

МЕЖДУНАРОДНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
Выпускается с 2004 года

ISSN 2224-168X
ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС: 00802
008022

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

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

Ломако Ю.В. – кандидат ветеринарных наук, доцент

СЕКРЕТАРЬ:

Радюш И.С. – кандидат ветеринарных наук, доцент

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Борисовец Д.С. – кандидат ветеринарных наук, доцент

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

Кузьминский И.И. – кандидат ветеринарных наук, доцент

Кучинский М.П. – доктор ветеринарных наук, профессор

Лысенко А.П. – доктор ветеринарных наук, профессор

НАД НОМЕРОМ РАБОТАЛИ:

Ларькова А.Е.

Лукьянова И.А.

Пуцько С.Г.

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)

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

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»

СОДЕРЖАНИЕ**ЭПИЗООТОЛОГИЯ**

Красникова Е.Л., Ломако Ю.В., Сергеев Г.В., Лемш А.П., Герасимчук С.С., Бузюма А.А., Потапчук Д.В., Пономарев А.И., Савельева Т.А. ОСОБЕННОСТИ ГЕНОМА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ 3

Полоз С.В. ВЛИЯНИЕ ПАТОГЕНОВ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП В ПАРАЗИТОЦЕНОЗЕ НА УСТОЙЧИВОСТЬ ЖИВОТНЫХ 11

ИММУНОБИОЛОГИЯ

Лысенко А.П., Broxmeyer L., Власенко В.В., Кучвальский М.В., Красникова Е.Л. ВЕРОЯТНАЯ СВЯЗЬ МИЕЛОИДНОГО И ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА С ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ 23

Андруевич А.С., Тяпша Ю.И., Дубаневич О.В., Стрельченя И.И. БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУЗЕЙНЫХ ШТАММОВ *SALMONELLA DUBLIN*, *SALMONELLA CHOLERAЕ SUIS*, *SALMONELLA TYPHIMURIUM* 39

Струк М.С. ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ЦИНКА «ИММУНОНАНОЦИНК» НА ОСНОВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ И ИММУНИТЕТ 45

Соловьёва А.В., Ломако Ю.В., Новикова О.Н., Овсянникова О.В. ВЫЯВЛЕНИЕ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ТЕРМОЛАБИЛЬНОГО ТОКСИНА *ESCHERICHIA COLI* И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕГО СПОСОБНОСТИ К ТОКСИНООБРАЗОВАНИЮ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ 52

ФАРМАКОЛОГИЯ

Мястова Т.Я., Якубовский М.В., Щемелева Н.Ю. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КОМПЛЕКСНОГО АНТГЕЛЬМИНТНОГО ПРЕПАРАТА «ТРИКЛАМИЗОЛ» 56

Кучинский М.П., Сонов А.А., Савчук Т.М. ИЗУЧЕНИЕ ЭМБРИОТОКСИЧНОСТИ, ТЕРАТОГЕННОСТИ И КОЖНО-РЕЗОРБТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА «КАЛЬЦЕМАГФОСВИТ» 60

Кучинский М.П., Николаев С.В., Федотов Д.Н. ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ БИОЭЛЕМЕНТОВ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ХАРАКТЕРИСТИКУ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРОЛИКОВ 64

Струк М.С. СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ ЦИНКА И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРЕПАРАТА НА ИХ ОСНОВЕ 69

САНИТАРИЯ

Дубина И.Н., Криворучко Е.Б. ВЛИЯНИЕ САНИТАРНЫХ СРЕДСТВ НА МИНЕРАЛЬНОЙ ОСНОВЕ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ВЫПЛОДА МУХ 76

CONTENTS**EPIZOOTOLOGY**

Krasnikova E.L., Lomako Yu.V., Sergeev G.V., Lemish A.P., Gerasimchuk S.S., Buzyuma A.A., Potapchuk D.V., Ponomarev A.I., Savelyeva T.A. FEATURES OF THE GENOME OF REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME OF PIGS IN THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF BELARUS 3

Poloz S.V. INFLUENCE OF DIFFERENT ECOLOGICAL GROUPS PATHOGENS OF PARASITOCENOSIS ON ANIMAL RESISTANCE 11

IMMUNOBIOLOGY

Lysenko A.P., Broxmeyer L., Vlasenko V.V., Kuchvalsky M.V., Krasnikova E.L. PROBABLE LINK BETWEEN MYELOID AND LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA WITH TUBERCULOSIS INFECTION 23

Andrusevich A.S., Tyapsha Yu.I., Dubanevich O.V., Strelchenya I.I. BIOCHEMICAL PROPERTIES OF MUSEUM STRAINS *SALMONELLA DUBLIN*, *SALMONELLA CHOLERAЕ SUIS*, *SALMONELLA TYPHIMURIUM* 39

Struk M.S. THE EFFECT OF THE DRUG ON THE BASIS OF NANOPARTICLES OF ZINC «IMMUNOENHANCING» BASIC BLOOD COUNTS AND IMMUNITY 45

Solovyova A.V., Lomako Yu.V., Novikova O.N., Ovsyanikova O.V. IDENTIFICATION OF THE PRODUCER STRAIN OF THE THERMOLABILE TOXIN *ESCHERICHIA COLI* AND DETERMINATION OF ITS ABILITY TO TOXIN FORMATION UNDER INDUSTRIAL CULTIVATION 52

FARMACOLOGY

Myastsova T.Ya., Yakubovsky M.V., Schemeleva N.Yu. TOXICOLOGICAL PARAMETERS OF THE COMPLEX ANTHELMINTH PRODUCT «TRIKLAMIZOL» 56

Kuchinsky M.P., Sonov A.A., Savchuk T.M. STUDY OF EMBRIOTOXICITY, TERATOGENICITY AND SKIN-RESORBENT ACTION OF THE NEW VETERINARY PREPARATION «KALTSEMAGFOSVIT» 60

Kuchinsky M.P., Nikolaev S.V., Fiadotou D.N. THE INFLUENCE OF BIOELEMENT PREPARATION ON THE MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE THYROID GLAND OF THE RABBIT 64

Struk M.S. METHOD FOR PRODUCING ZINC NANOPARTICLES AND TOXICOLOGICAL EVALUATION OF THE PRODUCT ON THEIR BASIS 69

SANITATION

Dubina I.N., Kryvoruchco E.B. THE INFLUENCE OF SANITARY PRODUCTS ON A MINERAL BASIS ON THE INTENSITY OF BREEDING OF FLIES 76

Компьютерная верстка: ЛУКЪЯНОВА И.А.

Подписано в печать 02.06.2020 г.

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

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

220003, г. Минск, ул. Брикета, 28, E-mail: bievm@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 619:578:636.4(476)

Красникова Е.Л., научный сотрудник¹
 Ломако Ю.В., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
 Сергеев Г.В., кандидат химических наук²
 Лемиш А.П., кандидат ветеринарных наук³
 Герасимчук С.С., ветврач³
 Бузюма А.А., ветврач³
 Потапчук Д.В., ветврач³
 Пономарев А.И., ветврач³
 Савельева Т.А., кандидат ветеринарных наук, доцент⁴

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

²ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», г. Минск

³ЗАО «Консул», г. Минск

⁴РУП «Институт мясо-молочной промышленности», г. Минск

ОСОБЕННОСТИ ГЕНОМА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Резюме

В статье приведены результаты частичного сиквенса изолятов вируса репродуктивно-респираторного синдрома, выделенных в Республике Беларусь. Анализ последовательностей указывает на значительный полиморфизм изолятов в наиболее консервативных рамках считывания (ОРС6-7). Выделенные изоляты относятся к европейскому типу, подтип 3.

Summary

The article presents the results of a partial sequence isolated in the Republic of Belarus of isolates of the virus of reproductive and respiratory syndrome. Sequence analysis indicates significant polymorphism of isolates in the most conservative reading frames (ОРС6-7). Isolated isolates belong to the European type, subtype 3.

Поступила в редакцию 23.03.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

Репродуктивно-респираторный синдром официально зарегистрирован на территории Республики Беларусь в 1997 году. Заболевание отнесено к списку группы Б Международного эпизоотического бюро (МЭБ).

Специфичность заболевания (болеют только свиньи), вариабельность самого вирусного агента, разнообразная клиническая картина (протекает в репродуктивной и респираторной формах), поражение значительной части поголовья свиней (основные свиноматки и молодняк послеотъемного периода) – все это затрудняет постановку диагноза [1].

Современные методы диагностики позволяют выявлять вирус методом поли-

меразной цепной реакции в короткие сроки, что существенно упрощает и ускоряет решение вопроса постановки диагноза и разработки противоэпизоотических мероприятий. Однако в связи с высокой вариабельностью вирусных изолятов вопрос вакцинации и циркуляции местных изолятов в хозяйствах стоит остро, поэтому важно определять, какими изолятами инфицированы свиньи в том или ином хозяйстве. Использование частичного сиквенс-анализа позволяет определить средство полученных изолятов с уже существующими расшифрованными геномами [2].

Вирус РРСС высоковариабелен и представляет собой одноцепочный РНК-вирус, геном которого представлен 9 рам-

ками считывания. На основании генетических антигенных и патогенных различий вирус РРСС делится на 2 генотипа, нуклеотидная идентичность которых составляет не более 70 % (европейский генотип, или тип 1, и американский генотип, или тип 2) [3].

Изначально считалось, что эти два генотипа формировали достаточно однородные группы, схожие с первыми изолятами: для европейского типа – с вирусом Le-lystad, для американского – с VR2332 [4, 5].

Однако европейские генотипы вируса имеют четкую географическую разграниченность вдоль польской границы. На территории Республики Беларусь циркулируют изоляты, относящиеся к европейскому генотипу, но в силу отличий в последовательностях ОРС 5 и значительного полиморфизма в ОРС7 белорусские изоляты выделены в отдельные подтипы 2–4 (2006 г.). Наиболее известным штаммом, обладающим высокой вирулентностью, официально зарегистрированным в онлайн-базе данных NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), является штамм JF802085.1 Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain lena. Его полный геном доступен в NCBI.

Целью нашей работы было выделить вирус РРСС из патологического материала, взятого в хозяйствах Республики Беларусь, и сравнить выделенные геномы с зарегистрированными геномами вируса РРСС в базах данных NCBI, определить их сродство по ОРС 6-7.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Нами были отобраны пробы патологического материала из 14 хозяйств Республики Беларусь, в которых за период 2015–2018 гг. методом ПЦР выявлялся вирус РРСС.

В данных хозяйствах инфекция протекала с классическими признаками репродуктивно-респираторной патологии. Пробы (патматериал) отбирались от поросят в возрасте 45–65 дней.

Суммарную РНК выделяли согласно инструкции набором Рибопреп (фирма Ам-

плисенс, Россия). Праймеры подбирали к наиболее консервативному участку генома вируса РРСС, кодирующему протеин М и нуклеокапсидный белок N. Участок ОРС 6-7 (5-*TACATTCTGGCCCCTGCCAC-3*, 5*SACAGCTGATTGACTGGCTGGCCA-3*), праймеры синтезировали в ОДО «Праймтех» (Минск, Беларусь). Обратную транскрипцию (ОТ-ПЦР) суммарной РНК проводили в объеме 20 мкл реакционной смеси. Для синтеза кДНК смешивали в 5х буфере для ОТ-ПЦР 2 мкл суммарной РНК с 0,5мкМ обратного праймера в присутствии 10 U рибонуклеазного ингибитора (Fermentas, Литва), 50 U ревертазы (Fermentas, Литва) и 1 мкл 10 mM смеси дНТП. Смесь инкубировали согласно инструкции 1 час при 42 °С, а затем инактивировали ревертазу в течение 10 минут при 70 °С. Амплификацию ПЦР продукта проводили в общем объеме 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл кДНК, 10 mM дНТП, 0,2 мкМ каждого праймера, 3 mM хлорида магния и 1 ЕД Таг-полимеразы (ОДО Праймтех, Минск). Использовали следующий режим амплификации: 95 °С – 5 минут, затем 35 циклов 95 °С – 30 секунд, 55 °С – 30 секунд, 72 °С – 20 секунд.

Образцы ПЦР-продуктов были проанализированы методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Учет результатов проводили на приборе Gel-Doc (фирма Bio-Rad). ДНК-фрагменты, соответствующие по массе 274 п.н., были вырезаны из геля и очищены с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit. Постановку реакции секвенирования осуществляли, используя набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Секвенирование каждого образца проводили на базе ИБОХ (Минск). Очистку сиквенс-продуктов проводили, используя набор Applied Biosystems BigDye X Terminator Purification Kit. Анализ сиквенс-продуктов проводили на приборе Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (POP7 polymer, capillary length 36 cm) и с помощью программы Blas и Unigenet.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

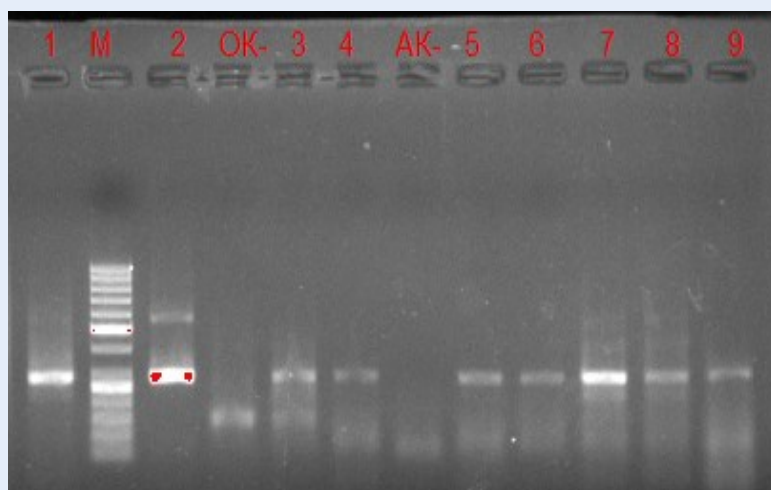
Список свиноводческих хозяйств, в которых отбирались пробы патматериала, представлен в таблице 1.

Таблица 1. – Хозяйства и возраст поросят, от которых был отобран патологический материал

Наименование хозяйства	Возраст поросят, дней
ЗАО «Турец», Минская область	55
ОАО СГЦ «Западный», Брестская область	60
Филиал «Биомакс-Кореличи» ЗАО «Биомакс», Гродненская область	65
ОАО «Беловежский», Брестская область	65
ОАО «Агрокомбинат "Юбилейный"», Витебская область	45
ЗАО «Гудевичи», Гродненская область	55
ОАО «Тарасово», Минская область	50
КСУП «Дотишки», Гродненская область	55
СУП «Агрокомплекс "Белая Русь"», Минская область	65
КПС «Восточный», Брестская область	60
СГЦ «Заднепровский», Витебская область	45
ОАО «Барановичхлебопродукт», Брестская область	55
ОАО «Дрогичинский КЗ» СК «Сухое», Брестская область	65
С-к «Заря», Гомельская область	55

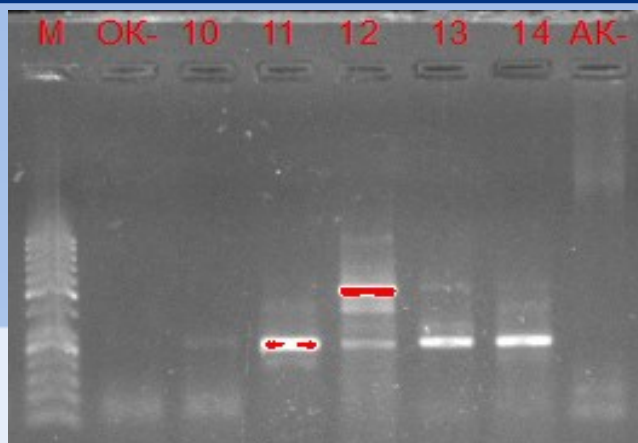
Как видно из таблицы 1, для сравнительного анализа изолятов вируса РРСС нами были отобраны пробы из хозяйств 5 областей Республики Беларусь. Результаты полимеразной цепной реакции с пробами

патологического материала представлены на рисунках 1, 2. Полученные данные подтверждают значительное распространение вируса РРСС по всей территории страны.



