полученных в ИФА были проанализированы ре-

зультаты сравнительной сорбционной эффективности препаратов в отношении микотоксинов *in vitro*, приведенные в таблицах 1, 2, 3, 4.

Таблица 1. – Сорбционная активность сорбентов по зеараленону

№ пробы	Концентрация зеараленона в пробе	Сорбент	Концентрация зеараленона в пробе после экспозиции, мг/кг	% сорбции
28	2 пдк(80 мкл)	Трепел	0,969	38
29	2 пдк(80 мкл)	Ультрасорб	<0,05	>95
57	2 пдк(80 мкл)	Лигсорб	0,439	72
58	2 пдк(80 мкл)	Белветсорб	0,195	88
35	2 пдк(80 мкл)	Контроль (без сорбента)	1,563	0

По данным таблицы 1, наибольшую сорбционную активность по отношению к зеараленону *in vitro* проявили сорбенты

«Ультрасорб» и «Белветсорб» (>95 % и 88 %, соответственно), наименьшую – природный минерал «Трепел».

Таблица 2. – Сорбционная активность сорбентов по афлотоксину

№ пробы	Концентрация афлотоксина в пробе	Сорбент	Концентрация афлотоксина в пробе после экспозиции, мг/кг	% сорбции
16	2 пдк (8 мкл)	Трепел	0,009	10
17	2 пдк (8 мкл)	Ультрасорб	0,001	90
48	2 пдк (8 мкл)	Лигсорб	0,005	50
49	2 пдк (8 мкл)	Белветсорб	0,001	90
23	2 пдк (8 мкл)	Контроль (без сорбента)	0,010	0

По данным таблицы 2, наибольшую сорбционную активность по отношению к афлотоксину *in vitro* проявили сорбенты

«Ультрасорб» и «Белветсорб» (90 % и 90 % соответственно), наименьшую – природный минерал «Трепел».

Таблица 3. – Сорбционная активность сорбентов по Охратоксину А

№ пробы	Концентрация охратоксина А в пробе	Сорбент	Концентрация охратоксина А в пробе после экспозиции, мг/кг	% сорбции
28	2 пдк(88 мкл)	Трепел	0,512	33
34	2 пдк(88 мкл)	Ультрасорб	0,127	84
57	2 пдк(88 мкл)	Лигсорб	0,355	55
60	2 пдк(88 мкл)	Белветсорб	0,084	89
36	2 пдк(88 мкл)	Контроль (без сорбента)	0,762	0

По данным таблицы 3, наибольшую сорбционную активность по отношению к охратоксину А *in vitro* проявили сорбенты

«Ультрасорб» и «Белветсорб» (84 % и 89 %, соответственно), наименьшую – природный минерал «Трепел».

Таблица 4. – Сорбционная активность сорбентов по Т-2 токсину

№ пробы	Концентрация Т-2 токсина в пробе	Сорбент	Концентрация Т-2 токсина в пробе после экспозиции, мг/кг	% сорбции
4	2 пдк(88 мкл)	Трепел	0,775	32,5
5	2 пдк(88 мкл)	Ультрасорб	0,007	99,3
38	2 пдк(88 мкл)	Лигсорб	0,367	63,3
39	2 пдк(88 мкл)	Белветсорб	0,075	92,5
11	2 пдк(88 мкл)	Контроль (без сорбента)	1,000	0

По данным таблицы 4, наибольшую сорбционную активность по отношению к Т-2 токсину *in vitro* проявили сорбенты «Ультрасорб» и «Белветсорб» (99,3 % и 92,5 %, соответственно), наименьшую – природный минерал «Трепел».

Следует отметить достаточно низкую сорбционную активность минерала трепел из группы природных цеолитов по отношению к различным микотоксинам в нейтральной среде.

### ВЫВОДЫ

Сорбционная активность по отношению к зеараленону *in vitro* сорбентов «Ультрасорб», «Белветсорб», Лигсорб» и «Трепел» составила 95 % и 88 %, 72 % и

38 % соответственно.

2. Сорбционная активность по отношению к афлотоксину *in vitro* сорбентов «Ультрасорб», «Белветсорб», Лигсорб» и «Трепел» составила 90 %, 90 %, 50 % и 10 %, соответственно.

3. Сорбционная активность по отношению к охратоксину А *in vitro* сорбентов «Ультрасорб», «Белветсорб», Лигсорб» и «Трепел» составила 84 %, 89 %, 55 % и 33 % соответственно.

4. Сорбционная активность по отношению к Т-2 токсину *in vitro* сорбентов «Ультрасорб», «Белветсорб», Лигсорб» и «Трепел» составила 99,3 %, 92,5 %, 63,3 % и 32,5 % соответственно.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Антипов, В.А. Микотоксикозы животных и птиц на Кубани / В.А. Антипов, В.Ф. Васильев, Т.Г. Кутищева // Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний: материалы международного симпозиума, г. Казань, 28–30 ноября 2005. – Ч. I. – С. 42–47.
2. Ахмадышин, Р.А. Применение адсорбентов микотоксинов в животноводстве и птицеводстве / Р.А. Ахмадышин и др. // Ветеринарный врач. – 2006. – № 1. – С. 64–66.
3. Жуленко, В.Н. Ветеринарная токсикология / В.Н. Жуленко, М.И. Рабинович, Г.А. Таланов / под ред. В.Н. Жуленко. – М.: КолосС, 2004. – 384 с.
4. Комаров, А.А. Микотоксикозы животных: методическое пособие для профессиональной переподготовки работников АПК / А.А. Комаров, А.Н. Панин – М.: Пищепромиздат, 2003. – 82 с.
5. Кузнецов, А.Ф. Ветеринарная микология / А.Ф. Кузнецов. – СПб.: Лань. – 2001. – 416 с.
6. Сурай, П. Как микотоксины работают на молекулярном уровне / П. Сурай // Птицеводство. – 2004. – № 8. – С. 25–26.
7. Сэнтин, Э. Рост плесневых грибов и продуцирование микотоксинов / Э. Сэнтин // Европейский семинар по микотоксинам. Оценка воздействия микотоксинов в Европе / Европейский лекционный тур, 7 февраля – 5 марта 2005. – С. 27–42.

УДК 619:618.19-002

Гудзь В.П., кандидат ветеринарных наук

Белявский В.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент

УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно

## СОДЕРЖАНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ АНТИБИОТИКОВ В МОЛОКЕ КОРОВ ПОСЛЕ ВНУТРИМАТОЧНОГО И ИНТРАЦИСТЕРНАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ

### Резюме

*Проведены исследования по определению содержания остаточных количеств антибиотиков в молоке и сроков их выведения после внутриматочного и интрацистернального введения при эндометритах и маститах коров. Установлено, что рекомендуемые сроки ожидания для использования молока в пищу после последнего применения изучаемых антибиотиков позволяют получать сырье, соответствующее требованиям законодательства Евразийского экономического союза.*

### Summary

*Studies were conducted to determine the amount of residual antibiotic in milk and the timing of their elimination after their intrauterine and intracisternal administration with endometritis and cow mastitis. It has been established that the recommended waiting times for the use of milk in food after the last application of the antibiotics studied make it possible to obtain raw materials that meet the requirements of the legislation of the Eurasian Economic Union.*

*Поступила в редакцию 01.11.2018 г.*

### ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных задач, стоящих перед агропромышленным комплексом и здравоохранением Республики Беларусь, является обеспечение производства безопасной пищевой продукции. В последние годы особое значение приобретает проблема предупреждения контаминации животноводческой продукции остаточными количествами антибиотиков. Рост потребления мясной и молочной продукции требует интенсификации производства соответствующих отраслей животноводства, что в свою очередь неизбежно ведет к увеличению использования антимикробных ветеринарных препаратов [2, 8, 14].

Отдельные ученые отмечают, что остаточные количества антибиотиков обнаруживаются в 15–26 % животноводческой и птицеводческой продукции [6, 7]. В 2009–2010 гг., по данным российских исследователей Центра независимых потребительских экспертиз «ТЕСТ», в трех образцах молока из десяти были обнаружены следы антибиотиков [10].

В развитых странах проблема поступления в организм человека остаточных ко-

личеств антибактериальных препаратов имеет большое социально-экономическое значение и рассматривается как угроза национальной безопасности. Активное использование антибиотиков в животноводстве может способствовать возникновению ряда негативных последствий как для самих животных, так и для людей, употребляющих в пищу контаминированные продукты животного происхождения. Для человека наиболее распространенными отрицательными последствиями употребления в пищу продуктов, содержащих остаточные количества антибиотиков, являются развитие у патогенных микроорганизмов антибиотикорезистентности, изменение кишечной микрофлоры, нарушение синтеза витаминов, возникновение вторичных грибковых инфекций, аллергических и онкологических заболеваний [1; 4; 11; 13; 16].

Кроме того, наличие остаточных количеств антибиотиков в молоке представляет серьезную проблему и для молочной промышленности, поскольку они могут нарушить производственный процесс, ингибируя заквасочную микрофлору. В этом случае становится невозможным производ-

ство сыров, кисломолочных продуктов и масла. Также, содержание остаточных количеств антибиотиков не позволяет дать правильную оценку ферментативным процессам и эффективности пастеризации [5; 9; 12].

Особую обеспокоенность вызывает тот факт, что по данным результатов многочисленных исследований Международной молочной федерации, а также по сообщениям Европейской ассоциации животноводов клиническая сочетанная форма мастита и эндометрита диагностируется у 20,0–25,0 %, а субклиническая – у 35,0–50,0 % коров молочного стада. При этом применение современных комплексных антибиотических препаратов является основным способом быстрого и эффективного лечения коров [3, 15].

В этой связи практическую значимость представляет изучение вопроса о содержании остаточных количеств антибиотиков в молоке после внутриматочного и интрацистерального введения согласно инструкциям по применению антимикробных ветеринарных препаратов, которые наиболее часто применяются для лечения коров с маститами и эндометритами.

**Целью** нашей работы было определить остаточные количества антибиотиков в молоке и сроки их выведения с молоком у коров после их внутриматочного и интрацистерального применения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в СПП «АгроМир» на МТК «Галово» Берестовицкого района и в ОАО «Хатьковцы» на МТК «Яново» Волковысского района.

В СПП «АгроМир» на МТК «Галово» Берестовицкого района для проведения исследований по принципу парных аналогов были подобраны коровы черно-пестрой породы и сформированы группы: 1-я опытная, 2-я опытная и 3-я опытная по 5 голов в каждой.

Коровам 1-й опытной группы, больным субклиническим маститом, в пораженную четверть вымени один раз в сутки вво-

дили по 10 мл лекарственного препарата «Ваккамаст» (АДВ линкомицина гидрохлорид) в течение 3 дней.

Коровам 2-й опытной группы, больным клиническим маститом, в пораженную четверть вымени один раз в сутки вводили по 10 мл ветеринарного препарата «Норфлоксамаст» (АДВ норфлоксацина никотината) в течение 5 дней.

Коровам 3-й опытной группы, больным эндометритом, внутриматочно с интервалом 24 часа вводили по 150 мл лекарственного препарата «Эндометрамаг-Т» (АДВ тилозин) в течение 5 дней.

Через 24 и 120 часов после истечения сроков ожидания, согласно инструкциям по применению препаратов, отбирали пробы молока и исследовали на наличие остаточных количеств антибиотиков в ГУ «Белгосветцентр». Отбор проб производился в соответствии с ГОСТ 26809.1-2014. Исследования проводились в соответствии с СОП 12.1Б от 12.12.2012 при помощи жидкостного хроматографа Agilent 1290 и масс-спектрометров квадрупольных Agilent 6430 и Agilent 6460. Чувствительность метода – 0,001 мг/кг.

В ОАО «Хатьковцы» на МТК «Яново» Волковысского района для проведения исследований по принципу аналогичных групп были подобраны коровы черно-пестрой породы с воспалительными процессами в матке или молочной железе из которых были сформированы 3 опытные группы по 5 голов в каждой.

Коровам 1-й опытной группы, больным эндометритом, после предварительного освобождения полости матки от воспалительного экссудата внутриматочно трехкратно с интервалом 48 часов вводили по 50 мл лекарственного препарата «Тилокар» (АДВ тилозина тартрат и неомицина сульфат).

Коровам 2-й опытной группы, больным клинической формой мастита, после предварительного освобождения от секрета в пораженную четверть вымени один раз в сутки в течение 3-х дней вводили по 10 мл лекарственного препарата «Мастолексин» (АДВ цефалексина моногидрат и гентамицина сульфат).

Коровам 3-й опытной группы, больным эндометритом, после освобождения полости матки от воспалительного экссудата внутриматочно однократно вводили по 19 г (один шприц) лекарственного препарата «Метрикур» (АДВ цефапирин).