1 – ЗАО «Турец»; М – маркер молекулярного веса (Fermentas, 50 bp); 2 – ОАО СГЦ «Западный»; ОК – отрицательный контроль обратной транскрипции; 3 – Филиал «Биомакс-Кореличи» ЗАО «Биомакс»; 4 – ОАО «Беловежский»; АК – отрицательный контроль амплификации; 5 – ОАО Агрокомбинат «Юбилейный»; 6 – ЗАО «Гудевичи»; 7 – ОАО «Тарасово»; 8 – КСУП «Дотишки»; 9 – СУП «Агрокомплекс "Белая Русь"»

Рисунок 1. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации со специфическими праймерами в отношении участка генома вируса РРСС (длина продукта амплификации 274 п.н.), полученных из патологического материала, отобранного от свиней (фото)

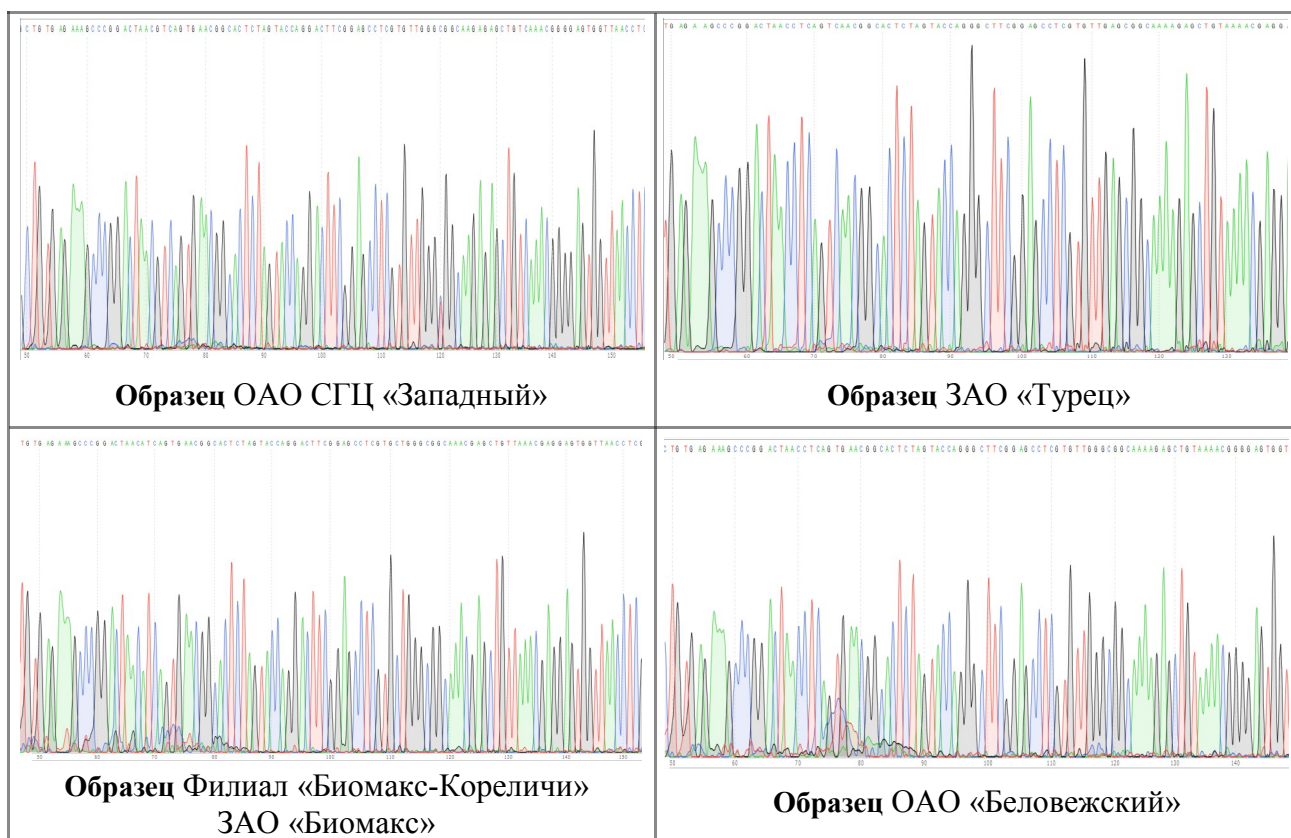


М – маркер молекулярного веса (Fermentas, 50 bp); ОК – отрицательный контроль обратной транскрипции; 10 – КПС «Восточный»; 11 – СГЦ «Заднепровский»; 12 – ОАО «Барановичихлебопродукт»; 13 – ОАО «Дрогиченский КЗ» СК «Сухое»; 14 – С-к «Заря» Мозырь; АК – отрицательный контроль амплификации

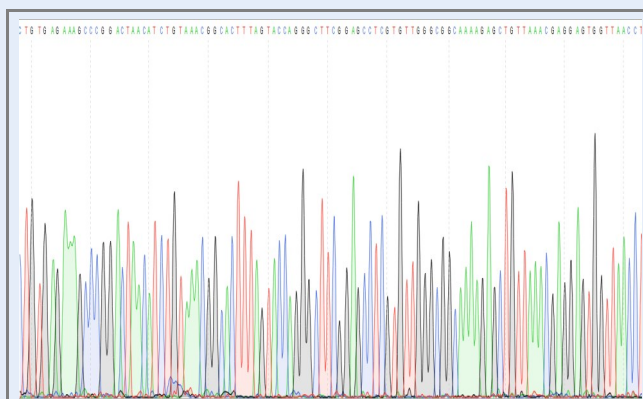
Рисунок 2. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации со специфическими праймерами в отношении участка генома вируса РРСС (длина продукта амплификации 274 п.н.), полученных из патологического материала, отобранного от свиней (фото)

Затем вырезанные ДНК фрагменты с молекулярным весом 274 п.н. были переданы в ИБОХ для проведения сиквенс-анализа. Полученные секвенограммы представлены в таблице 2.

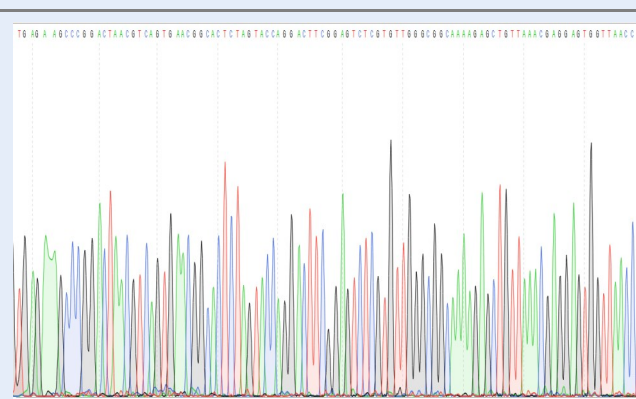
Таблица 2. – Секвенограммы ДНК-фрагментов



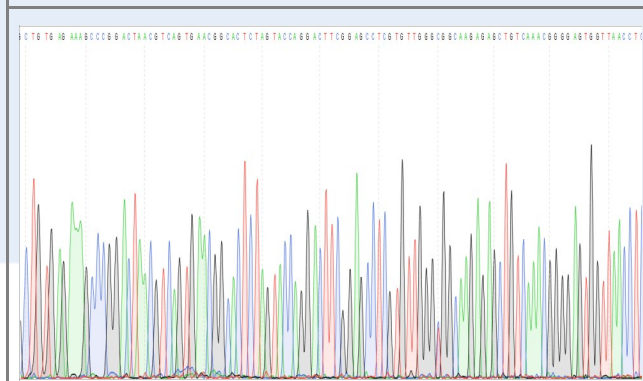
Продолжение таблицы 2



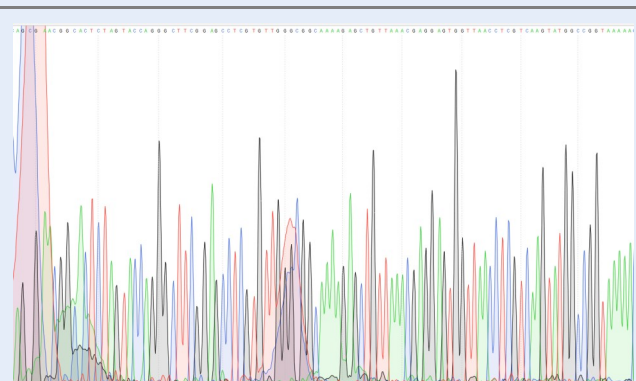
Образец ОАО «Агрокомбинат "Юбилейный"»



Образец ЗАО «Гудевичи»



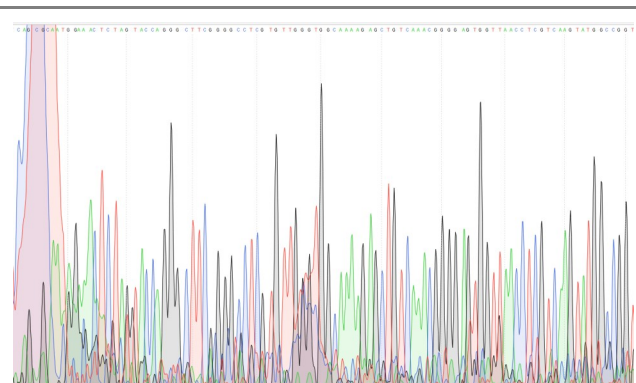
Образец СПЦ «Заднепровский»



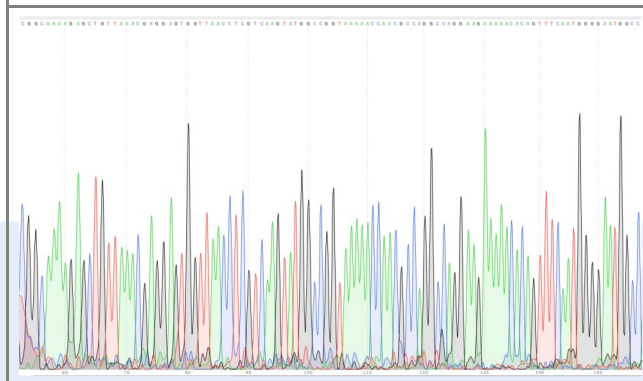
Образец ОАО «Гарасово»



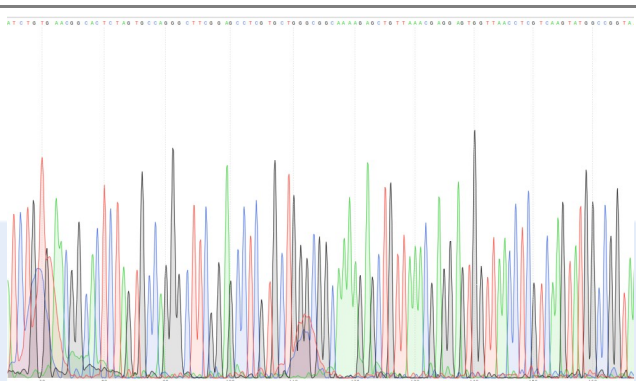
Образец КСУП «Дотишки»



Образец СУП «Агрокомплекс "Белая Русь"»

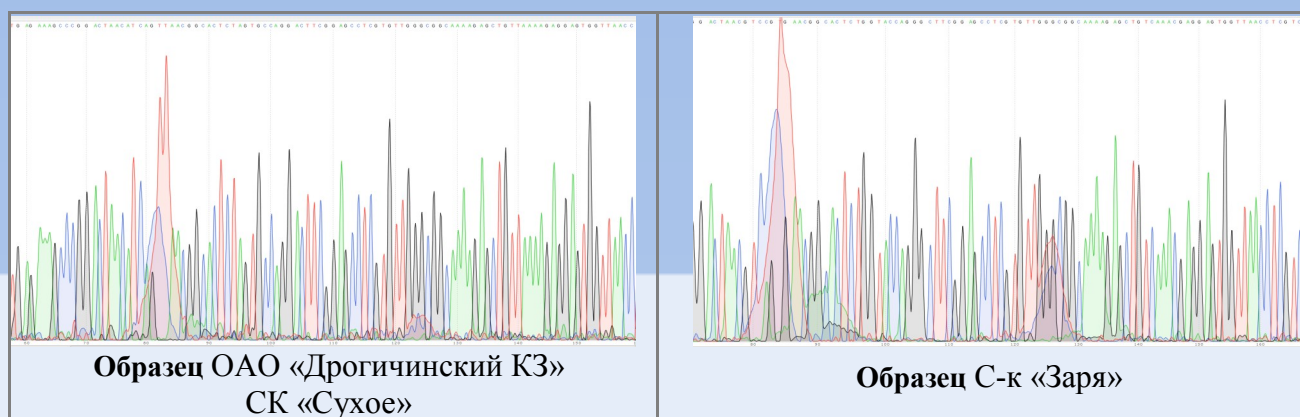


Образец КПС «Восточный»



Образец ОАО «Барановичхлебопродукт»

Продолжение таблицы 2



Анализ последовательностей в NCBI-Blast показал, что все выделенные фрагменты принадлежат к европейскому типу, подтипу 3. Нами также был установлен процент генетического родства сикве-

нированных изолятов с первым европейским изолятом вируса РРСС virus strain Lelystad NC_043487.1 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_043487.1/. Полученные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Принадлежность образцов фрагментов ДНК из различных хозяйств Республики Беларусь по результатам сиквенс-анализа

Наименование хозяйства	Полевой штамм	Тип вируса	Процент идентичности с геномом вируса Lelystad
ЗАО «Турец»	- virus strain SU1-Bel	Genotype 1 Subtype 3	92–94 %
ОАО СГЦ «Западный»	- virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	98,71 %
Филиал «Биомакс-Кореличи» ЗАО «Биомакс»	- virus strain NL	Genotype 1 Subtype 1	90 %
ОАО «Беловежский»	- virus strain SU1-Bel - virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	89 %
ОАО «Агрокомбинат "Юбилейный"»	- virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	90,91 %
ЗАО «Гудевичи»	- virus strain SU1-Bel - virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	90,95 %
С-к «Заря»	- virus strain SU1-Bel - virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	89,87 %
ОАО «Дрогичинский КЗ» СК «Сухое»	- virus strain SU1-Bel - virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	90,79 %
КПС «Восточный»	- virus strain SU1-Bel - virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	91,44 %
ОАО «Барановичихлебопродукт»	- virus strain SU1-Bel	Genotype 1 Subtype 3	91 %
СУП «Агрокомплекс "Белая Русь"»	- virus strain SU1-Bel - virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	89,44 %
КСУП «Дотишки»	- virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	83,26 %
ОАО «Тарасово»	- virus strain SU1-Bel - virus strain lena	Genotype 1 Subtype 3	91,81 %

Проведенный генетический анализ по участку генома, кодирующему ОРС6-7, полевых вирусов РРСС, циркулирующих в свиноводческих хозяйствах Республики Беларусь, показал высокое сходство с европейским типом вируса, относящимся к генотипу 1. Степень сродства с вирусом Lelystad по ОРС 6-7 составила 83–98 %. Наименьшее сродство по 7 рамке считывания обнаружено у изолята, выделенного из патологического материала, принадлежащего КСУП «Дотишки» – 83,26 %, наибольшее – у изолята, выделенного из ОАО СГЦ «Западный», – 98,71 %. Сравнительный сиквенс-анализ показал, что 13

изолятов относятся к третьему подтипу европейского типа, генетическое сродство со штаммом Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain SU1-Bel partial genome sequence (GenBank: KP889243.1) [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/797178073?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=JS7X1467015](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/797178073?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=JS7X1467015) составляет 93–99 %, а со штаммом Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain lena, complete genome (GenBank: JF802085.1) [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/349502023?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=2&RID=JS7X1467015](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/349502023?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=2&RID=JS7X1467015) – 95–99 % (рисунок 3).

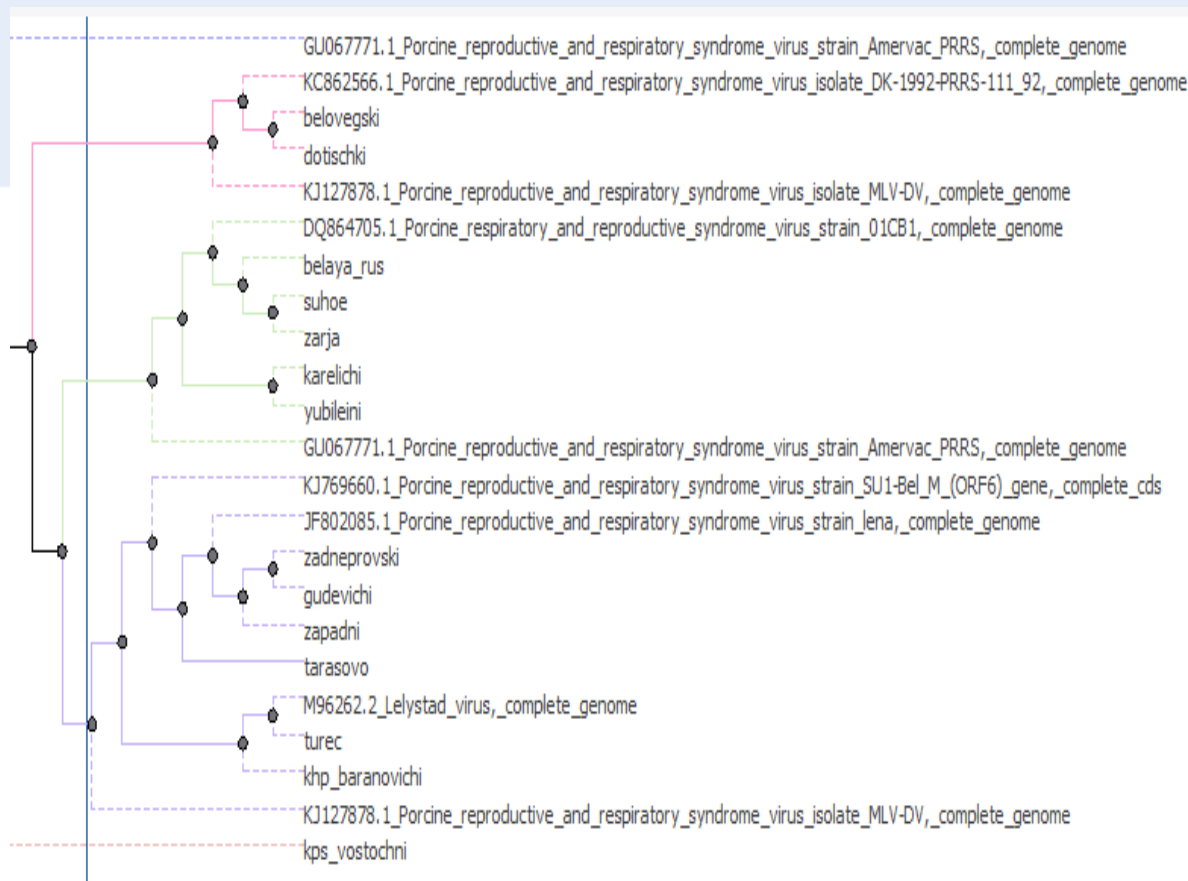


Рисунок 3. – Филогенетический анализ выделенных изолятов вируса РРСС на территории Республики Беларусь

Нами замечено, что внутри третьего подтипа наблюдался значительный полиморфизм (рисунок 3), что не противоречит результатам, полученным ранее учеными разных стран [3, 4, 5]. Так, изоляты из ОАО «Тарасово», ЗАО «Гудевичи», ОАО СГЦ «Западный» имеют более высокое сродство

со штаммом Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain lena, complete genome (GenBank: JF802085.1), тогда как изоляты ЗАО «Турец», КПС «Восточный», ОАО «Барановичхлебопродукт» имеют большее сродство с virus strain Lelystad NC_043487.1.