Отбор проб проводили по истечении сроков ожидания после последнего введения препаратов согласно инструкциям по их применению: тилокар – через 48 часов, мастолексин – через 4 дня, метрикур (без ограничений) – через 8 часов после последнего применения препаратов. Отбор проб производился в соответствии с ГОСТ 26809.1-2014. Исследования на наличие остаточных количеств антибиотиков также проводили в ГУ «Белгосветцентр» в соответствии с СОП 12.1Б от 12.12.2012 при помощи жидкостного хроматографа Agilent 1290 и масс-спектрометров квадрупольных Agilent 6430 и Agilent 6460. Чувствительность метода – 0,001 мг/кг.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По результатам исследований установлено, что при использовании препарата «Ваккамаст» остаточные количества линкомицина в пробах молока, отобранных через 24 часа после истечения сроков ожидания, не обнаружены.

При применении препарата «Норфлоксамаст» остаточные количества норфлоксацина были обнаружены во всех пяти пробах молока, отобранных через 24 часа после истечения сроков ожидания, указанных в инструкции по применению препарата, в количествах 0,0019 мг/кг, 0,0022 мг/кг, 0,0045 мг/кг, 0,0070 мг/кг и 0,0143 мг/кг.

По результатам испытаний проб молока, отобранных через 120 часов после истечения сроков ожидания, в трех пробах от тех коров, у которых ранее были обнаружены остаточные количества норфлоксацина в количествах 0,0045 мг/кг, 0,0070 мг/кг и 0,0143 мг/кг, также было обнаружено АДВ норфлоксамаста, но в меньших концентрациях: 0,0010 мг/кг, 0,0011 мг/кг и 0,0034 мг/кг соответственно.

Таким образом, можно отметить, что

через 96 часов после первого исследования проб молока, полученного от подопытных животных, присутствие антимикробного компонента в нём сохранилось, однако концентрация его молока снизилась соответственно в 4,5, в 6,4 и в 4,2 раза.

При применении препарата «Эндо-метромаг-Т» остаточные количества тилозина были обнаружены в одной из проб молока, отобранных через 24 часа после истечения сроков ожидания, в количестве 0,00104 мг/кг, и не обнаруживались в пробах, отобранных через 120 часов после истечения сроков ожидания согласно инструкции по применению препарата.

В пробах молока, отобранных от коров, которым согласно инструкции по применению с лечебной целью вводили антимикробные ветеринарные препараты «Тилокар», «Мастолексин» и «Метрикур», после соблюдения установленных сроков ожидания остаточные количества антибиотиков в пределах чувствительности метода (0,001 мг/кг) не обнаружены.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что остаточные количества норфлоксацина после интрацестерального введения препарата «Норфлоксамаст» были обнаружены в пяти пробах молока через 24 часа после истечения необходимых сроков ожидания, указанных в инструкции по применению препарата в количествах от 0,0019 мг/кг до 0,0143 мг/кг. Кроме того, остаточные количества норфлоксацина были обнаружены в трех пробах молока, отобранных через 120 часов после истечения сроков ожидания, в количествах от 0,0010 мг/кг до 0,0034 мг/кг.

После внутриматочного применения препарата «Эндо-метромаг-Т» в пробе молока отобранной через 24 часа после истечения сроков ожидания, обнаружили антибиотик тилозин в количестве 0,00104 мг/кг.

В пробах молока, отобранных через 24 часа после истечения сроков ожидания для препарата «Ваккамаст», остаточных количеств линкомицина не обнаруживали.

В исследуемых пробах молока, отобранных от коров после соблюдения перио-

да ожидания согласно инструкциям по применению препаратов:

- «Тилокар» остаточных количеств тилозина и неомицина не обнаруживали;
- «Мастолексин» остаточных количеств цефалексина и гентамицина не обнаруживали;
- «Метрикур» остаточных количеств цефапирина не обнаруживали.

Вместе с тем, выявленные в ходе исследований остаточные количества антибиотиков в молоке не превышали максимально допустимых уровней для данных ветеринарных лекарственных средств, установленных Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13 февраля 2018 года № 28.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Азыркина, И.М. Определение остаточных количеств макролидов и  $\beta$ -лактамов в продукции птицеводства микробиологическим методом / И.М. Азыркина // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства: сб. науч. тр. / БГСХА. – 2017. – № 20–2. – С. 241–248.
2. Амелин, В.Г. Идентификация и определение антибиотиков различных классов в пищевых продуктах и кормах методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией / ионизацией / В.Г. Амелин, Т.А. Краснова // Журнал аналитической химии. – 2015. – Т. 70. – № 7. – С. 734–744.
3. Заугольникова, М.А., Выявление антибиотиков в молоке методом иммуноферментного анализа / М.А. Заугольникова, В.П. Висовская // Ломоносовские чтения на Алтае – фундаментальные проблемы науки и образования: сб. науч. ст. междунар. конф., АГУ. – 2015. – С. 1584–1587.
4. Заугольникова, М.А. Изучение контаминации животноводческой продукции остаточными количествами антибиотиков / М.А. Заугольникова, В.П. Висовская // Acta Biologica Sibirica. – 2016. – Т. 2. – № 3. – С. 9–20.
5. Гашева, М.А. Определение антибиотиков в молоке – залог качественной продукции / М.А. Гашева // Повышение качества и безопасности пищевых продуктов: материалы VI Всероссийской науч.-практ. конф. – 2016. – С. 50–52.
6. Донкова, Н.В. Контаминация антибиотиками птицепродукции в условиях эксперимента / Н.В. Донкова // Вестник Омского государственного аграрного университета. – 2012. – № 4 (8). – С. 74–78.
7. Донкова, Н.В. Цитоморфологические основы контаминации птицеводческой продукции остатками лекарственных препаратов / Н.В. Донкова, Е.Г. Турицына // Вестник КрасГАУ. – 2011. – № 2. – С. 130–133.
8. Кальнищкая, О.И. Ветеринарно-санитарный контроль остаточных количеств антибиотиков в сырье и продуктах животного происхождения: дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.06 / О.И. Кальнищкая. – Москва, 2008. – 343 л.
9. Кальнищкая, О.И. Методы определения антибиотиков / О.И. Кальнищкая // Молочная промышленность. – 2009. – № 6. – С. 82–83.
10. Клетикова, Л.В. Эколого-гигиенические аспекты применения антибиотиков / Л.В. Клетикова, Б.Ф. Бессарабов, А.Б. Козлов // Научный поиск. – 2013. № 2. – С. 36–39.
11. Ковальчук, С.Н. Остаточные количества антибиотиков в мясе перепелов при их применении с кормом / С.Н. Ковальчук // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2012. – № 3. – С. 86–89.
12. Контроль ингибирующих веществ в молоке / Г.В. Родионов [и др.] // Молочная промышленность. – 2008. – № 2. – С. 17–18.
13. Кремлева, А.А. Контроль содержания антибиотиков в сырье и продуктах животного происхождения в условиях Курагинского района Красноярского края / А.А. Кремлева // Сб. науч. тр. Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. – 2014. – Т. 2. – № 7. – С. 383–386.
14. Определение остаточных количеств антимикробных веществ в сырье и пищевых продуктах с помощью иммуномикрочипового метода / В.В. Светличкин [и др.] // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2011. – № 2(6). – С. 27–29.
15. Родин, Н.В. Верификация диагноза и терапия коров в начале лактации при синдроме «мастит-эндометрит»: дис. ... канд. вет. наук: 06.02.06 / Н.В. Родин. – Саратов, 2016. – 142 л.
16. Шупилова, Е.П. Определение содержания остаточных количеств стрептомицина в молочной продукции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / Е.П. Шупилова, И.В. Буко, О.В. Шуляковская // Здоровье и окружающая среда. – 2015. – Т. 2. – № 25. – С. 221–226.

УДК 636:636.087.8

Мясцова Т.Я., кандидат ветеринарных наук, доцент  
Якубовский М.В., доктор ветеринарных наук, профессор

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

## ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА «ПРАЗИФЕН» НА ОРГАНИЗМ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

### Резюме

По результатам изучения токсикологических свойств ангельминтный препарат «Празифен» относится к веществам малоопасным по ГОСТ 12.1.007-76, т.е. к веществам 4-го класса опасности и не оказывает отрицательного воздействия на организм кроликов, способствует увеличению гамма- и бета-глобулинов в сыворотке крови животных на 15-й и 21-й день наблюдений и повышает привесы животных на 37,94 % – 34,61 %.

### Summary

According to the results of the study of Toxicological properties of anthelmintic drug «Prazifen» refers to substances low-risk according to GOST 12.1.007-76, ie, to substances of the 4th class of danger and does not have a negative impact on the body of rabbits, increases gamma and beta - globulins in animal serum on the 15th and 21st day of observation and increases the weight gain of animals by 37.94 % – 34.61 %.

Поступила в редакцию 05.11.2018 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Благополучие рыбоводческих хозяйств по инфекционным и инвазионным болезням является важнейшим условием развития их производства.

Для карповых рыб опасность представляют: кавиоз и ботриоцефалез (вызываемые цестодами *pp. Khawia* и *Bothriocephalus*, паразитирующими в кишечнике), лигулез (возбудитель – цестоды *pp. Ligula* и *Digramma*, паразитирующие в полости тела), филометроидоз (нематоды *p. Philomethroides*, обитающие в плавательном пузыре и чешуйных кармашках), диплостомоз (трематоды *p. Diplostomum*, паразитирующие чаще всего в глазах) и другие. Гельминтозы наносят значительный экономический ущерб рыбоводческой отрасли.

В течение 2016–2018 гг. нами разработан комплексный препарат «Празифен» для лечения гельминтозов карповых рыб. При изучении острой токсичности при внутрижелудочном введении белым мышам комплексного препарата «Празифен» установлено, что среднесмертельная доза LD<sub>50</sub> равна 10800 мг/кг массы тела. В хроническом опыте препарат не вызывает ка-

ких-либо отклонений от физиологической нормы в клиническом состоянии белых мышшей, получавших препарат в дозах 1/10 (1080 мг/кг), 1/20 (540 мг/кг) и 1/50 (216 мг/кг) дозы LD<sub>50</sub> [3].

Эмбриотоксическими и тератогенными свойствами комплексный препарат «Празифен» при скармливании его белым крысам в различные сроки беременности не обладает.

На основании полученных результатов исследований по изучению острой и хронической токсичности, эмбриотоксическому, тератогенному, раздражающему, алергизирующему и сенсibiliзирующим свойствам можно заключить, что комплексный препарат «Празифен» относится к веществам малоопасным по ГОСТ 12.1.007-76, т.е. к веществам 4-го класса опасности.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение раздражающего, алергизирующего действия празифена и влияния его на организм лабораторных животных проводили согласно «Методическим указани-

ям по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии» (Минск, 2007) [1].

Определение раздражающего действия комплексного препарата на слизистые оболочки проводили методом конъюнктивальной пробы на 3 кроликах массой 1,8–2,1 кг. Для этого 50 мг тонко растертого комплексного препарата вносили в конъюнктивальный мешок правого глаза, левый глаз служил контролем. Учет реакции животного учитывали по наличию слезотечения, птоза, блефароспазма, инъектирования сосудов белковой оболочки глаза и слизистой, набуханию век и т.д. При этом учитывали их выраженность и длительность проявления.

Изучение кожно-раздражающего действия комплексного препарата на кожные покровы проводили на 6 кроликах массой 1,7–2,0 кг и 6 морских свинок живой массой 130–180 г. Препарат в разведениях 1:10, 1:50 и концентрат на этаноле наносили на предварительно выстриженные боковые участки поверхности кожи кроликов и морских свинок (правая сторона). Контролем служила противоположная сторона тела. За животными вели клиническое наблюдение и учитывали местную кожную реакцию через 30 мин., 24 и 72 часа (наличие гиперемии, отека, утолщения кожной складки, расчесы). Учет реакции проводили по шкале Драйзера: 0 – эритема отсутствует; 1 – очень слабая, т.е. едва заметная; 2 – хорошо выраженная; 3 – умеренная и 4 – сильная. Толщину кожной складки измеряли с помощью кутиметра: 0 – отек отсутствует; 1 – очень слабый отек, т.е. едва заметный; 2 – слабый, края участка приподняты на 0,1–0,5 мм; 3 – умеренный отек, поверхность приподнимается более чем на 0,5 мм и 4 – сильный отек, поверхность приподнимается более чем на 1 мм.