Нами замечено, что внутри третьего подтипа наблюдался значительный полиморфизм (рисунок 3), что не противоречит результатам, полученным ранее учеными разных стран [3, 4, 5]. Так, изоляты из ОАО «Тарасово», ЗАО «Гудевичи», ОАО СГЦ «Западный» имеют более высокое сродство со штаммом Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain lena, complete genome (GenBank: JF802085.1), тогда как изоляты ЗАО «Турец», КПС «Восточный», ОАО «Барановичхлебопродукт» имеют

большее сродство с virus strain Lelystad NC_043487.1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная работа указывает на широкое распространение возбудителя РРСС на территории Республики Беларусь. Выделяемые изоляты обладают значительным полиморфизмом в наиболее консервативных рамках считывания (ОРС 6-7). Выделенные изоляты относятся к европейскому типу, подтип 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красникова, Е. Л. Выявление вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней в биологических жидкостях организма / Е. Л. Красникова, Т. А. Савельева, А. Ю. Финогенов // *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі*. – 2012. – № 1. – С. 70–75.
2. Красникова, Е. Л. Специфическая профилактика репродуктивно-респираторного синдрома свиней / Е. Л. Красникова, О. В. Мальчик // *Эпизоотология, иммунологи́я, фармакология, санитария*. – 2011. – № 3. – С. 40–42.
3. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes / T. Stadejek [et al.] // *J Gen Virol*. – 2006, Jul; 87 (Pt 7): 1835–41.
4. Phylogenetic relationships of European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes / P. Suarez [et al.] // *Virus Res* 42. – 1996. – P. 159–165.
5. Development of a one-step real-time quantitative PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / Gyula Balka [et al.] // *Journal of Virological Methods Volume 158, Issues 1–2, June 2009*. – P. 41–45.

ВАКЦИНА ЖИВАЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННАЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ОСПЫ ОВЕЦ

▶ при плановой иммунизации прививаются все животные, начиная с 3-месячного возраста;
▶ ревакцинацию проводят через каждые 12 месяцев;
▶ иммунитет у животных формируется через 10–14 суток после вакцинации и сохраняется не менее 12 месяцев

www.BIEVM.BY

УДК 574.24:576.89

Полоз С.В., кандидат ветеринарных наук

РУП «Институт рыбного хозяйства» РУП «НПЦ НАН Беларуси по животноводству», г. Минск

ВЛИЯНИЕ ПАТОГЕНОВ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП В ПАРАЗИТОЦЕНОЗЕ НА УСТОЙЧИВОСТЬ ЖИВОТНЫХ

Резюме

В данной статье показано, что ответная реакция организма млекопитающих на микстинвазию зависит от очередности проникновения паразита в организм хозяина и дозы инвадента.

При сочетании нематод и бактерий ведущую роль на первом этапе играют нематоды, однако впоследствии бактерии начинают оказывать угнетающее воздействие на гельминтов, и роль бактерий становится приоритетной.

В сочетании нематод и эймерий при первичном заражении нематоды не оказывают значительного влияния на приживаемость эймерий, однако влияние эймерий на нематоды можно оценивать как антагонистическое. При этом ответ хозяина на вторую инвазию изменяется под воздействием первой.

Установлено, что между гельминтами и микрофлорой желудочно-кишечного тракта млекопитающих существует ярко выраженный антагонизм.

Summary

This article shows that the response of the mammalian organism to mixtinvasion depends on the order of penetration of the parasite into the host organism and the dose of infection.

With a combination of nematodes and bacteria, the nematodes has been a leading role in the first stage, but subsequently, bacteria begin to exert a depressing effect on helminthes and the role of bacteria becomes a priority.

In the combination of nematodes and eimeria during primary infection, nematodes do not significantly affect the survival of eimeria, however, the effect of eimeria on nematodes can be assessed as antagonistic. In this case, the response of the host to the second invasion changes under the influence of the first.

It has been established that between helminthes and microflora of the gastrointestinal tract of mammals there is a pronounced antagonism.

Поступила в редакцию 13.05.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

Система паразит-хозяин существует практически только в модельном варианте [6]. В естественных условиях обитания и зоокультуре функционирует сложнейшая система паразитоценоз-хозяин, оценивая которую, необходимо учитывать взаимоотношения не только хозяина и собственно паразита, но и наличие нескольких филогенетически разных паразитов, влияние патогенной флоры, например бактерий, а также реакцию аутофлоры, т.е. всех максимально возможных участников паразитоценоза.

Цель исследований – доказать, что ассоциации паразитирующих форм, представляющих собой совокупность различ-

ных патогенов, обуславливают возникновение патологических состояний в зависимости от видового состава паразитоценоза и очередности поступления его сочленов в организм млекопитающих. Основные возбудители, находясь в организме хозяина, вступают в сложные взаимодействия с другими сочленами паразитоценоза, которые влияют на устойчивость организма хозяина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Интеракцию паразитов при ассоциативных инвазиях наиболее четко удается проследить в эксперименте.

Мы рассматривали формирование двух групп паразитоценозов:

– гельминтно-бактериальный паразитоценоз, компонентами которого являются нематоды и энтеробактерии;

– гельминтно-протозоозный паразитоценоз, компонентами которого являются нематоды и эймерииды.

В качестве модельных животных были выбраны американские норки, содержащиеся на ферме.

Схема экспериментов серии № 1:

Группа № 1 – животные (n=25), инвазированные нематодами *Srtongyloides martis* в дозе 0,5 тыс. экз./кг м.т.

Группа № 2 – животные (n=25), поочередно инвазированные нематодами *Srtongyloides martis* в дозе 0,5 тыс. экз./кг м.т. и через 7 дней – *Pasteurella multocida* серовариант D в дозе 1×10^9 микробных тел (мк.т.)/1 см³.

Группа № 3 – животные (n=25), одновременно инвазированные нематодами *Srtongyloides martis* и *Pasteurella multocida* серовариант D в дозе 1×10^9 микробных тел (мк.т.)/1 см³.

Животные контрольной группы (n=25).

Схема экспериментов серии № 2:

Группа № 4 – животные (n=25), поочередно инвазированные нематодами *Srtongyloides martis* в дозе 0,5 тыс. экз./кг м.т. с последующим заражением через 7 дней простейшими *Eimeria vison* в дозе 7 тыс./кг м.т.

Группа № 5 – животные (n=25), поочередно инвазированные простейшими *Eimeria vison* в дозе 7 тыс./кг м.т. с последующим заражением через 7 дней нематодами *Srtongyloides martis* в дозе 0,5 тыс. экз./кг м.т.

Животные контрольной группы (n=25).

Схема экспериментов серии № 3:

Группа № 6 – животные (n=25), совместно инвазированные нематодами в дозе 0,5 тыс. экз./кг м.т. и простейшими *Eimeria vison* в дозе 7 тыс./кг м.т.

Группа № 7 – животные (n=25), совместно инвазированные нематодами *Srtongyloides*

martis в дозе 1 тыс./кг м.т. и простейшими *Eimeria vison* в дозе 70 тыс./кг м.т.

Группа № 8 – животные (n=25), совместно инвазированные нематодами *Srtongyloides martis* в дозе 0,5 тыс. экз./кг м.т. и простейшими *Eimeria vison* в дозе 7 тыс./кг м.т. с последующим реинвазированием через 7 дней в тех же дозах.

Животные контрольной группы (n=25).

Возможность спонтанного заражения норок нематодами и эймеридами полностью исключалась. Паразитологические исследования проводили методом Г.А. Котельникова, В.М. Хренова, методом Бермана (цит. Петров А.М., Гагарин В.Г.) [4]; культивирование эймерий – по методу, предложенному А.И. Ятусевичем (цит. Герасимчик В.А.) [1]. Заражение норок инвазионными культурами *Strongyloides martis* и *Eimeria vison* проводили индивидуально перорально с помощью шприца и металлического зонда. Для чистоты эксперимента за 7 дней до заражения животных ежедневно обследовали копроскопически на наличие гельминтов и простейших. За животными всех групп было установлено ежедневное наблюдение с проведением лабораторных (паразитологических) исследований. Определение показателей крови американской норки проводили до заражения, на 3-и, 7-е, 14-е, 21-е сутки от начала эксперимента путем подсчета форменных элементов крови с помощью автоматических анализаторов Medonic SA 620 (Швеция) и Catalyst On (США). Определение розеткообразующих Т-лимфоцитов определяли по Новикову Д.К., Новиковой В.И. [3], показателей неспецифической резистентности – согласно методическим рекомендациям [5]. Учитывали реакцию сапрофитной микрофлоры и ее роль в жизнедеятельности организма хозяина, имея в виду, что аутофлора стимулирует механизмы естественного иммунитета, участвует в процессах пищеварения, белкового обмена, синтеза витаминов и др. Микробиологические исследования проводили, используя методические указания по проведению микробиологического контроля при выра-

щивании молодняка пушных зверей [2] и методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птицы [7]. Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Stat. Biom 2720.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

У животных, зараженных только *Strongiloides martis*, вскрытых на 3-й день после заражения, в кишечнике и желудке находили личинок и половозрелых самок *Strongiloides martis*. На 5–7-е сутки после заражения обнаруживали яйца, т.е. в этот период первые самки начинают продукцию яиц, которые выделяются во внешнюю среду. На 14-й день половозрелых особей находили во всех отделах тонкого кишечника, наибольшее их количество отмечали в двенадцатиперстной кишке, в поверхностных участках слизистой оболочки, между ворсинками и под эпителием. Отдельные особи встречались в желудке. У животных с одновременным инвазированием *Strongiloides martis* и *Eimeria vison* отмечали снижение репродукции яиц у самок *Strongiloides martis* по сравнению с животными первой группы. Количество половозрелых особей было меньше в 1,6 раза.

Результаты изучения паразитарной реакции при поочередном инвазировании нематодами *Strongiloides* и простейшими *Eimeriidae* с приоритетом *Strongiloides* показали, что инвазирование нематодами *Strongiloides* незначительно влияет на приживаемость эймериид, наблюдается лишь некоторое снижение выделения ооцист эймериид.

Однако при поочередном инвазировании простейшими *Eimeriidae* и нематодами *Strongiloides* с приоритетом *Eimeriidae* отмечается уменьшение численности популяции взрослых стронгилоидесов, изменение локализации гельминтов в тонком отделе кишечника, снижение плодовитости самок.

Также необходимо отметить, что интенсивность воспалительной реакции и

площадь поражения желудочно-кишечного тракта животных при аутопсии была выше в группе с приоритетным инвазированием *Eimeriidae*.

При одновременном инвазировании стронгилоидесами и эймеридами приживаемость эймериид была выше в группе с наибольшей дозой заражения, выделение ооцист в данной группе отмечается на 6-е сутки после заражения, у животных с меньшей дозой – на 7-е сутки. Максимальное выделение ооцист наблюдается на 14-й день после заражения в этой же группе и составляет $526 \pm 372,8$ экз. (в группе с меньшими дозами заражения – $261 \pm 253,2$ экз., в группе с реинвазией – $441,4 \pm 156,4$ экз.).

При изучении аутофлоры зараженных животных установлено, что на фоне паразитоценоза в кишечнике происходят качественные и количественные изменения нормальной микрофлоры.

При этом происходит нарушение колонизационной резистентности, снижается общее количество микроорганизмов во всех опытных группах. Наиболее выраженные изменения регистрируются в группах № 3 и № 7. У животных этих групп отмечается уменьшение количества бактерий *E. coli* до $5,76 \pm 0,02$ lgKOE/г и $5,67 \pm 0,04$ lgKOE/г соответственно (у животных контрольной группы – $6,85 \pm 0,08$ lgKOE/г); количество непатогенных микроорганизмов группы *Bacillus* уменьшилось соответственно до $5,65 \pm 0,06$ lgKOE/г и $5,58 \pm 0,01$ lgKOE/г, кокковая флора (стрептококки и стафилококки) снижаются соответственно до $4,12 \pm 0,02$ lgKOE/г и $4,1 \pm 0,05$ lgKOE/г. Значительно уменьшается количество бифидумбактерий – до $3,76 \pm 0,12$ lgKOE/г и $3,65 \pm 0,06$ lgKOE/г, а также лактобактерий – до $3,87 \pm 0,08$ lgKOE/г и $3,67 \pm 0,06$ lgKOE/г соответственно. При этом количество *Clostridium* sp. возросло до $3,76 \pm 0,22$ lgKOE/г и $3,98 \pm 0,13$ lgKOE/г и *Candida* spp. – до $4,58 \pm 0,06$ lgKOE/г и $4,52 \pm 0,02$ lgKOE/г, появляется *Pseudomonas* sp. – $3,32 \pm 0,08$ lgKOE/г и $3,42 \pm 0,22$ lgKOE/г соответственно (таблицы 1, 2).

Таблица 1. – Количественный состав микрофлоры кишечного тракта американской норки (до инвазирования)

Группа, № (n=5)	Состав микрофлоры, lg КОЕ/г								
	Общее микробное число	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Кокковая сапрофитная флора	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Clostridium</i> sp.	<i>Candida</i> spp.
1	6,12±0,18	6,72±0,02	6,67±0,01	5,42±0,22	6,36±0,25	5,36±0,08	0,00	2,38±0,22	2,39±0,06
2	6,28±0,16	6,76±0,01	6,71±0,05	5,12±0,05	6,28±0,19	5,24±0,11	0,00	2,8±0,18	3,41±0,12
3	6,22±0,1	6,79±0,01	6,75±0,02	5,64±0,17	6,24±0,17	5,4±0,16	0,00	2,53±0,24	3,4±0,08
4	6,16±0,12	6,82±0,03	6,65±0,04	5,28±0,28	6,3±0,25	5,36±0,12	0,00	2,32±0,16	3,43±0,16
5	6,24±0,16	6,77±0,01	6,7±0,03	5,22±0,12	6,24±0,22	5,22±0,08	0,00	2,61±0,22	2,92±0,03
6	6,18±0,14	6,74±0,08	6,71±0,02	5,24±0,08	6,16±0,15	5,34±0,14	0,00	3,12±0,32	2,98±0,06
7	6,36±0,08	6,72±0,01	6,77±0,01	5,28±0,14	6,34±0,17	5,12±0,22	0,00	2,23±0,16	3,41±0,22
8	6,22±0,18	6,77±0,03	6,69±0,01	5,12±0,22	6,12±0,22	5,28±0,24	0,00	2,32±0,18	3,4±0,18
Контрольные животные	6,34±0,16	6,84±0,02	6,7±0,03	5,22±0,17	6,28±0,17	5,18±0,16	0,00	2,49±0,22	2,96±0,04

Таблица 2. – Количественный состав микрофлоры кишечного тракта американской норки (на 21-й день исследования)

Группа, № (n=5)	Состав микрофлоры, lg КОЕ/г								
	Общее микробное число	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus</i> sp.	Кокковая сапрофитная флора	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Clostridium</i> sp.	<i>Candida</i> spp.
1	4,24±0,11	5,69±0,04	5,54±0,02	4,34±0,14	4,28±0,21	4,12±0,14	3,22±0,17	3,28±0,24	3,78±0,02
2	4,28±0,21	5,82±0,01	5,72±0,04	4,32±0,16	4,16±0,32	4,28±0,24	3,18±0,08	3,08±0,18	4,42±0,04
3	4,12±0,06	5,76±0,02	5,65±0,06	4,12±0,02	3,76±0,12	3,87±0,08	3,32±0,21	3,76±0,22	4,58±0,06
4	4,22±0,13	5,8±0,02	5,68±0,08	4,28±0,22	4,24±0,28	4,1±0,21	3,3±0,17	3,3±0,11	4,31±0,02
5	4,18±0,21	5,89±0,03	5,74±0,02	4,62±0,18	4,36±0,18	4,25±0,18	3,28±0,1	3,12±0,22	3,64±0,18
6	4,24±0,17	5,9±0,02	5,65±0,04	4,25±0,12	4,18±0,16	4,12±0,34	3,18±0,19	3,18±0,32	3,67±0,04
7	4,14±0,08	5,67±0,04	5,58±0,06	4,1±0,05	3,65±0,06	3,67±0,06	3,42±0,22	3,98±0,13	4,52±0,02
8	4,22±0,15	5,82±0,01	5,68±0,01	4,22±0,04	4,22±0,24	4,22±0,16	3,3±0,13	3,22±0,19	4,32±0,06
Контрольные животные	6,18±0,06	6,85±0,02	6,72±0,06	5,24±0,08	6,22±0,08	5,36±0,04	0,00	2,32±0,16	3,24±0,16

В результате патогенного воздействия стронгилоидесов и эймерий на организм животных наиболее ранние изменения происходят в крови. С первых дней инвазионного процесса мы регистрировали значительные изменения гематологических показателей во всех опытных группах.

В группах № 1 и № 2 при миграции личинок *Strongyloides martis* происходит достоверное снижение уровня гемоглобина до 135,5±1,43г/л (p≤0,05) и 137,1±2,15 г/л

на 3-й день инвазионного процесса, что на 19,4 % и 18,5 % соответственно ниже, чем в контрольной группе (168,2±2,19 г/л). В группе № 2 дополнительное введение культуры *Pasteurella multocida* приводит к максимальному снижению уровня гемоглобина на 14-й день исследований – до 116,6±2,24 г/л (p≤0,05). В группе № 3 при одновременном смешанном заражении наблюдается снижение количества гемоглобина в крови животных на 7-й день исследований до 118,4±1,18 г/л (p≤0,05).

Инвазирование животных группы № 1 *Strongyloides martis* приводит к снижению уровня эритроцитов на 3-й день исследований до $5,21 \pm 0,08 \times 10^{12}/л$ ($p \leq 0,05$), что на 33,4 % ниже, чем у контрольных животных ($7,83 \pm 0,12 \times 10^{12}/л$). В группе № 2 наибольшее снижение содержания эритроцитов (на 36,6 %) отмечается на 14-й день, что связано с осложнением влияния *Strongyloides martis* пастереллами. Усиленное негативное воздействие патогенов двух видов приводит к значительному снижению уровня эритроцитов животных в группе № 3 на 7-й день исследований – до $4,62 \pm 0,11 \times 10^{12}/л$ ($p \leq 0,05$), что ниже, чем у животных контрольной группы, на 41,8 %.

В группе № 1 миграция личинок *Strongyloides martis* приводит к возникновению воспалительных процессов, клинически проявляющихся достоверным увеличением уровня лейкоцитов до $8,67 \pm 0,18 \times 10^9/л$ ($p \leq 0,05$) на 3-й день инвазионного процесса, что на 25,7 % выше, чем в контрольной группе ($6,44 \pm 0,36 \times 10^9/л$). В группе № 2 дополнительное введение культуры *Pasteurella multocida* приводит к достоверному увеличению уровня лейкоцитов на 14-й день исследований до $10,54 \pm 0,43 \times 10^9/л$ ($p \leq 0,05$). В группе № 3 при одновременном смешанном заражении на 7-й день исследований наблюдается увеличение уровня лейкоцитов в крови животных до $11,58 \pm 1,06 \times 10^9/л$ ($p \leq 0,05$), что на 38,8 % выше, чем у контрольных животных.

Миграция личинок *Strongyloides martis* приводит к алергизации организма жи-

вотных, что проявляется увеличением уровня эозинофилов. В группе № 1 данный показатель увеличивается до $10,2 \pm 0,12$ % ($p \leq 0,05$) на 3-й день инвазионного процесса, что в 4 раза выше, чем в контрольной группе ($2,5 \pm 0,23$ %), в группе № 2 – до $9,8 \pm 0,21$ % ($p \leq 0,05$), в группе № 3 – до $10,7 \pm 0,43$ % ($p \leq 0,05$).

На фоне развития воспалительной реакции в результате миграции личинок *Strongyloides martis*, а также внедрения *Pasteurella multocida* в крови опытных животных происходит увеличение палочкоядерных нейтрофилов. Отмечено, что наибольшее увеличение наблюдается у животных группы № 3 на 7-й и 14-й дни исследований, соответственно, в 3,7 раза ($13,2 \pm 0,12$ %) и 2,9 раза ($11,2 \pm 0,14$ %) ($p \leq 0,05$).

С 3-го дня исследований у животных опытных групп наблюдается тенденция к увеличению активности лизоцима, уровень которого остается выше, чем у животных контрольной группы, на 7-й и 14-й дни исследований. Наибольшее увеличение – $12,28 \pm 0,13$ % ($p \leq 0,05$) – отмечается в группе № 3, что на 33,5 % выше, чем в контроле ($8,16 \pm 0,09$ %). В группе № 2 наибольшая активность лизоцима регистрируется на 14-й день исследований – $11,04 \pm 0,22$ %, что на 29,5 % выше, чем у контрольных животных ($7,78 \pm 0,22$ %). На 21-й день исследований уровень активности лизоцима достигает уровня животных контрольной группы ($8,42 \pm 0,13$ %) и, кроме того, имеет тенденцию к снижению, особенно в группе № 3 ($6,65 \pm 0,09$ %) (рисунок 1).



Рисунок 1. – Динамика лизоцимной активности сыворотки крови, % (серия 1)

У животных опытных групп с 3-го по 14-й дни исследований наблюдается увеличение уровня фагоцитарной активности нейтрофилов. На 7-й день исследований наибольшее увеличение – $79,26 \pm 1,12 \%$ ($p \leq 0,05$) – отмечается в группе № 3, что на 29,3 % выше, чем в контроле ($56,03 \pm 2,15 \%$). В группе № 2 наибольший уровень фагоцитарной активности регис-

трируется на 14-й день исследований – $76,81 \pm 1,22 \%$, что на 20,4 % выше, чем у контрольных животных ($61,12 \pm 1,26 \%$). На 21-й день исследований уровень фагоцитарной активности во всех опытных группах ниже, чем у животных контрольной группы ($60,48 \pm 2,34 \%$). Наибольшее снижение отмечается в группе № 3 ($43,55 \pm 1,15 \%$) (рисунок 2).

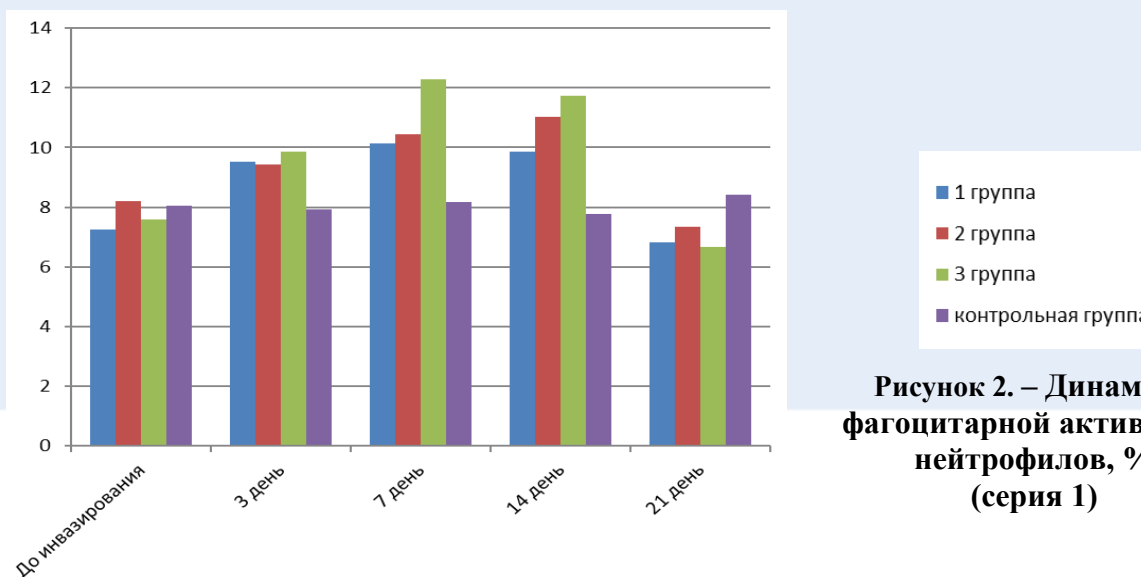


Рисунок 2. – Динамика фагоцитарной активности нейтрофилов, % (серия 1)

С 3-го по 14-й дни исследований у животных опытных групп наблюдается увеличение уровня розеткообразующих Т-лимфоцитов. В группе № 3 наибольшее увеличение регистрируется на 7-й день исследований и составляет $68,41 \pm 1,21 \%$ ($p \leq 0,05$), что на 36,4 % выше, чем в контроле ($43,51 \pm 1,13 \%$). В группе № 2 наибольший уровень розеткообразующих Т-лимфоцитов регистрируется на 14-й день

исследований – $63,29 \pm 1,37 \%$, что на 25,4 % выше, чем у контрольных животных ($47,22 \pm 1,21 \%$). На 21-й день исследований уровень данного показателя во всех опытных группах опускается ниже уровня животных контрольной группы ($44,68 \pm 2,16 \%$). Наибольшее изменение в этот период наблюдается в группе № 3 – $43,55 \pm 1,15 \%$ (рисунок 3).

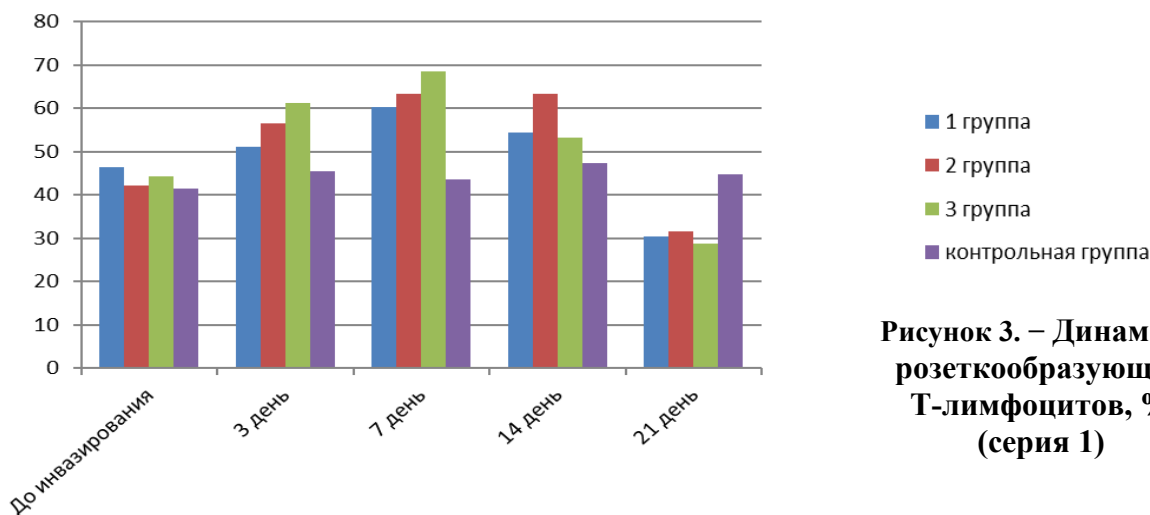


Рисунок 3. – Динамика розеткообразующих Т-лимфоцитов, % (серия 1)

При формировании гельминтозно-протозоозного паразитоценоза (серия экспериментов 2) установлено, что у животных группы № 4 миграция личинок *Strongyloides martis*, а у животных группы № 5 развитие *Eimeria vison* приводит к снижению уровня гемоглобина на 3-й день инвазионных процессов. В группе № 4 увеличение данного показателя составляет 18,8 % ($p < 0,05$). За счет интенсивного размножения *Eimeria vison* уровень гемоглобина в группе № 5 продолжает снижаться до 14-го дня после заражения и остается достоверно ниже по сравнению с контрольными животными (соответственно, $118,8 \pm 1,12$ г/л и $170,5 \pm 2,35$ г/л). Снижение составляет 25 % ($p < 0,02$). В группе № 1 уровень гемоглобина на 21-й день имеет тенденцию к увеличению, но остается ниже, чем у контрольных животных.

Наряду со снижением уровня гемоглобина, в обеих опытных группах наблюдается уменьшение содержания эритроцитов. Максимальное снижение данного показателя на 35,1 % ($p < 0,05$) отмечается в группе № 4 на 3-й день после заражения, что связано с миграцией личинок *Strongyloides martis* в результате нарушения целостности кишечной стенки и других органов. В группе № 5 патогенное действие *Eimeria vison*, приводящее к воспалительной реакции, способствовало наибольшему снижению уровня эритроцитов на 39 % ($p < 0,05$) на 7-й день после заражения. В обеих группах уровень эритроцитов остается ниже, чем у контрольных животных, до конца исследований.

В течение всего периода исследований в периферической крови животных обеих опытных групп наблюдается увеличение уровня лейкоцитов. Дополнительное заражение животных группы № 4 эймериями приводит к тому, что уровень лейкоцитов имеет максимальное увеличение на 14-й день и составляет 57,8 % ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными животными. В группе № 5 максимальное увеличение уровня лейкоцитов – на 23,8 % ($p < 0,05$) – регистрируется на 7-й день после заражения. В остальные дни уровень лейкоцитов имеет

тенденцию к снижению, но остается выше, чем у контрольных животных. Таким образом, степень увеличения уровня лейкоцитов зависит от стадии развития патогенного действия паразитов на организм животного.

Вместе с увеличением общего количества лейкоцитов изменяется и соотношение клеток белой крови.

Инвазирование животных гельминтами приводит к иммунобиологической перестройке организма хозяина, одной из особенностей которой является увеличение содержания эозинофилов в крови. Заражение стронгилоидесами приводит к увеличению данного показателя у животных группы № 4: на 3-й день после заражения – увеличение в 4,4 раза ($p < 0,02$). В группе № 5 данный показатель ниже, чем в группе № 4, но выше, чем у контрольных животных во все дни исследований, и находится в пределах $4,4 \pm 0,21$ – $7,4 \pm 0,11$ %.

Патогенное воздействие нематод и эймериид на организм животных приводит к существенным количественным изменениям нейтрофильной группы лейкоцитов. Миграция личинок стронгилоидесов в группе № 4 и последующее усиление воспалительной реакции на фоне дополнительного заражения эймеридами приводит к тому, что содержание палочкоядерных нейтрофилов находится на высоком уровне весь период исследований по сравнению с контрольной группой, но максимальное увеличение регистрируется в 2,8 раза ($p < 0,02$) на 7-й день. Увеличение данного показателя более выражено в группе № 5 и на 7-й день исследований составляет 3,3 раза ($p < 0,02$). Данный показатель в этой группе оставался на высоком уровне до окончания исследований.

У животных группы № 4 наблюдается увеличение активности лизоцима с 3-го дня исследований. Максимальное увеличение регистрируется на 7-й день после заражения и составляет 27 % ($p < 0,05$). На фоне последующего заражения животных данной группы эймериями этот показатель остается на высоком уровне и на 14-й день после заражения составляет 10,25 % (у

контрольных животных – 8,02 %). К 21-му дню активность лизоцима снижается на 28 % по сравнению с контрольными животными. У животных группы № 5 уровень ли-

зоцимной активности снижается с 7-го дня после заражения. Наибольшее снижение – на 26,9 % ($p < 0,05$) – отмечается на 14-й день (рисунок 4).

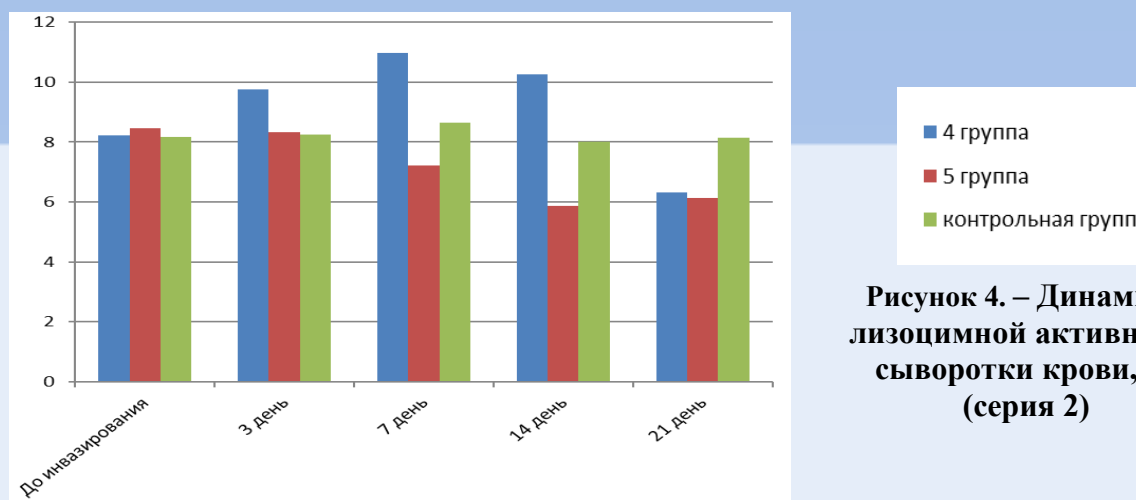


Рисунок 4. – Динамика лизоцимной активности сыворотки крови, % (серия 2)

У животных группы № 4 наблюдается увеличение фагоцитарной активности нейтрофилов с 3-го дня после заражения, в этот период она максимальная и составляет 24 % ($p < 0,05$). На 7-й и 14-й дни после заражения данный показатель остается выше, чем в контроле. На 21-й день после заражения регистрируется снижение фагоцитарной активности нейтрофилов на 18,1 % по сравнению с контрольными животными.

В группе № 5 уровень фагоцитарной активности нейтрофилов во все дни исследований ниже по сравнению с таковым у животных контрольной группы. На 7-й день после заражения данный показатель равен 42,72 % ($p < 0,05$), что на 36,6 % ниже, чем в контрольной группе. На 21-й день фагоцитарная активность нейтрофилов ниже, чем у контрольных животных (рисунок 5).

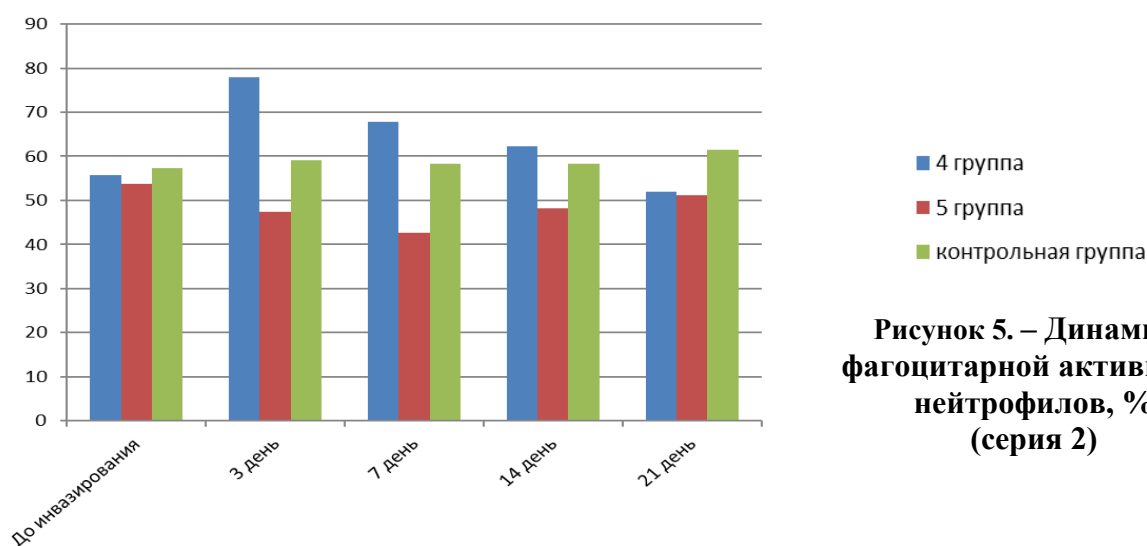


Рисунок 5. – Динамика фагоцитарной активности нейтрофилов, % (серия 2)

Таким образом, снижение уровня лизоцимной активности сыворотки крови и фагоцитарной активности нейтрофилов у животных группы № 5 свидетельствует о развитии угнетающего действия на рези-

стентность их организма.

У животных группы № 4 максимальный подъем уровня розеткообразующих Т-лимфоцитов наблюдается на 3-й день после заражения – на 51,3 % ($p < 0,02$). К 7-му

дню данный показатель незначительно снижается, но остается выше уровня контрольных животных.

У животных группы № 5 уровень розеткообразующих Т-лимфоцитов постепенно увеличивается по сравнению с контрольными животными. На 14-й день по-

сле заражения он достигает максимальных значений и составляет 58,4 % ($p < 0,05$), что на 36,9 % выше, чем в контрольной группе. На 21-й день исследований значение данного показателя в этой группе ниже, чем в группе № 1, но выше, чем у контрольных животных (рисунок 6).