Для изучения алергизирующих и сенсibiliзирующих свойств комплексного препарата использовали метод накожных аппликаций. В опыте было использовано 5 морских свинок. Сенсibiliзацию проводили путем 15-кратных аппликаций комп-

лексного препарата на один и тот же участок кожи. На выстриженный участок кожи размером 2×3 см ежедневно наносили в дозе 0,1 мл в виде аппликаций комплексный препарат на 40°-ном этаноле в разведении 1:10. Контрольным животным (2 гол.) ежедневно в течение 15 суток наносили в этой же дозе 40°-ный этанол. Затем после 14-дневного перерыва с момента последней аппликации на свежесстриженные участки кожи с противоположной стороны наносили разрешающую дозу препарата в той же дозе. Клинические наблюдения проводили в течение 5 дней после нанесения разрешающей дозы препарата. Учитывали общее клиническое состояние животных, наличие на месте нанесения веществ эритемы, отека кожи по вышеописанной шкале Драйзера, а также геморрагий и некроза.

Для изучения влияния комплексного препарата «Празифен» на некоторые иммунобиологические показатели сформировали 3 группы кроликов – 2 опытные и 1 контрольная группы по три головы в каждой с массой тела 2,0–2,5 кг. Каждый кролик содержался в индивидуальной клетке. Кроликам 1 группы вводили препарат «Празифен» в дозе 50 мг/кг массы тела, животным 2 группы – в дозе 250 мг/кг массы тела. Обе группы кроликов получали препарат с кормом один раз в день в течение трех дней. Животные 3 группы – препарат не получали и служили контролем.

За животными ежедневно вели клинические наблюдения и регистрировали изменения в их состоянии. Взятие крови провели до применения препарата и через 8, 15 и 21 день после его скармливания.

Исследование гематологических показателей крови проводили (гемоглобин, эритроциты, лейкоциты и др.) на анализаторе Mythic 18. Выводили лейкоцитарную формулу по общепринятой методике. Биохимические показатели (общий белок, АСТ, АЛТ, ЩФ, глюкозу и др.), определяли с использованием наборов на биохимическом анализаторе Dialab Autolyser. Полученный цифровой материал обработали статистически с помощью программ статистического анализа Excel, Statistica 6.0 и с

учетом рекомендаций П.Ф. Рокицкого (1967).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Через 3–5 минут после внесения препарата в конъюнктивальный мешок наблюдали слабое раздражающее действие, а именно кратковременное – (30–40 мин.) слезотечение и легкое покраснение слизистой оболочки глаза.

В течение всего периода наблюдений изменений в общем клиническом состоянии животных не происходило, раздражения, отека со стороны кожных покровов также не отмечалось. При нанесении разрешающей дозы препарата реакция со стороны кожи и организма животных отсутствовала, что свидетельствует об отсутствии у препарата «Празифен» аллергенных и сенсибилизирующих свойств.

На основании полученных результатов исследований по изучению острой и хронической токсичности, эмбриотоксическому, тератогенному, раздражающему, ал-

лергизирующему и сенсибилизирующим свойствам можно заключить, что комплексный препарат «Празифен» относится к веществам малоопасным по ГОСТ 12.1.007-76, т.е. к веществам 4-го класса опасности.

При изучении влияния комплексного препарата «Празифен» на некоторые иммунобиологические показатели организма лабораторных животных установлено, что после применения препарата в клиническом состоянии кроликов отклонений от физиологической нормы не наблюдалось: животные были подвижны, активны, хорошо реагировали на внешние раздражители, охотно поедали траву и комбикорм, шерстный покров оставался гладким и чистым. Нарушений в работе желудочно-кишечного тракта отмечено не было.

Результаты изучения гематологических изменений в крови кроликов после применения препарата представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. – Динамика гематологических показателей кроликов после применения препарата «Празифен»

Дни исследований	Доза препарата, мг/кг массы тела		Контроль
	50	250	
1	2	3	4
Эритроциты, *10 <sup>12</sup> /л N (норма)=4,5–7,5 10 <sup>12</sup> /л			
до применения	4,6±0,62	4,27±0,44	4,23±0,2
через 8 дней	4,55±0,30	4,54±0,33	4,26±0,47
через 15 дней	4,78±0,3	4,92±0,10	4,74±0,20
через 21 день	4,28±0,4	4,89±0,07	4,51±0,13
Гемоглобин, ммоль/л N=100,5–120 ммоль/л			
до применения	102±7,53	96,33±2,4	96,5±0,6
через 8 дней	100,33±2,06	100,33±3,76	95±8,56
через 15 дней	105,66±4,10	109,0±1,02	102,33±1,36
через 21 день	102,66±1,36	100,33±1,36	103,33±1,36
Гематокрит ht N = 0,35–0,45 L/L			
до применения	0,26±0,01	0,26±0,01	0,26±0,001
через 8 дней	0,25±0,01	0,23±0,02	0,248±0,02
через 15 дней	0,282±0,01	0,29±0,03	0,276±0,01
через 21 день	0,276±0,01	0,286±0,003	0,267±0,01

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
Среднеклеточная концентрация гемоглобина, 10 g/L			
до применения	382±5,47	373,33±7,19	374,5±1,87
через 8 дней	378±0,68	378,33±7,87	383,33±3,76
через 15 дней	374,33±4,10	375,66±3,42	370,67±1,36
через 21 день	372±8,56	378±1,71	382,33±6,16
Тромбоциты, *10 <sup>9</sup> /л N= 130–900 *10 <sup>9</sup> /л			
до применения	627±184,93	486±28,76	597±16,25
через 8 дней	507,33±78,76	393,66±58,21	348,33±37,67
через 15 дней	479,33±99,34	317,33±68,49	295,67±18,15
через 21 день	437,66±15,06	415,66±10,27	294,33±13,69
Средний объем тромбоцита			
до применения	5,4±0,13	5,76±0,41	5,25±0,18
через 8 дней	5,03±0,1	5,2±0,27	5,27±0,20
через 15 дней	4,97±0,13	5,5±0,41	5,23±0,20
через 21 день	5,06±0,03	5,43±0,23	5,23±0,18
Лимфоциты, %			
до применения	96,86±0,3	96,3±0,34	97,45±0,06
через 8 дней	97,63±0,54	97,63±0,17	97,57±12,67
через 15 дней	97,2±0,71	98,17±0,51	97,97±0,85
через 21 день	97,23±0,65	97,36±0,20	97,07±0,95

Из анализа данных таблиц 1 и 2 следует, что достоверных изменений количественных и качественных показателей крови в течение всего периода наблюдений не происходило, и их колебания были в пределах физиологической нормы.