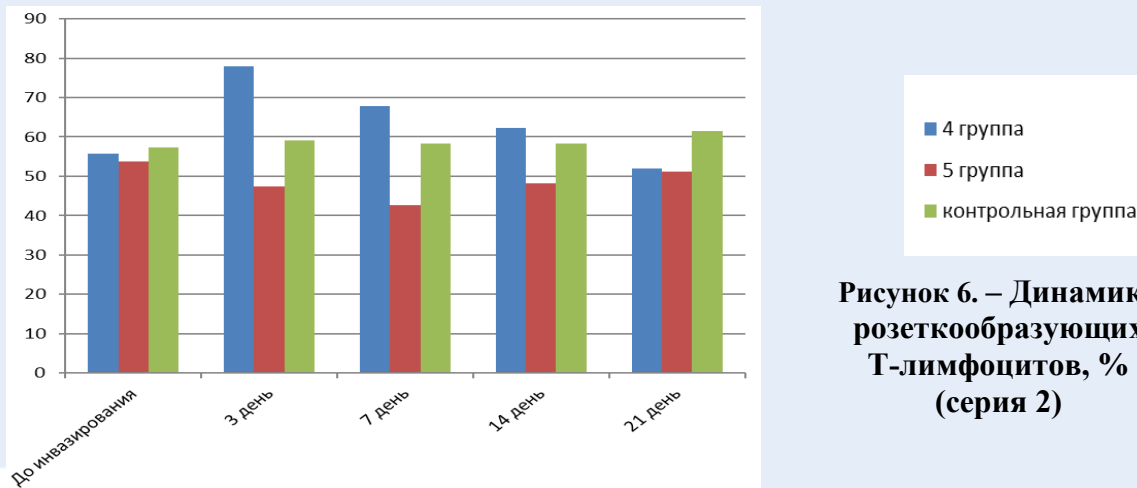


Рисунок 6. – Динамика розеткообразующих Т-лимфоцитов, % (серия 2)

Таким образом, при первичном заражении животных стронгилоидесами уже на 3-й день после заражения происходит резкое повышение содержания розеткообразующих Т-лимфоцитов. Это свидетельствует о том, что первым на антигены нематод реагирует клеточный иммунитет.

В 3-й серии экспериментов нами установлено, что в организме животных, одновременно инвазированных ассоциацией стронгилоидесов и эймерий, происходит более сложная иммунобиологическая перестройка. Наблюдается снижение количества гемоглобина в крови весь период исследований во всех опытных группах.

На 3-й день исследований наблюдается наибольшее снижение уровня гемоглобина – до $123,4 \pm 1,13$ ($p \leq 0,05$) г/л – в группе № 7, что на 27,5 % ниже, чем в контрольной группе ($170,2 \pm 1,25$ г/л). Уровень гемоглобина в группе № 6 соответствует $137,7 \pm 2,33$ г/л. В группе № 7 изменения уровня гемоглобина более значительные, чем в группе № 6. В группе № 8 уровень данного показателя ниже ($134,4 \pm 1,65$ г/л), чем в группе № 6, но выше, чем в группе № 7. В этот период происходит усиление патогенного воздействия за счет одновре-

менного воздействия *Strongyloides martis* и *Eimeria vison*. Затем имеется тенденция к увеличению данного показателя до 14-го дня с последующим снижением на 21-й день.

Наряду со снижением уровня гемоглобина, происходит также уменьшение содержания эритроцитов в крови животных как в группе № 6, так и в группах № 7 и № 8. Максимальное снижение содержания эритроцитов до $4,81 \pm 0,11 \times 10^{12}$ /л ($p \leq 0,02$) отмечается на 3-й день исследований в группе № 2, что на 42,9 % ниже, чем в контрольной группе ($8,42 \pm 0,24 \times 10^{12}$ /л). В группе № 8 данный показатель составляет $5,21 \pm 0,18 \times 10^{12}$ /л, что ниже, чем в группе № 6, но выше, чем в группе № 7. К 21-му дню содержание эритроцитов несколько возрастает, однако остается ниже, чем у контрольных животных.

При одновременном инвазировании животных стронгилоидесами и эймериями лейкоцитарная реакция периферической крови более выражена в группе с большей дозой инвазирования. Наибольшее количество лейкоцитов отмечается на 14-й день в обеих опытных группах и составляет $9,43 \pm 0,21 \times 10^9$ /л ($p \leq 0,05$) и $10,74 \pm 0,17 \times 10^9$ /л

($p \leq 0,05$), что на 46,4 % и 66,8 % выше, чем у контрольных животных. У животных группы № 8 уровень лейкоцитов имеет наибольшее увеличение на 21-й день исследований и составляет $10,48 \pm 0,26 \times 10^9/\text{л}$ ($p \leq 0,05$). Таким образом, степень увеличения уровня лейкоцитов зависит от дозы инвадента.

При одновременном смешанном инвазировании уровень эозинофилов в периферической крови животных групп № 6 и № 7 на 3-й день заражения составляет $12,8 \pm 0,26$ % и $17,4 \pm 0,18$ % соответственно, что в 4,1 и 5,6 раза ($p \leq 0,05$) выше, чем у контрольных животных. Затем их количество несколько снижается, но остается на более высоком уровне по отношению к контролю. В группе № 8 наибольшее увеличение данного показателя наблюдается на 3-й и 14-й дни исследований, что соответствует $11,6 \pm 0,36$ и $10,6 \pm 0,24$ (у животных контрольной группы – соответственно, $3,1 \pm 0,21$ и $1,8 \pm 0,14$).

Одновременное смешанное заражение сопровождается увеличением палочко-

ядерных нейтрофилов, начиная с 3-го дня исследований. Максимальное увеличение в 3,5 раза ($13,2 \pm 0,32$ %) и 4,3 раза ($16,5 \pm 0,15$ %) ($p \leq 0,05$) наблюдается на 7-й день инвазии в группах № 6 и № 7 соответственно. В группе № 8 наибольшее увеличение отмечается на 14 день исследований – до $12,3 \pm 0,21$ %. До конца опыта содержание палочкоядерных нейтрофилов в опытных группах остается на более высоком уровне по сравнению с контрольными животными.

У животных опытных групп, зараженных ассоциацией стронгилоидесов и эймерий, отмечается увеличение активности лизоцима до 14-го дня исследований. На 7-й день отмечается максимальное его увеличение до $11,35 \pm 0,12$ % ($P \leq 0,05$) в группе № 7, что выше, чем в контрольной группе, на 23,9 %. На 21-й день исследований данный показатель в группах № 6 и № 7 ниже, а в группе № 8, в связи с реинвазированием, выше, чем у контрольных животных (рисунок 7).

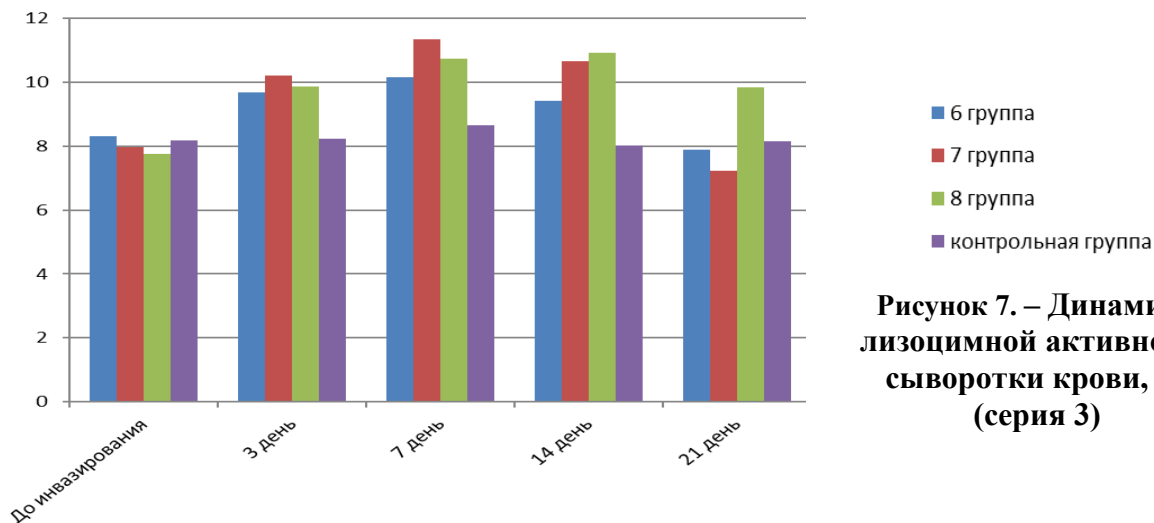


Рисунок 7. – Динамика лизоцимной активности сыворотки крови, % (серия 3)

Одновременное смешанное инвазирование животных стронгилоидесами и эймериями приводит к постепенному увеличению фагоцитарной активности нейтрофилов у животных групп № 6 и № 7. Ее высокий уровень регистрируется в течение всего периода исследований, но достигает наибольшего значения в группе № 6 на 7-й и 14-й день инвазирования – $65,24 \pm 3,12$ % (контроль $58,34 \pm 2,78$ %) и

$67,04 \pm 4,23$ % (контроль $55,86 \pm 3,41$ %); в группе № 7 – на 3-й и 7-й день – $79,16 \pm 2,13$ % (контроль $56,12 \pm 1,25$ %) и $75,58 \pm 3,64$ % (контроль $58,34 \pm 2,78$ %) ($P \leq 0,05$) соответственно. На 21-й день исследований данный показатель в группах № 6 и 7 ниже, а в группе № 8, в связи с реинвазированием, выше, чем у контрольных животных (рисунок 8).

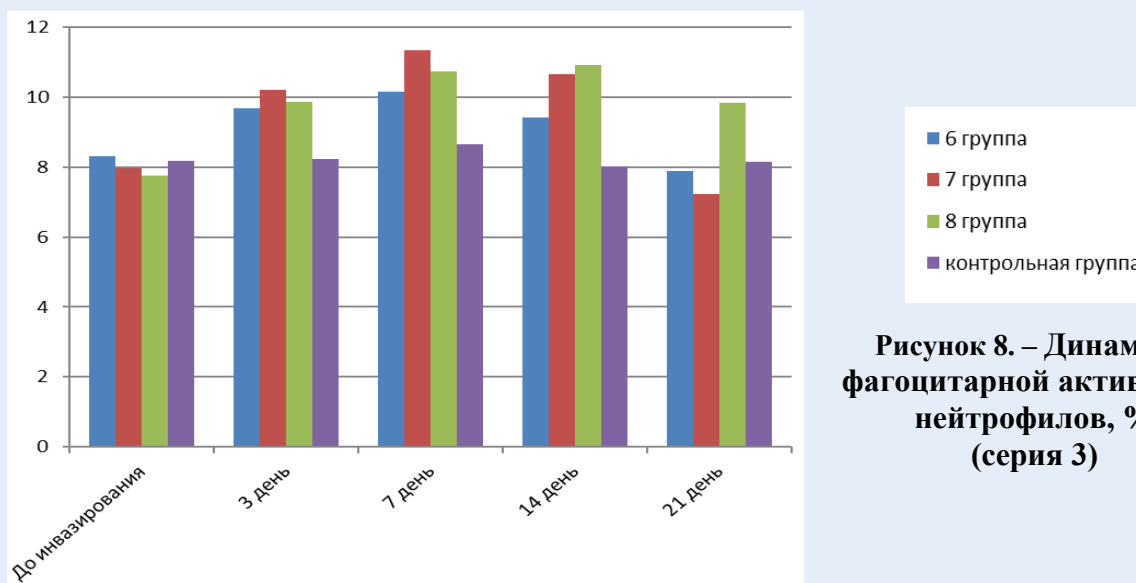


Рисунок 8. – Динамика фагоцитарной активности нейтрофилов, % (серия 3)

При заражении ассоциацией стронгилоидесов с эймериями в крови животных наблюдается увеличение количества розеткообразующих Т-лимфоцитов, которое носит более резкий характер в группе № 7 в сравнении с группой № 6. Уже на 3-й день после заражения данный показатель увеличивается в группе № 6 до $57,5 \pm 3,35$ %, а в группе № 7 – до $64,4 \pm 1,16$ % ($P \leq 0,05$), что на 42,8 % выше по сравнению с контрольными животными ($36,8 \pm 1,38$). В дальней-

шем происходит некоторое снижение содержания Т-лимфоцитов, но их уровень остается выше уровня контрольных животных до 14-го дня исследований в группах № 6 и 7 и до 21-го дня – в группе № 8. На 21-й день исследований уровень розеткообразующих Т-лимфоцитов в группе № 6 составляет $29,4 \pm 2,15$ %, в группе № 7 – $25,6 \pm 1,19$ %, что ниже такового у контрольных животных ($38,3 \pm 1,11$ %) (рисунок 9).

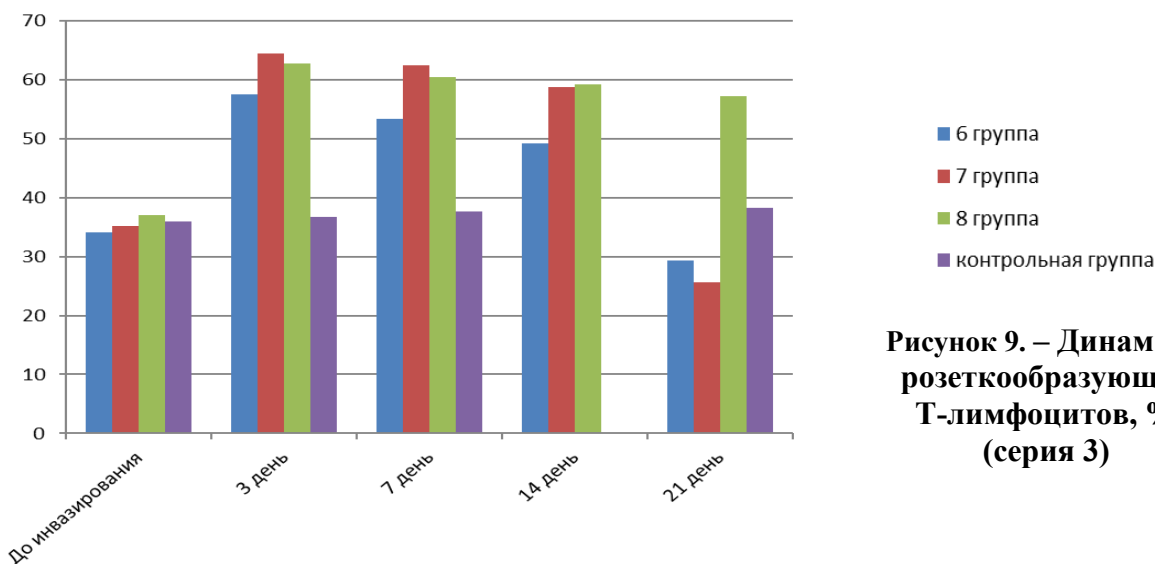


Рисунок 9. – Динамика розеткообразующих Т-лимфоцитов, % (серия 3)

ВЫВОДЫ

1. В естественных условиях обитания и зоокультуре ответная реакция организма млекопитающих на микстинвазию зависит

от очередности проникновения паразита в организм хозяина и дозы инвадента. При сочетании нематод и бактерий ведущую роль на первом этапе играют нематоды,

однако впоследствии бактерии начинают проявлять угнетающее воздействие на гельминтов, и роль бактерий становится приоритетной. Паразитоценоз, компонентами которого являются гельминты *Strongyloides martis* и бактерии *Pasteurella multocida*, значительно влияет на формирование защитных механизмов организма млекопитающих, что отражается на устойчивости животных. При совместном заражении нематодами и бактериями патологическое воздействие их в условиях паразитоценоза усиливается.

2. При первичном заражении нематоды не оказывают значительного влияния на приживаемость эймериид, однако влияние эймериид на нематоды можно оценивать как антагонистическое. При этом ответ хозяина на вторую инвазию изменяется под воздействием первой. При одновременной инвазии простейшими *Eimeria vison* и гельминтами *Strongyloides martis* воздействие на организм хозяина кумулируется, при этом значительно увеличивается срок выживания нематод под воздействием эндогенных стадий эймерий.

Неспецифическая иммуносупрессия, наблюдаемая при инвазировании простей-

шими *Eimeria vison*, ослабляет гуморальную и клеточную реакции организма хозяина на антигены гельминтов *Strongyloides martis*.

Патогенное влияние на фоне реинвазирования смесью паразитов растягивается во времени, но степень (интенсивность) его воздействия не превышает степени воздействия однократной смешанной инвазии в больших дозах.

3. Между гельминтами и микрофлорой желудочно-кишечного тракта млекопитающих существует ярко выраженный антагонизм. В условиях паразитоценоза происходит нарушение колонизационной резистентности, снижается общее количество микроорганизмов, значительно уменьшается количество бифидумбактерий и лактобактерий, *E.coli*, непатогенной группы *Bacillus*, кокковой непатогенной флоры. Возрастает количество микроорганизмов *Candida* spp. и *Clostridium* sp., появляется *Pseudomonas* sp. Наиболее выраженные изменения происходят при одновременном инвазировании нематодами и бактериями, а также при совместном инвазировании нематодами и простейшими в наибольших дозах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герасимчик, В. А. Кишечные паразитозы пушных зверей / В. А. Герасимчик // Стратегия развития звероводческой отрасли Белкоопсоюза на 2007–2010 годы: материалы семинара. – Минск, 2008. – С. 85–109.
2. Методические указания по проведению микробиологического контроля при выращивании молодняка пушных зверей / С. В. Полоз [и др.]. – Минск, 2008. – 13 с.
3. Новиков, Д. К. Клеточные методы иммунодиагностики / Д. К. Новиков, В. И. Новикова. – Минск : Беларусь, 1979. – С. 50–56.
4. Петров, А. М. Ветеринарно-гельминтологические исследования: лабораторные методы исследования в ветеринарии / А. М. Петров, В. Г. Гагарин. – М. : Гос. изд-во исследовательской литературы, 1953. – 588 с.
5. Пляшенко, С. И. Определение естественной резистентности организма сельскохозяйственных животных: метод. рекомендации / С. И. Пляшенко, Г. К. Волков, В. Т. Сидоров. – Минск, 1985. – 33 с.
6. Симакова, А. В. Общая паразитология: учеб. пособие / А. В. Симакова, Н. В. Полторацкая, Т. Ф. Панкова. – Томск : Издательский дом Томского государственного университета, 2016. – 76 с.
7. Тараканов, Б. В. Методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птицы / Б. В. Тараканов. – М. : Научный мир, 2006. – 188 с.

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

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹Врохмейер Л., доктор медицины²Власенко В.В., доктор биологических наук, профессор³Кучвальский М.В., научный сотрудник¹Красникова Е.Л., научный сотрудник¹¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского», г. Минск²N.Y. Institute of Medical Research in Bayside, New York, USA³Винницкий национальный аграрный университет, г. Винница

ВЕРОЯТНАЯ СВЯЗЬ МИЕЛОИДНОГО И ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА С ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Резюме

Из перевиваемых миелобластов человека, больного острым миелоидным лейкозом (Kasumi-1), и T-лимфоцитов больного T-лимфобластной лейкемией (Jurkat), в том числе из 0.22 μ m фильтратов их лизатов, выделены микобактерии туберкулеза (МБТ) с дефектной клеточной стенкой (cell wall deficient – CWD) с одинаковым антигенным составом. Изоляты обладали уникальными свойствами, после разрушения ультразвуком и фильтрации через Amicon Ultracel[®] 100 K и Millex[®] GP 0.22 μ m их фильтраты давали рост CWD МБТ, имевшими одинаковый антигенный состав, в том числе с исходными изолятами. Основную роль в выделении CWD МБТ играла инкубация исследуемого материала в стимуляторе роста, посев на специальную питательную среду и «слепые» пересевы.

Summary

From the cultures cells of myeloblasts of the human patient with acute myeloid leukemia (Kasumi-1) and T-lymphocytes the patient with T-lymphoblastic leukemia (Jurkat) including from 0.22 μ m filtrates of cells lysates there are isolated mycobacteria of tuberculosis (MBT) with deficient cell wall (cell wall deficient – CWD) with the same of antigens composition. Isolates had a number of unique properties. After destruction by ultrasound and filtration through Amicon Ultracel[®] 100 K and Millex[®] GP 0.22 μ m their filtrates gave growth of CWD MBT having the same antigenic composition, including starting isolates. The main role in the isolation of CWD MBT was the incubation of the test material in the growth stimulants, sowing on a special nutrient medium and «blind» passages.

Поступила в редакцию 16.01.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

В XX веке из крови людей, больных лейкозом были выделены частично кислотоустойчивые (ЧКУ) фильтрующиеся микроорганизмы [1, 2, 3], имевшие общие антигены с типичными микобактериями туберкулеза (МБТ) [4], что позволило считать их измененными МБТ (cell wall deficient – CWD- или L-формами) [5, 6]. Подобные микроорганизмы выделяли из опухолей, в том числе у животных [4, 7]. Способность изолятов персистировать в организме лабораторных животных и в ряде случаев индуцировать образование опухолей [8, 9] позволила связать латентную туберкулезную

инфекцию с онкогенезом. По ряду причин эти исследования не получили широкого признания [10]. Лишь в последние годы китайскими учеными были продолжены исследования в этом направлении и подтверждена связь МБТ и L-(CWD) форм МБТ с онкогенезом [11–14].

Достаточно случайно в мазках концентрированной культуральной жидкости клеток почки эмбриона овцы, инфицированных вирусом бычьего лейкоза (Ag FLK-BLV), были обнаружены кислотоустойчивые (КУ) палочки. При посеве 14 серий Ag FLK-BLV с применением стимуляторов роста и специальных питательных сред во

всех случаях были выделены CWD МБТ. Заражение морских свинок изолятам из Ag FLK-BLV вызывало у них образование антител, реагирующих с Ag FLK-BLV. Такие же антитела появлялись у свинок и после введения гомогенатов органов животных, зараженных изолятами из Ag FLK-BLV [15]. Было установлено, что в клетках FLK-BLV персистируют фильтрующиеся вирусоподобные формы МБТ, иногда реверсирующие в некислотоустойчивые (НКУ-CWD) и КУ формы [16].

Идентичность изолятов из FLK-BLV, сывороток крови и гомогенатов лимфатических узлов лейкозных коров, крови человека, больного саркомой, экспериментально полученных штаммов CWD МБТ [15, 16] вызывает необходимость дальнейшего изучения связи латентной туберкулезной инфекции и онкогенеза, в частности с лейкозами. С этой целью были исследованы культуры клеток миелобластов больного острым миелоидным лейкозом (Kasumi-1) и Т-лимфоцитов человека с Т-лимфобластной лейкемией (Jurkat).

ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТОВ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

I этап. Перевиваемые миелобласты человека, больного острым миелоидным лейкозом (Kasumi-1), и Т-лимфоциты больного Т-лимфобластной лейкемией (Jurkat) выращены на среде RPMI-1640 с 10%-ной бычьей эмбриональной сывороткой.

Для выявления МБТ и их антигенов исследовали мазки клеток, окрашенные дифференцирующим иммунопероксидазным методом (ДИП) с аффинно-очищенными антителами к *M. tuberculosis* и *M. bovis*.

Клетки в ростовой среде разрушали замораживанием и оттаиванием, часть полученных лизатов фильтровали через фильтры 0.22 μm .

Лизаты и фильтраты исследовали в ПЦР на ДНК МБТ (праймеры 16S RNA, MPB 70, MPB 64, IS 6110).

Лизаты и фильтраты смешивали со стимулятором роста и после 48 ч инкуба-

ции высевали на среду MucCel DW.

После 2 дней инкубации посевов делали мазки и «слепые» пересевы.

При появлении видимого роста колоний делали мазки и пересевы.

Из выросшей бактериальной массы выделяли ДНК, которую исследовали в ПЦР (праймеры 16S RNA, MPB 70, MPB 64, IS 6110).

II этап. Лизаты и фильтраты, находившиеся в стимуляторе роста 8 месяцев при температуре 37 °С, высевали на среду MucCel DW.

После 2 дней инкубации посевов делали 2 «слепых» пересева.

При появлении видимого роста колоний делали их мазки и пересевы.

Из выросшей бактериальной массы выделяли ДНК, которую исследовали в ПЦР (праймеры 16S RNA, MPB 70, MPB 64, IS 6110).

III этап. Изоляты, выделенные на II этапе исследований, разрушали ультразвуком, соникаты фильтровали через Amicon Ultracel[®] 100 K, ультрафильтраты пропускали через Millex[®] GP 0.22 μm , смешивали со стимулятором роста, инкубировали и сеяли на среду MucCel DW.

После 2 дней инкубации посевов были сделаны 3 «слепых» пересева.

При появлении видимого роста колоний делали их мазки и пересевы.

Из бактериальной массы выделяли ДНК, которую исследовали в ПЦР (праймеры 16S RNA, MPB 70, MPB 64, IS 6110).

Полученную на всех этапах бактериальную массу изолятов отмывали 0,5%-ным раствором фенола и дезинтегрировали на Bandelin Sonopuls 2400 (3 цикла по 5 мин, 8х). Соникаты использовали для изучения антигенного состава.

Для микроскопии на стекла наносили по 100 мкл суспензий клеток с 3 % H_2O_2 для инактивации эндогенной пероксидазы (ЭП). Мазки фиксировали (65 °С) и окрашивали ДИП методом, при котором КУ клетки приобретали красный, НКУ CWD МБТ – коричневый, а немикобактериальная микрофлора и ткани – синий цвет [17]. В ряде случаев для ДИП ок-

раски применяли кроличью антисыворотку к *M. tuberculosis* H₃₇Rv, истощенную (1:1) лизированной кровью человека, и конъюгат пероксидаза – анти-IgG кролика (Sigma). Микроскопию проводили на Olympus B51X, 10x100.

Для посева клетки в ростовой среде замораживали и оттаивали, часть лизатов фильтровали через Millex[®] GP 0.22 µm. Лизаты и их фильтраты 0.22 µm смешивали 1:2 со стимулятором роста ВКГ (патент Украины № 43467), выдерживали 48 ч при температуре 37 °С и по 0,3 мл вносили в пробирки с питательной средой MucSel DW [14, 15, 16, 18, 19]. Контролем служили посева эмбриональной сыворотки для питательной среды и ее фильтрата (0.22 µm) со стимулятором роста (1:2). Посевы инкубировали при температуре 37 °С.

Лизаты и фильтраты 0.22 µm в стимуляторе роста, выдержанные 8 месяцев при температуре 37 °С высевали на среду MucSel DW.

Во всех случаях при отсутствии роста колоний делали «слепые» пересевы.

Реакцию иммунодиффузии (РИД) ставили по Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2009) с использованием антисывороток «D» из крови человека, больного саркомой [16, 19], из FLK-BLV с. 30 (IsAg BLV 30) [15], «Br 2» из мозга козы с губкообразными изменениями [20], содержащими по результатам тестирования набором Iddex *M. bovis* AB антитела к специфическим антигенам МБТ МРВ 70 и МРВ 83 [19]. Кроме того, использовали антисыворотки к соникатам изолятов CWD МБТ:

- из 1st international standard PPD tuberculin *M. bovis* AN5 – «Is st PPD» [18],
- «С» из крови человека, больного туберкулезом,
- «D-а» из крови человека с латентной туберкулезной инфекцией,
- из FLK-BLV с. HC фильтрованный через фильтр 0.22 µm (IsAg BLV HC 0,22) [15],
- к соникатам типичных (КУ) и CWD

штаммов *M. tuberculosis* H₃₇Rv и *M. bovis* (8, Vallee).

Перекрестный иммуноэлектрофорез с промежуточным гелем (ПИЭФ ПГ) и ракетный иммуноэлектрофорез (РИЭФ) ставили по N. Axelsen, J. Kroll, B. Weeke [21]. При исследовании антигенного состава для сравнения использовали соникаты известных CWD штаммов *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. bovis* 8, *M. bovis* tbc 24 (из лимфатического узла коровы с туберкулезными изменениями), HeLa 3K/0.22 (из культуры клеток HeLa).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Изоляты (0,2–0,5 мг/мл) прогревали 5 мин (95 °С) в лизирующем буфере. ДНК выделяли на колонках с сорбентом (ИБОХ НАНБ). Амплификацию проводили на C1000TM ThermoCycler (BioRad) с праймерами 16S RNA Mycobacteria, МРВ 70, МРВ 64 («Праймтех»). Электрофорез амплификатов проводили в 2%-ном агарозе, результаты учитывали на Molecular Imager GelDocTM XR+(BioRad). ПЦР – real time проводили с праймерами IS 6110 («Праймтех»).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На I этапе в лизатах клеток Kasumi и Jurkat, а также в фильтрате Kasumi 0.22 µm в ПЦР были обнаружены следы ДНК микобактерий (таблица 1), которая явно находилась в клетках, так как концентрат клеток в ПЦР с праймерами 16sRNA, МРВ 70, МРВ 64 давал более интенсивные амплификаты (таблица 1, рисунок 1). Наряду с положительным результатом ПЦР real time (с праймерами IS 6110) это доказывало присутствие в клетках Kasumi и Jurkat ДНК МБТ (таблица 1, рисунок 1).

Положительные результаты ПЦР были получены и после 8 месяцев инкубации лизатов клеток в стимуляторе роста при температуре 37 °С, причем дополнительно ДНК МБТ была выявлена в фильтрате 0.22 µm лизата клеток Jurkat (таблица 1, рисунок 1).

Таблица 1. – Результаты исследования культур клеток Kasumi-1 и Jurkat

Препараты	ПЦР+	I посев, ПЦР+ с ДНК изолята. Наименование изолята	ПЦР+ после 8 мес. инкубации в стимуляторе роста	II посев после 8 мес. инкубации в стимуляторе роста, ПЦР+ с ДНК изолята. Наименование изолята
Kasumi лизат	MPB 64 IS 6110	во 2 слепом пересеве - тетракокки, трансформирующиеся в коккоиды MPB70±, MPB 64 « Is Kasumi »	16sRNA MPB 64 IS 6110	не исследовали
Kasumi лизат концентрата клеток	16sRNA MPB 70 MPB 64	не исследовали	не исследовали	не исследовали
Kasumi фильтрат 0.22 мкм лизата	MPB 64	neg.	MPB 64 IS 6110	полиморфные палочко- видные формы в исход- ном посеве « Is Kasumi 0,22 II/1 » (16s RNA, MPB 70, IS6110) и во 2 слепом пересеве « Is Kasumi 0,22 II/2 » (IS6110, MPB 70±)
Jurkat лизат	MPB 64 IS 6110	во 2 слепом пересеве полиморфные палочковидные формы, 16s RNA, MPB 70, MPB 64 « Is Jurkat 402 »	MPB 64	рост в первичном посеве через 18 дн. MPB 64 « Is Jurkat II »
Jurkat фильтрат 0.22 мкм лизата	neg.	в 3 слепом пересеве коккоиды в тетрадах, MPB 64+, « Is Jurkat 0.22 »	MPB 64	палочковидные формы (MPB 64, MPB 70) « Is Jurkat 0.22 II »
Эмбриональная сыворотка	neg.	neg.	не исследовали	-
Фильтрат 0.22 мкм эмбриональ- ной сыворотки	neg.	neg.	не исследовали	-
<i>M. bovis</i> (K+)	16sRNA MPB 70 MPB 64	-	16sRNA MPB 70 MPB 64	-
K-	neg.	-	neg.	-

При ДИП окраске клетки Kasumi (рисунки 2a, 2b) и Jurkat (рисунки 2c, 2d) окрашивались в коричневый цвет (рисунки 2b, 2d, 5b), что указывало на присутствие в них антигенов, реагировавших с антителами к антигенам МБТ. Более интенсивное коричневое окрашивание клеток отмечено с антисывороткой к *M. tuberculosis H₃₇Rv*,

причем, хотя и не столь интенсивное, оно отмечалось (рисунок 3), если использовали антисыворотку к *M. tuberculosis H₃₇Rv*, адсорбированную лизированной кровью человека для удаления антител к тканевым антигенам человека, которые могли в ней присутствовать.

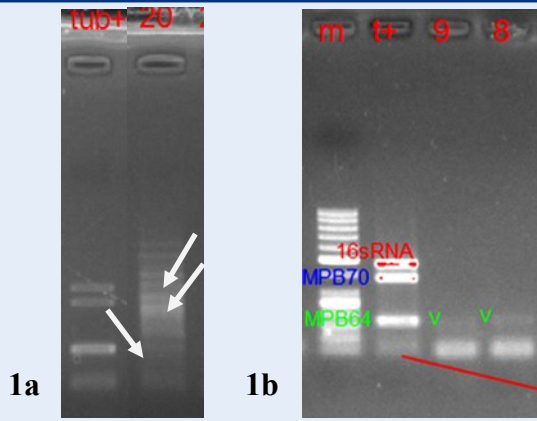


Рисунок 1. – ПЦР ДНК: лизата концентрированных клеток Kasumi (1a, 20); фильтратов 0.22 μm лизата Jurkat (1b, 9) и Kasumi (1b 8), инкубированных 8 месяцев при температуре 37 °C в стимуляторе роста; tub+ и t+ положительный контроль (сверху вниз линии 16s RNA, MPB70, MPB64); m – маркер м.м.

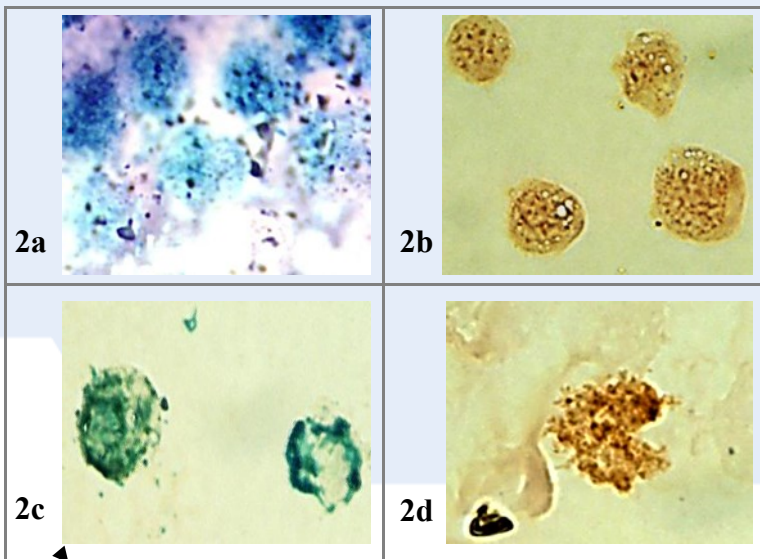


Рисунок 2. – ДИП окраска клеток Kasumi (2a, 2b), Jurkat (2c, 2d): 2a, 2c – Kasumi и Jurkat контроль инактивации ЭП, синяя и зеленая окраска клеток подтверждает инактивацию ЭП; 2b, 2d – ДИП окраска клеток Kasumi, Jurkat Ig к *M. bovis*. Коричневая окраска, указывает на присутствие в клетках антигенов МБТ; 10×100

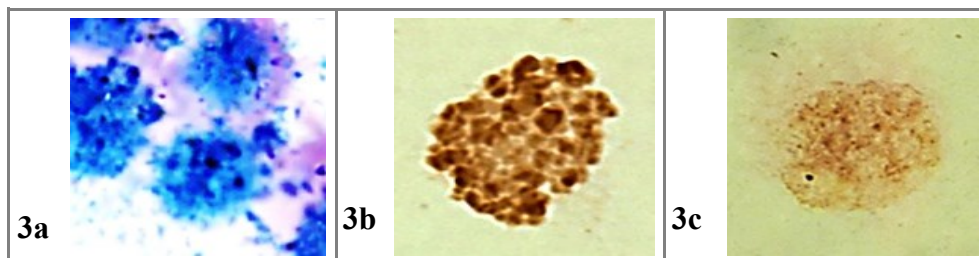


Рисунок 3. – ДИП окраска клеток Kasumi с антисывороткой к *M. tuberculosis H₃₇Rv* (3b), в том числе истощенной кровью человека (3c), 3a – контроль инактивации ЭП (синее окрашивание клеток)

В посевах лизатов клеток Kasumi и Jurkat через 1-2 дня появился мелкий стекловидный «налет». В мазках обнаружены симпласты (сетевидные структуры) (рисунки 4a, 4b), нитевидные формы (рисунки 4c, 4d), протопласты, в которых формировались палочковидные формы (рисунок 5a), а также единичные палочковидные формы с типичной для CWD МБТ морфологией (рисунки 5b, 5c). Во всех случаях они реа-

гировали с антителами к МБТ (рисунки 4b, 4c, 4d, 5b, 5c), что проявлялось специфической коричневой окраской. Интенсивный рост колоний получен после 2 «слепых» пересевов лизатов клеток Kasumi и Jurkat, а также 3 пересевов фильтрата 0.22 μm Jurkat (таблица 1). Посев эмбриональной сыворотки и ее фильтрата и 8 «слепых» пересевов роста колоний не дали.