В таблице 3 представлены результаты исследований по изучению активности ферментов сыворотки крови, свидетельствующих о состоянии печени кроликов при воздействии препарата «Празифен».

В течение всего периода наблюдений

в динамике активности ферментов печени в сыворотке крови отмечались недостоверные колебания в пределах физиологической нормы.

Изучение активности креатинина в сыворотке крови показало, что она составляла 66,65±7,53–93,43±5,68 mmol/L на уровне контрольных животных, и это свидетельствует об отсутствии отрицательного действия празифена на функциональную деятельность почек.

Таблица 2. – Влияние препарата «Празифен» на количественный и качественный состав клеток белой крови

Доза препарата и кратность применения	Время исследований	Лейкоциты, *10 <sup>9</sup> /л	Лейкоцитарная формула, %					
			Базофилы	Эозинофилы	Палочкоядерные нейтрофилы	Сегментоядерные нейтрофилы	Лимфоциты	Моноциты
	<b>Норма</b>	<b>6,5–9,5 *10<sup>9</sup>/л</b>	<b>0–4</b>	<b>0–2</b>	<b>2–3</b>	<b>20–80</b>	<b>25–85</b>	<b>2–10</b>
50 мг/ кг трижды	до применения	8,5±1,13	0	2,66±0,34	0	17,66±5,34	78,33±6,5	1±0,34
	через 8 дней	8,3±1,43	0	1,33±0,68	0,66±0,68	31,66±3,76	64,33±5,13	2±0,68
	через 15 дней	8,07±1,06	0	0,66±0,68	0	30±5,16	65,66±3,42	2,66±0,68
	через 21 день	8,51±0,23	0	1,66±0,34	0	32,33±2,05	62,66±2,39	1,66±0,34
250 мг/кг трижды	до применения	10,63±1,19	0	2±0	0	20,33±1,36	76,67±1,71	0,67±0,34
	через 8 дней	8,93±0,71	0	1,66±0,68	0,66±0,34	35,33±2,39	59,66±2,39	1,67±0,34
	через 15 дней	7,73±1,06	0	1,33±0,34	0	32±3,42	65,0±4,10	1,66±0,34
	через 21 день	7,6±0,54	0	2±0	1,33±0,34	30,33±2,05	65,33±2,05	1,0±0
Контроль	до применения	9,15±0,62	0	2±0,34	0	28±2,17	68±4,79	1,5±0,34
	через 8 дней	6,83±1,19	0	1±0,68	0	35±0,68	62±0,68	2,0±0
	через 15 дней	7,8±2,08	0	1±0	0,33±0,34	29±4,45	68±4,79	1,66±0,34
	через 21 день	7,8±0,30	0	1,33±0,34	0	31,33±3,08	65,33±2,73	1±0

Трехкратное и пятикратное применение препарата «Празифен» в терапевтической дозе не оказывает влияния на работу поджелудочной железы, так как содержа-

ние амилазы в сыворотке крови 126,3±12,32–213,53±17,67 U/l против 133,42±8,21–197,13±10,61 U/l у контрольных животных при норме 167–315 U/l.

Таблица 3. – Динамика активности ферментов в сыворотке крови кроликов

Доза препарата и кратность применения	Дни исследования	Аланин-амино-трансфераза ALAT	Щелочная фосфатаза ALP	Амилаза AMYL	Билирубин общий BIL-Co	Креатинкиназа CK-Co	Креатинин CREA-co	3,6 гамма-глутамил-трансфераза GGT-co	Глюкоза GLUC-Co	Холестерин CHOL-Co
Физиологическая норма		26-60 U/l	19-173 U/l	167-315 U/l	3,4-8,5 mmol/L	218-2705 U/l	44-221 mmol/L	0-14 U/l	4,1-8,5 mmol/L	0,91-1,37 mmol/L
50 мг/кг трижды	До применения	142,46±20,97	122,20±10,25	131,56±11,64	4,6±0,68	2547±65,06	75,59±7,53	17,03±4,45	3,29±1,30	2,31±0,23
	через 8 дней	161,83±14,82	160,83±15,54	152,74±26,71	3,83±0,08	2928,66±92,46	76,683±7,53	17,57±0,36	3,61±4,79	1,28±0,19
	через 15 дней	160,96±24,72	146,31±14,28	172,8±22,66	3,85±0,02	2381,66±44,52	76,49±2,39	15,24±1,02	3,363±0,41	1,88±0,09
	через 21 день	179,89±12,95	134,76±13,48	213,53±17,67	4,03±0,05	2774±61,64*	93,43±5,68	17,48±6,87	5,8±0,65	2,34±0,11
250 мг/кг трижды	До применения	121,98±3,42	105,59±9,24	183,1±13,35	3,53±0,12	2550±47,94	73,76±4,10	17,03±4,10	4,35±0,32	2,95±0,09
	через 8 дней	97,57±0,71	145,4±7,53	126,3±12,32	3,23±0,10	2682±61,64	66,65±7,53	15,83±1,36	3,15±0,36	1,47±0,17
	через 15 дней	114,77±0,93	138,23±10,20	134,47±22,94	3,97±0,34	2672,66±92,46	71,75±7,53	12,00±1,71	4,51±0,44	1,53±0,17
	через 21 день	135,73±7,53	134,52±15,68	159,26±23,97	5,30±0,08*	2924,66±64,38	76,41±2,39	10,13±1,36	4,86±0,23	1,87±0,04*
Конт-роль	До применения	114,35±5,47	121,4±0,9	133,42±8,21	4,13±0,51	2631,5±98,62	80,31±1,36	14,23±2,05	4,29±0,34	2,92±0,03
	через 8 дней	84,12±2,63	181,63±14,52	153,26±12,32	3,51±0,13	2078,33±60,27	80,84±8,56	16,32±2,73	3,01±0,29	1,84±0,17
	через 15 дней	102,39±2,39	172,56±10,89	188,26±18,08	3,64±0,14	2229,33±47,25	91,39±8,56	18,10±0,34	4,16±0,51	1,76±0,04
	через 21 день	133,36±5,95	162,36±17,67	197,13±10,61	3,57±0,35	3595±82,19	85,59±34,45	19,97±4,10	5±0,32	2,35±0,09

Примечание – \* P<0,05

Содержание микро- и макроэлементов в сыворотке крови кроликов также не претерпело статистически достоверных изменений (таблица 4).