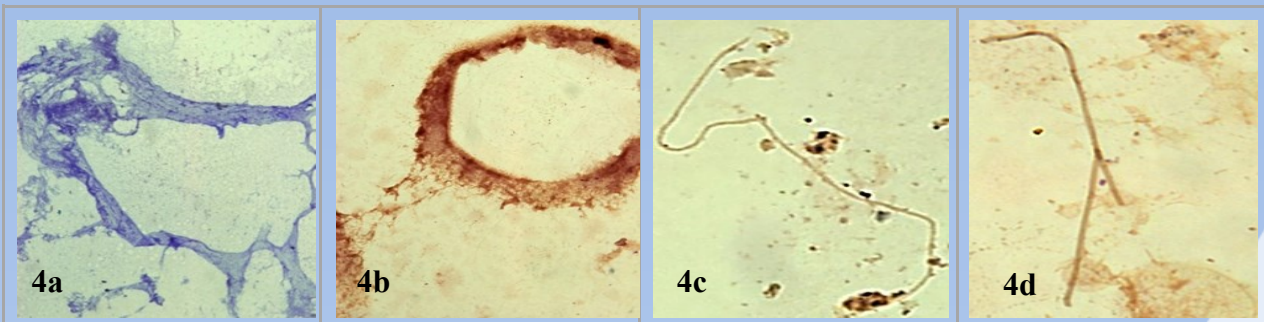


Рисунок 4. – Мазки посевов лизатов клеток Kasumi (4a, 4c) и Jurkat (4b, 4d), 2-й день культивирования: 4a – Kinyoun; 4b–4d – ДИП окраска, 10×10

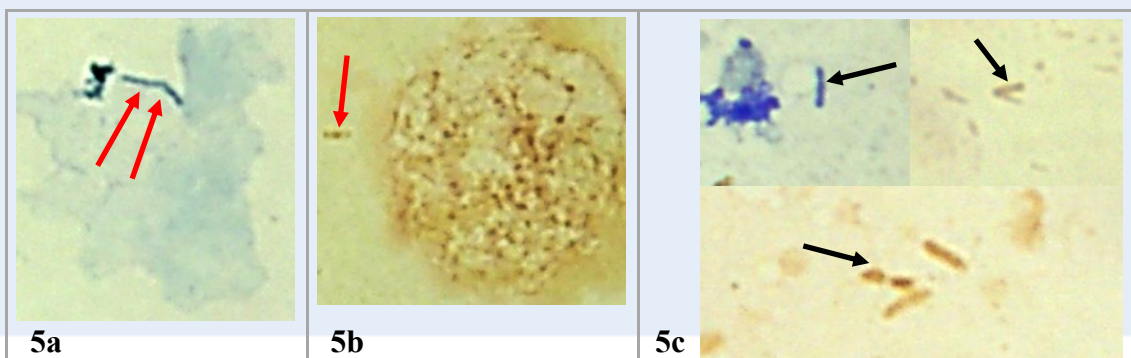


Рисунок 5. – Мазки посева Kasumi, 2 день культивирования: 5a – образование палочковидных форм в протопласте; 5b – зернистая палочка и сохранившаяся клетка; 5c – палочковидные формы

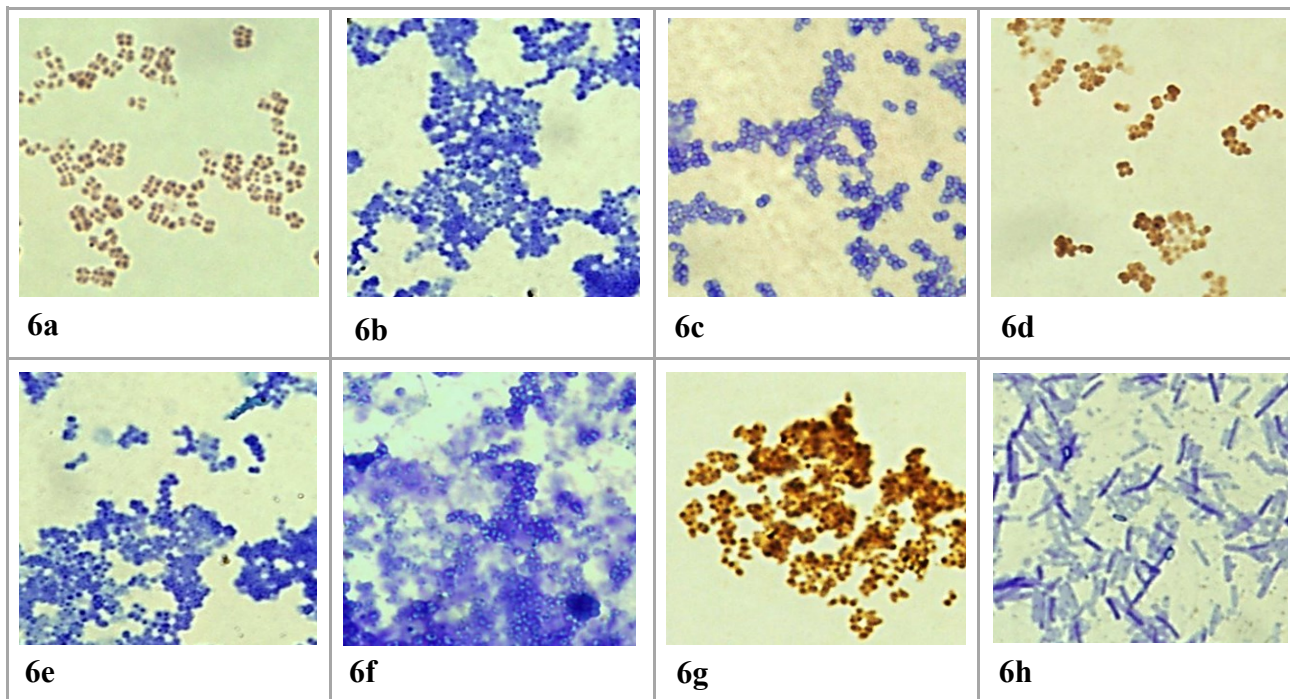


Рисунок 6. – Первичный рост «Is Kasumi» (6a), «Is Jurkat 0.22» (6d) и «Is Jurkat» (6h). Рост после 5 пересевов «Is Kasumi» (6b) и «Is Jurkat 0.22» (6e); 4 месяца без пересева «Is Kasumi» (6c) и «Is Jurkat 0,22» (6f). 6g – изолят «С» из крови больного туберкулезом, к которому «Is Kasumi» и «Is Jurkat 0,22» были наиболее близки по антигенному составу. 6a, 6d, 6g – ДИП окраска; 6b, 6c, 6e, 6f, 6h – Kinyoun, 10×100

В колониях лизата Kasumi обнаружены тетракокки (рисунок 6a), в колониях фильтрата 0.22 μm Jurkat – коккоиды, часто собранные в тетрады (рисунок 6d). После нескольких пересевов изоляты из лизата Kasumi и фильтрата 0.22 μm Jurkat почти не отличались по морфологии (рисунки 6b, 6e) и при культивировании без пересева приобретали вид «пустых» коккоидов (рисунки 6c, 6f).

В посеве лизата Jurkat выросли характерные для CWD МБТ полиморфные палочковидные формы (рисунок 6g).

Результаты ПЦР подтвердили, что изоляты из клеток Kasumi и Jurkat с учетом их НКУ относятся к CWD МБТ (таблица 1, рисунок 7).

«Is Kasumi» и «Is Jurkat» агглютинировались антисыворотками к *M. tuberculosis H₃₇Rv* и *M. bovis Vallee* (таблица 2), что указывало на наличие у них общих антигенов с типичными МБТ, тем не менее, антигенный состав этих изолятов различался.

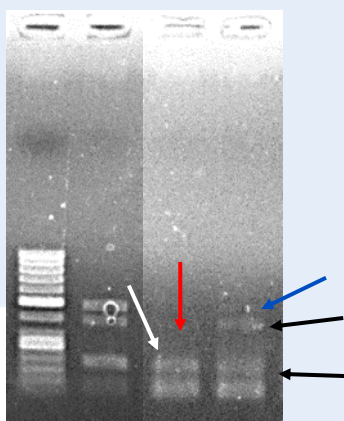








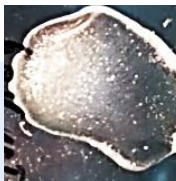


Рисунок 7. – ПЦР (слева-направо) маркер молекулярной массы, амплификаты: К+ (сверху вниз 16s RNA, MPB70, MPB64), ДНК «Is Kasumi» и «Is Jurkat». Красная стрелка – следы амплификата MPB 70, синяя – 16sRNA

Таблица 2. – Агглютинация изолятов Kasumi и Jurkat антисыворотками к МБТ

Изоляты	Отриц. сыворотка	Антисыворотки, оценка реакции	
		<i>M. tuberculosis H₃₇Rv</i>	<i>M. bovis Vallee</i>
«Is Kasumi»	 -	 +++	 ++++
«Is Jurkat»	 -	 +++++	 +++++
«Is Jurkat 0.22»	 -	 ++++	 ++++
<i>Staph. aureus</i> и <i>Strept. epidermidis</i> не агглютинировались антисыворотками			

В РИД соникат «Is Jurkat» интенсивно реагировал с большинством антисывороток к CWD МБТ, образуя идентичные преципитаты с соникатами, гомологичными антисывороткам и изолятом из лимфатического узла коровы, больной туберкулезом (рисунок 8, таблица 3). Вместе с тем, он почти не образовывал преципитатов с антисывороткой к CWD МБТ «С» из крови человека, больного туберкулезом (рисунок 8, таблица 3). В то же время соникаты «Is Kasumi» и «Is Jurkat 0.22» реагировали с антисывороткой к CWD МБТ «С», образуя

идентичные преципитаты, указывавшие на их иммунохимическое родство (рисунок 9). В ПИЭФ ПГ у них регистрировалось 11-12 общих антигенов с CWD МБТ «С» (рисунок 10), но с антисыворотками к CWD МБТ из других источников они почти не давали преципитатов (таблица 3, рисунок 9), хотя в ИФА, в порядке увеличения интенсивности реакций, реагировали с антисыворотками к *M. tuberculosis* H₃₇Rv, CWD *M. bovis* 8 и к изоляту FLK-BLV 1.30 (рисунок 11).

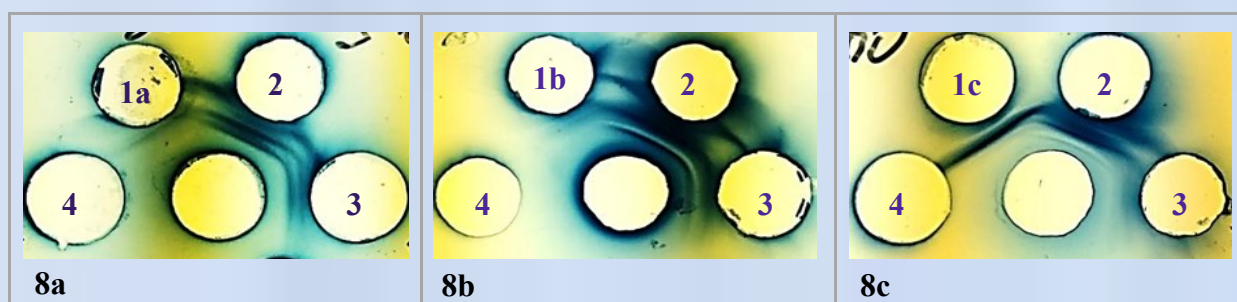


Рисунок 8. – РИД: в центре антисыворотки а – к CWD МБТ из FLK-BLV с. 30; б – к CWD МБТ «Br 2»; с – к изоляту CWD МБТ из эталона ППД *M. bovis* AN5. В периферических лунках (расположение одинаковое) соникаты: 2 – «Is Jurkat»; 3 – изолята из лимфатического узла туберкулезной коровы; 4 – «Is Jurkat 0.22»; соникаты: 1а – CWD МБТ из FLK-BLV с. 30; 1б – CWD МБТ «Br 2»; 1с – CWD МБТ из эталона ППД *M. bovis* AN5.

Преципитаты плавно сливаются (иммунохимическая идентичность антигенов)

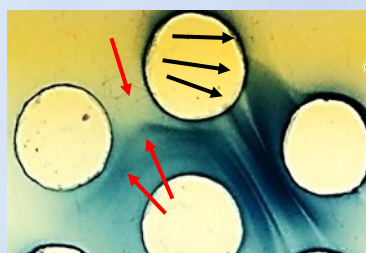


Рисунок 9. – РИД: в центре антисыворотка к CWD МБТ «С»; в периферических лунках соникаты (слева-направо): «Is Kasumi», «Is Jurkat 0.22», CWD МБТ «С»

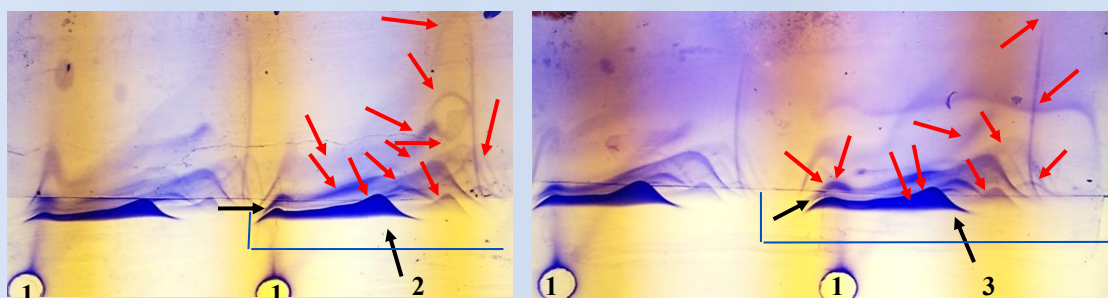


Рисунок 10. – ПИЭФ ПГ сониката CWD МБТ «С» (1 – в круглых лунках, 100 мкл). В ПГ (выделен линиями) внесено по 60 мкл соникатов «Is Kasumi» (2) и «Is Jurkat 0.22» (3).

В геле II направления антисыворотка к CWD МБТ «С» (41 мкл/см³ агарозы). В правых частях гелей в реакции участвуют антигены исследуемых соникатов, влияя на образование преципитатов, которые при иммунохимическом родстве могут быть выше, исчезать, образовывать базовые линии (стрелки)

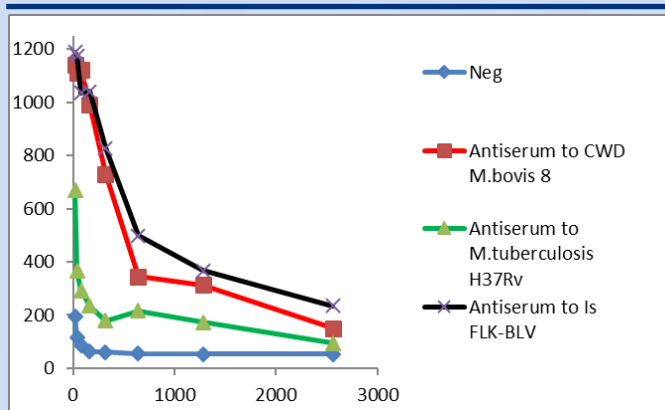


Рисунок 11. – Результаты ИФА сониката «Is Kasumi».
Ось абсцисс – разведения сывороток, ось ординат – ОП

Лизаты и фильтраты клеток Kasumi и Jurkat были 8 месяцев выдержаны в стимуляторе роста при температуре 37 °С, без признаков пророста. При посеве на среду МусСел DW лизат Jurkat, фильтраты 0.22 μm Kasumi и Jurkat дали рост колоний (изоляты обозначены символом «П»), причем рост удалось получить в исходном посеве фильтрата Kasumi («Is Kasumi 0.22 П/1») и во 2 слепом пересеве («Is Kasumi 0.22 П/2»).

Рост начинался появлением сетеподобных (рисунок 12а) и зернистых нитеподобных (рисунок 12b) структур, иногда с КУ фрагментами (рисунок 12b). Позже появлялись полиморфные палочковидные формы с типичной для CWD МБТ морфологией (рисунки 13, 14), причем часть клеток имела красноватый оттенок или участки красного цвета, что указывало на их частичную КУ (рисунки 12b, 13f, 14b).