Таблица 4. – Динамика количества микро- и макроэлементов в сыворотке крови кроликов

Доза препарата и кратность применения	Дни исследований	Кальций	Фосфор	Магний
	физиологическая норма	1,4-3,1 mmol/L	1,3-2,2 mmol/L	0,82-1,56 mmol/L
50 мг/кг трижды	до применения	4,71±0,21	1,45±0,29	1,97±0,10
	через 8 дней	4,47±0,15	1,51±0,14	1,85±0,02
	через 15 дней	4,56±0,18	1,61±0,12	1,86±0,07
	через 21 день	4,79±0,05	2,1±0,22	2,45±0,13
250 мг/кг трижды	До	4,53±0,05	1,85±0,16	2,29±0,41
	через 8 дней	4,53±0,18	1,44±0,10	1,80±0,08
	через 15 дней	4,45±0,19	1,43±0,05	1,76±0,09
	через 21 день	4,72±0,19	1,88±0,03	2,35±0,16
Контроль	до применения	4,09±0,01	1,83±0,02	1,86±0,01
	через 8 дней	4,13±0,09	1,61±0,06	1,86±0,04
	через 15 дней	4,17±0,09	1,57±0,08	1,81±0,07
	через 21 день	4,33±0,34	1,65±0,02	2,3±0,06

Содержание общего белка в сыворотке крови кроликов в течение всего периода наблюдений находилось в пределах физиологической нормы (таблица 5).

Таблица 5. – Динамика общего белка в сыворотке крови кроликов после применения празифена

Группа	Дни исследований			
	до применения	через 8 дней	через 15 дней	через 21 день
Общий белок g/L N = 54-75 g/L				
50 мг/кг	70,48±2,46	69,55±4,10	74,77±3,76	78,70±5,82
250 мг/кг	72,94±0,30	71,77±6,16	74,28±5,82	80,22±5,47
Контроль	72,45±1,71	69,97±5,13	71,56±3,15	74,58±5,13

При изучении качественного состава белка сыворотки крови установлено, что у животных 1 группы отмечалось достоверное снижение альбуминовой фракции до 55,15±1,36 % (P<0,01) на 21-й день наблюдений, что на 22,78 % ниже, чем у контрольных животных. Содержание бета-глобулинов в сыворотке крови на 15-й день после применения препарата в дозе 50 мг/кг массы тела достоверно увеличилось на 29,71 % (P<0,02) и гамма-глобулинов, на 57,14 % (P<0,02), а к 21-му дню превыша-

ло на 32,85 % (P<0,05) и в 2,32 раза (P<0,01) соответственно показателям контрольных животных. У животных 2 группы наблюдалось увеличение концентрации гамма-глобулинов на 38,79 % (P<0,05) к 15 дню наблюдений (таблица 6).

Увеличение концентрации бета- и гамма-глобулинов в сыворотке крови свидетельствует о положительном влиянии на организм кроликов иммуностимуляторов левамизола гидрохлорида и токоферола ацетата, входящих в состав препарата [2].

Таблица 6. – Динамика содержания белковых фракций сыворотки крови кроликов при применении празифена

Дни исследований	Фракции белка, %				
	Альбумины	Альфа-1 глобулины	Альфа-2 глобулины	Бетта-глобулины	Гамма-глобулины
1 группа 50 мг/кг					
До применения	72,32±2,25	3,25±0,51	5,96±1,16	11,16±2,05	7,28±1,23
через 8 дней	62,24±6,25	3,75±0,25	8,94±1,91	14,34±2,19	10,65±1,18
через 15 дней	58,08±5,82	4,61±1,71	6,12±1,71	16,11±3,42**	15,07±4179*
через 21 день	55,15±1,36***	3,15±0,54	7,24±0,82	17,63±3,28**	16,84±1,76***
2 группа 250 мг/кг					
До применения	72,28±1,43	3,54±0,15	6,61±0,71	12,03±0,65	5,57±0,61
через 8 дней	62,59±3,76	3,75±0,21	8,68±1,43	14,42±0,85	10,56±2,43
через 15 дней	63,9±4,45	3,9±0,48	5,88±0,85	12,99±1,43	13,31±1,12*
через 21 день	67,61±2,19	3,18±0,32	6,41±0,41	13,27±1,02	9,53±2,05
контроль					
До применения	70,29±0,54	4,31±0,89	4,98±0,44	12,0±0,16	8,45±0,23
через 8 дней	67,27±1,33	4,26±0,05	6,91±0,68	12,98±0,54	8,9±0,89
через 15 дней	67,01±0,61	4,65±0,61	6,47±0,16	12,42±0,58	9,59±0,71
через 21 день	71,42±0,92	3,09±0,54	6,19±0,019	11,96±0,58	7,25±0,85

Примечание – \*P<0,05, \*\*P<0,02, \*\*\*P<0,01

О положительном влиянии препарата «Празифен» на организм кроликов свидетельствует и динамика привесов массы тела в течение всего периода наблюдений, пред-

ставленных в таблице 7. Прирост массы тела у опытных животных 1 группы был на 37,93 % и 2 группы на 34,61 % выше по отношению к животным контрольной группы.

Таблица 7. – Динамика привесов массы тела у кроликов при применении празифена

Группа	Доза препарата, мг/кг и кратность применения	Средняя масса тела до начала опыта, кг	Средняя масса тела в конце опыта, кг	Привес массы тела за 21 день, кг	Средне-суточный привес, кг	Прирост массы тела, %
1 гр.	50 мг/кг 3 дня	2,15±0,08	2,97±0,13	0,82	0,04	38,14
2 гр.	250 мг/кг 3 дня	2,23±0,05	3,06±0,03	0,83	0,04	37,22
Контроль	не применяли	2,35±0,05	3,0±0,06	0,65	0,03	27,65

Таким образом, антгельминтный препарат «Празифен», приготовленный для применения при гельминтозах карповых рыб не оказывает отрицательного воздействия на организм кроликов. Он способствует увеличению гамма- и бета-глобулинов в сыворотке крови животных на 15-й и 21-й дни наблюдений и повышает привесы животных на 37,93 %–34,61 % по сравнению с животными контрольной группы.

### ВЫВОДЫ

Разработанный антгельминтный препарат «Празифен» для применения при гельминтозах карповых рыб не оказывает отрицательного воздействия на организм

кроликов. Он способствует увеличению гамма- и бета-глобулинов в сыворотке крови животных на 15-й и 21-й дни наблюдений и повышает привесы животных на 37,94 %–34,61 %.

2. На основании полученных результатов исследований по изучению острой и хронической токсичности, эмбриотоксическому, тератогенному, раздражающему, алергизирующему и сенсибилизирующим свойствам можно заключить, что комплексный препарат «Празифен» относится к веществам малоопасным по ГОСТ 12.1.007-76, т.е. к веществам 4-го класса опасности.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии. – Минск, 2007. – 156 с.
2. Даугалиева, Э.Х. К механизму патогенеза и иммунитета при гельминтозах / Э.Х. Даугалиева: материалы Второй Закавказской конф. по гельминтозам. – 1981. – С. 87–89.
3. Якубовский, М.В. Разработка комплексного препарата при гельминтозах карповых рыб / М.В. Якубовский [и др.] //Актуальные проблемы ветеринарной паразитологии на современном этапе: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию кафедры паразитологии и инвазионных болезней животных УО ВГАВМ, Витебск, 2–4 ноября 2017 / Витебская государственная академия ветеринарной медицины; ред. Н.И. Гавриченко [и др.]. – Текстовое электрон. изд. сетевого распространения. – Витебск: ВГАВМ, 2017. – 138 с.

**В хозяйстве мастит до сих пор? Решение есть – САПОФОР!**

- отсутствие периода ожидания вывода из организма остаточных количеств препарата
- ограничение по молоку – 0 дней!
- повышает активность адаптивного иммунитета и усиливает выработку антител в организме при введении вакцинных препаратов
- САПОФОР – революционный белорусский препарат для профилактики и лечения субклинического мастита
- Курс лечения – 3 дня!
- технологичность применения – инъекционная форма (препарат вводят внутримышечно в объеме 5,0 см<sup>3</sup> трехкратно с интервалом 24 ч)



## **ВАЛЕРИЙ МИТРОФАНОВИЧ ЛЕМЕШ (к 80-летию со дня рождения)**

11 декабря 2018 г. исполнилось 80 лет со дня рождения Валерия Митрофановича Лемеша, доктора ветеринарных наук, профессора, члена-корреспондента НАН Беларуси.

В. М. Лемеш родился в 1938 г. в г. Речица Гомельской области. В 1960 г. окончил Витебский ветеринарный институт, затем работал на производстве в должности врача районной ветеринарной станции и главного ветврача совхоза. В 1964–1966 гг. обучался в аспирантуре при Белорусском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии, после окончания которой работал младшим, затем старшим научным сотрудни-

ком, а с 1973 г. – заведующим лабораторией.

В 1968 г. защитил кандидатскую диссертацию, в 1987 г. – докторскую диссертацию на тему «Лейкоз крупного рогатого скота в Белоруссии (эпизоотология, диагностика и меры борьбы)».

В 1990 г. приглашен на педагогическую работу и избран заведующим кафедрой ветеринарно-санитарной экспертизы Витебской государственной академии ветеринарной медицины. В 1995 г. В.М. Лемешу присвоено ученое звание профессора. В 1994 г. он был избран членом-корреспондентом Академии аграрных наук Республики Беларусь, а в 2003 г. – членом-корреспондентом НАН Беларуси.

Основными направлениями научной деятельности В. М. Лемеша являются решение фундаментальных и прикладных проблем эпизоотологии, профилактики и ликвидации заразных болезней, иммунитет и общая резистентность организма животных, система контроля доброкачественности и безвредности продуктов животноводства.

Валерий Митрофанович – автор более 250 научных работ, в т.ч. 4 монографий, новизна проведенных исследований подтверждена рядом авторских свидетельств и патентов.

За успешную научно-педагогическую, производственную деятельность и общественную работу Валерий Митрофанович Лемеш награжден орденом «Знак Почета» (2012 г.), медалями «За трудовые отличия» (1971 г.), «За заслуги в области ветеринарии» (2007 г.), Почетными грамотами Верховного Совета БССР, Совета Министров Республики Беларусь и Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь.

Коллектив РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского» сердечно поздравляет уважаемого Валерия Митрофановича с юбилеем! Желаем крепкого здоровья, оптимизма, личного благополучия и долгих плодотворных лет жизни на благо белорусской науки.

## 20-Я ЮБИЛЕЙНАЯ РОССИЙСКАЯ АГРОПРОМЫШЛЕННАЯ ВЫСТАВКА «ЗОЛОТАЯ ОСЕНЬ-2018»



В г. Москве на территории Всероссийского выставочного комплекса ВДНХ прошла 20-я юбилейная российская агропромышленная выставка «Золотая осень-2018», приуроченная к профессиональному празднику – Дню работника сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности Российской Федерации.

В экспозиции выставки РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» были представлены макеты разработанных ветеринарных препаратов, вакцин, в том числе антирабическая вакцина, вакцина для профилактики и лечения вирусных и бактериальных болезней сельскохозяйственных животных, противопаразитарные препараты, лечебно-профилактические препараты и стимуляторы иммунной системы животных, дезинфицирующие средства и диагностикумы, а также баннеры, плакаты с описанием технологии производства препаратов, схемы их применения и эффективности; буклеты, визитки, флаеры, рекламные проспекты, брошюры, методические рекомендации, научно-практические журналы и др.

10–13 октября делегация Института ознакомилась с направлениями деятельности и спецификой работы предприятий ветеринарного профиля, принявших участие в выставке, провела переговоры, консультации, презентацию перспективных научных разработок РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», а также участвовала в мероприятиях, направленных на установление деловых связей с организациями России, Киргизии, Казахстана, Китая, Румынии, Польши и др. Посетители павильона высоко оценили уровень представленных Институтом новейших разработок и выразили заинтересованность в поиске форм взаимовыгодного сотрудничества.



14 октября состоялось подведение итогов, вручение дипломов, наград, закрытие и демонтаж выставки.

В рамках выставки проводились отраслевые конкурсы, по итогам которых РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» удостоен высоких наград в различных номинациях. Так, за внедрение ветеринарных препаратов «САПОФОР» и «МЕТАФИТОХИТ», за информационно-консультационное обслуживание сельскохозяйственных организаций в форме научно-практических семинаров в области ветеринарии Институт награжден золотыми медалями, за внедрение живой лиофилизованной вакцины для профилактики оспы овец – серебряной медалью.