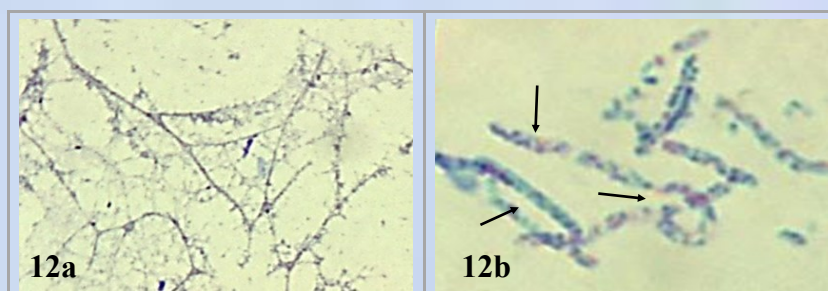


Рисунок 12. – Начало роста в посевах фильтрата 0.22 μm Kasumi П (12а) и лизата Jurkat П (12b) после 8 месяцев инкубации в стимуляторе роста. Видны красноватые (КУ) фрагменты клеток (стрелки). Kinyoun; 12а – 10×100; 12b – увеличение на 50 %

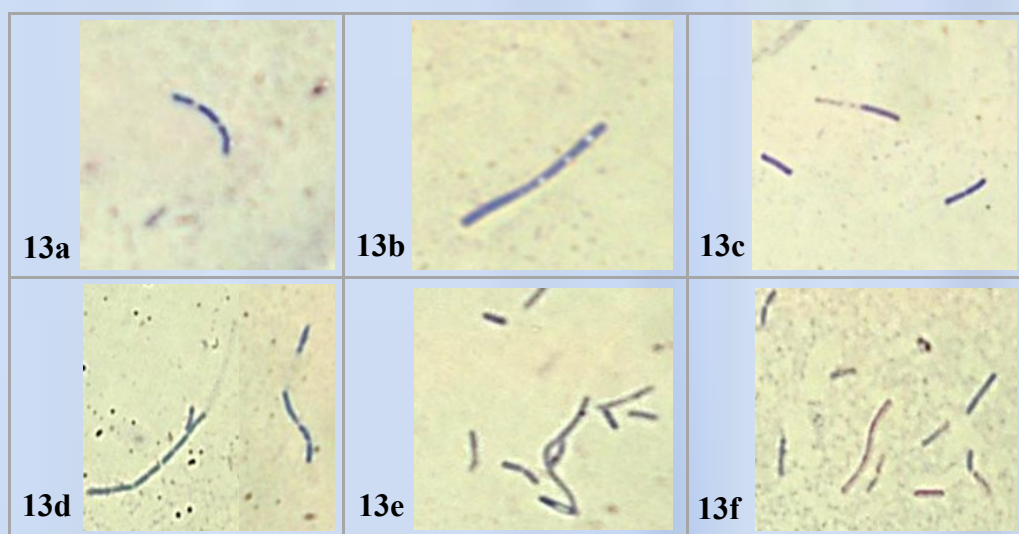


Рисунок 13. – Рост фильтратов 0.22 μm Kasumi П/1 (13а–13с) и Jurkat П (13d–13f) в пересевах, 13f – заметен красноватый оттенок клеток (частичная КУ), Kinyoun, 10×100

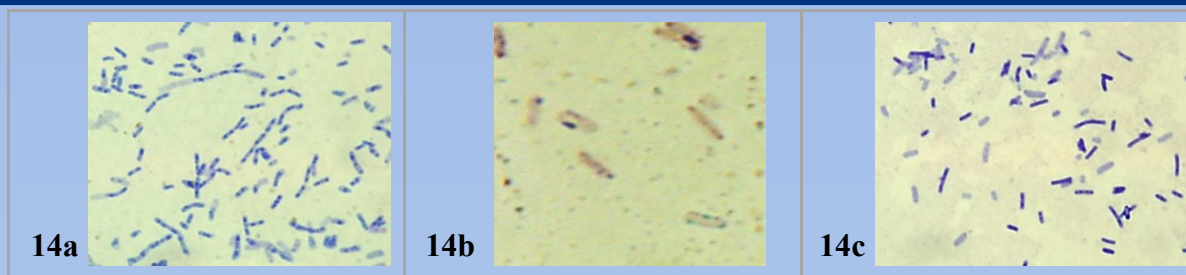


Рисунок 14. – Рост фильтрата 0.22 μm Kasumi II/2. 14a, 14b – первичный рост; 14c – рост в пересеве. 14b – заметен красноватый оттенок клеток (частичная КУ), Kinyoun, 10 \times 100

Изоляты II имели близкий антигенный состав, который почти не отличался от антигенного состава «Is Jurkat» I этапа (таблица 3, рисунки 15–17). Различия касались в основном концентрации антигенов, что было заметно в РИЭФ по высоте преципитатов (рисунки 15, 16). В РИД иммунодоминантные антигены «Is Kasumi» и «Is Jurkat» демонстрировали иммунохимическую идентичность, в том числе с изолятом из FLK-BLV с. 27 [15] и изолятом из лимфатического узла с туберкулезными изменениями (рисунок 17).

Ранее было установлено, что МБТ и их CWD формы обладают уникальными адаптивными свойствами [18, 19]. В связи с этим исследовали способность изолятов

из лейкозных клеток восстанавливать жизнеспособность после дезинтеграции и фильтрации через стерилизующие и ультрафильтры. Для этого клетки «Is Kasumi II 0.22/2» и «Is Jurkat II 0.22» в 0,5%-ном растворе фенола с 0,1 % азида натрия (pH 7,4) разрушали ультразвуком. Уцелевшие клетки и клеточные стенки отделяли центрифугированием (6000g). Соникаты фильтровали через Amicon Ultracel[®] 100 K, ультрафильтраты пропускали через Millex[®] GP 0.22 μm , смешивали со стимулятором роста (1:3), 48 ч инкубировали при температуре 37 °C и сеяли на среду MucCel DW. В процессе культивирования сделано 3 «слепых» пересева.

Таблица 3. – Антигенный состав изолятов из лизатов и фильтратов клеток Kasumi» и Jurkat, выделенных на I, II и III этапе

Соникаты	Число линий преципитации с антисыворотками							
	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	CWD <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	«D»	Is FLK-BLV с. 30	«Br2»	«C»	«Is st PPD»	Is FLK-BLV HC 0.22
Соникаты гомологичные а/с	6	5-6	6	6	8-9	10	6	5-6
CWD <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	3-4	5-6	6-7	4-6	5-7	0-1	5-7	5-7
Is Kasumi	0-1 ^X	0-1	0-1	0-1	0	3-4	0-1	0-1
Is Jurkat 0.22	0-1	0-1	0-1	0	0-1	4-5	0-1	0-1
Is Jurkat	1-2	5-6	6-7	6-7	7-9	0-1	6-7	4-5
Is Kasumi II 0.22/1	0-1	5-6	5	4-5	4-5	0-1	4-5	4-5
Is Kasumi II 0.22/2	0-1	5-6	3-4	4	4-5	0-1	3-4	4
Is Kasumi II 0.22/2 100 kDa+0.22	1-2	5-6	4	4	5	0-1	4	4
Is Jurkat II	0-1	4	5	4-5	4-5	0-1	4-5	4
Is Jurkat II 0.22	0-1	5-6	5	4	4-5	0-1	3-4	4
Is Jurkat II 0.22 100 kDa+0.22	0-1	5-6	5	4-5	6	0-1	4-5	4-6

Примечание – 0-1^X – нечеткий, слабый преципитат

Рост в посеве ультрафильтрата сониката «Is Jurkat II 0.22» появился во 2 «слепо» пересеве через 14 дней («Is Jurkat II 0.22 100kDa+0.22»), «Is Kasumi II 0.22/2» – через 16 дней («Is Kasumi II 0.22/2 100kDa+0.22»). В мазках обоих изолятов обнаруживали характерные полиморфные палочковидные формы (рисунок 18). При их пересевах в клетках появлялись КУ фрагменты (рисунок 19a), и часть клеток приобретала красноватый оттенок (частичная КУ) (рисунки 19b, 19c). Кроме того, в «Is Jurkat II 0.22 100kDa+0.22» и «Is Kasumi II 0.22/2 100kDa+0.22» встречались абсолютно идентичные формы (рисунки 18, 19). Более того, они имели очень близкий анти-

генный состав и демонстрировали выраженное антигенное родство с CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv (рисунки 20, 21).

Из-за вакцинации БЦЖ, активной или латентной туберкулезной инфекции клетки тканей человека и животных, больных лейкозом, могут содержать микобактериальные антигены и ДНК. Но маловероятно, что это может десятилетиями продолжаться в лимфоцитах *in vitro*, если МБТ не связаны с этиологией лейкемией. В культурах лейкозных миелобластов Kasumi и Т-лимфоцитов Jurkat были выявлены микобактериальные антигены. Ранее антигены, родственные антигенам МБТ, были обнаружены в клетках опухолей [22, 23].

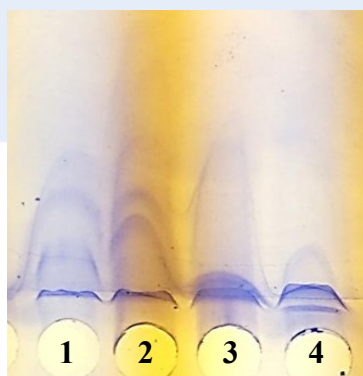


Рисунок 16. – РИЭФ соникатов (по 100 мкл): 1 – Is Jurkat; 2 – Is Jurkat II; 3 – Is Kasumi II 0.22/1; 4 – Is Kasumi II 0.22/2, антисыворотка к «Is st PPD» (40 мкл/см³ агарозы). Видно, что изоляты имеют близкий антигенный состав, различия преимущественно в концентрации отдельных антигенов

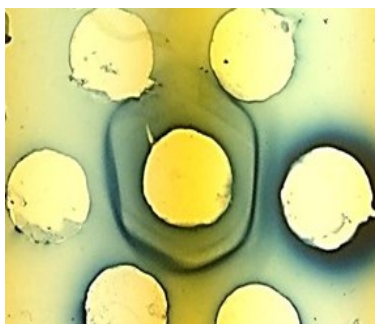


Рисунок 17. – РИД: в центре антисыворотка к CWD МБТ НС фильтр, в периферических лунках соникаты: CWD МБТ из FLK-BLV с. 27, «Is Jurkat II», «Is Jurkat», «Is Kasumi II 0.22/2», CWD МБТ из лимфатического узла с туберкулезными изменениями

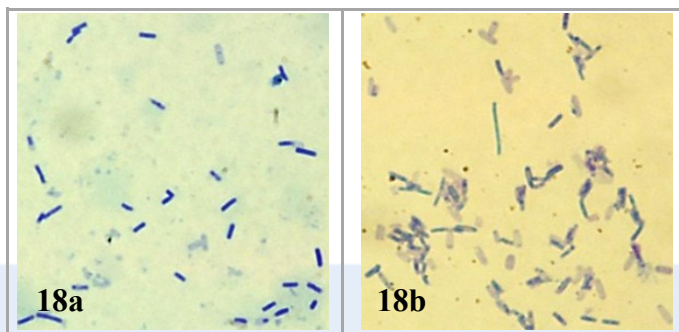


Рисунок 18. – Первичный рост «Is Jurkat II 0.22 100 kDa+0.22» (a), «Is Kasumi II 0.22/2 100 kDa+0.22»(b), Kinyoun, 10×100

Но это объяснялось скорее иммунохимическим родством опухолевых и микобактериальных антигенов, а не persistence

цией МБТ. Обнаружение в лейкозных клетках не только антигенов, но и ДНК МБТ, а также выделение CWD МБТ пока-

зало связь туберкулезной инфекции с лейкемиями. С эмбриональной сывороткой, добавляемой в питательную среду (наиболее вероятный компонент, в котором могут быть МБТ), были получены отрицательные результаты.

МБТ находились в лейкозных клетках, скорее всего, в вирусоподобной форме, так как не обнаружено явных бактериальных форм, а CWD МБТ удалось выделить не только из лизатов клеток, но и из

их фильтратов 0.22 μm . Возможно, ДНК вирусоподобных форм МБТ или ее фрагменты были интегрированы в геном хозяина, как у ретровирусов. За счет этого могли синтезироваться микобактериальные антигены и формироваться новые вирусоподобные формы. Такую возможность подтверждает обнаружение интеграции генома МБТ или его части в ДНК человека при аденокарциномах легких [14].

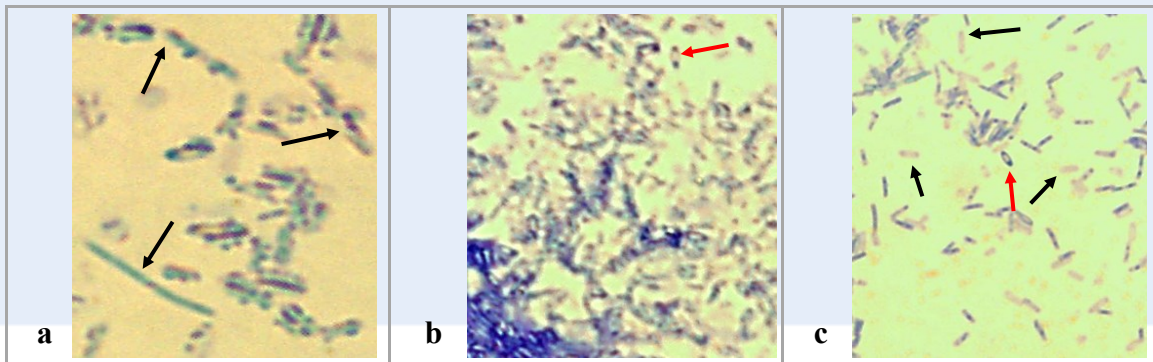


Рисунок 19. – Частично КУ клетки и их фрагменты (красного цвета) в пересечах «Is Jurkat II 0.22 100 kDa+0.22» (a, b) и «Is Kasumi II 0.22/2 100 kDa+0.22» (c).

а – черная стрелка – КУ зерно в центре длинной палочки,
 б – красноватые ореолы клеток, красная стрелка (b и c) –
 одинаковые формы клеток, Kinyoun, 10×100

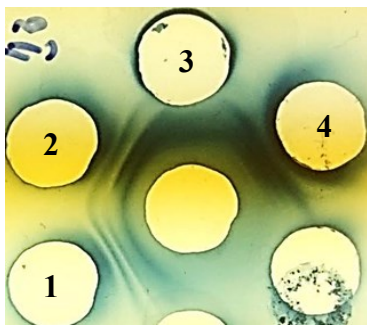


Рисунок 20. – В центре антисыворотка к CWD *M. tuberculosis H₃₇Rv*. В периферических лунках соникаты: 1 – «Is Kasumi II 0.22/2 100kDa+0.22»; 2 – «Is Jurkat II 0.22 100kDa+0.22»; 3 – «Is HeLa 3kDa+0.22»; 4 – CWD *M. tuberculosis H₃₇Rv*

На I этапе из лизата Kasumi и фильтрата 0.22 Jurkat были выделены коккоиды, собранные в тетрады, которые при пересечах трансформировались в одинаковые,

часто «пустые» коккоиды. Несколько позже из лизата клеток Jurkat были выделены полиморфные палочковидные формы.

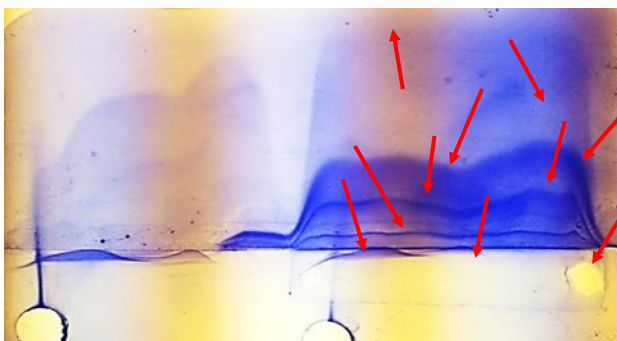


Рисунок 21. – ПИЭФ ПГ (с промежуточным гелем) сониката CWD *M. tuberculosis H₃₇Rv* (по 100 мкл в круглых лунках) и сониката «Is Jurkat 100 kDa+0.22» (по 100 мкл в ПГ), в геле II направления 0,5 мл антисыворотки к CWD *M. tuberculosis H₃₇Rv*. Преципитаты общих антигенов выделены стрелками

Коккоиды Kasumi и Jurkat 0.22 имели близкий антигенный состав и общие антигены с типичными МБТ, но заметно отличались от антигенного состава «Is Jurkat» и других штаммов CWD МБТ. Исключение составили CWD МБТ «С» из крови человека, больного туберкулезом, с устойчивостью к изониазиду, пипразинамиду, этамбутолу (рисунок 6g), которые также отличались по антигенному составу от CWD штаммов, использованных в работе, и име-

ли форму коккоидов (рисунок 6g). Не исключено, что первичное выделение коккоидов CWD МБТ связано с тем, что лейкозные клетки много лет культивировались на средах с антибиотиками. Надо отметить, что у CWD МБТ, в том числе и «Is Jurkat», при повторяющихся контактах с антибиотиками резко менялась морфология, и при развитии устойчивости в популяциях начинали превалировать коккоиды (рисунок 22).

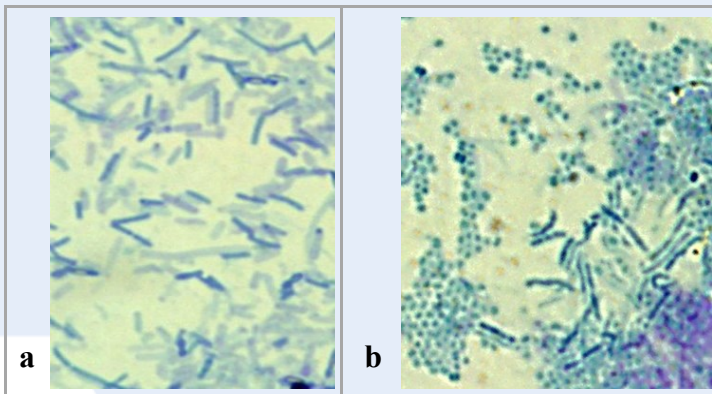


Рисунок 22. – Изменение морфологии «Is Jurkat» под действием антибиотиков: а – исходный «Is Jurkat» (полиморфные палочковидные формы); б – «Is Jurkat» после 4 контактов в диффузионном тесте с азитромицином (появление коккоидов)

После длительной инкубации со стимулятором роста удалось не только выделить CWD МБТ из всех лизатов и фильтратов (на I этапе CWD МБТ не выделены из фильтрата клеток Kasumi), но получить изоляты с очень близкой морфологией и антигенным составом. Это свидетельствовало о том, что МБТ и их измененные формы могли быть связаны с разными видами лейкозией, что, возможно, зависит от генома хозяина и особенностей адаптивных реакций микроорганизма [7, 8, 9].

Можно предположить, что патогенетические эффекты туберкулезной инфекции могут быть связаны с «бессмертностью» и другими уникальными свойствами МБТ [18, 19]. Это было продемонстрировано в III серии опытов. Так, «Is Kasumi II 0.22/2» и «Is Jurkat II 0.22» в 0,5%-ном растворе фенола с 0,1 % азида натрия были разрушены ультразвуком, соникаты профильтрованы через Amicon Ultracel® 100 K и через Millex® GP 0.22 µm. Тем не менее, после инкубации в стимуляторе роста во II «слепом» пассаже ультрафильтраты соникатов «Is Kasumi II 0.22/2» и «Is Jurkat II 0.22» дали рост CWD МБТ с КУ элемента-

ми, имевшими практически одинаковый антигенный состав. Эти результаты подтвердили ранее установленную способность защитных форм МБТ выдерживать высокую температуру, проходить через ультрафильтры, в частности 100 K [18, 19].

Существование фильтрующихся форм МБТ убедительно доказано. Фильтраты (0.22 µm) суспензии *M. bovis* BCG при определенных условиях культивирования давали на среде Middlebrook 7H9 рост CWD форм, имевших специфический ген *rncA* [24, 25]. Объяснить рост CWD МБТ в посевах ультрафильтратов 100K соникатов «Is Kasumi II 0.22/2» и «Is Jurkat II 0.22» сложно. Геном МБТ состоит из 4–4,3 млн bp с массой около $2,8 \times 10^6$ kDa [24, 25] и обычно помещается в клетках объемом порядка 628×10^6 нм³. Скорее всего, он полностью помещается и в фильтрующихся (0.22 µm) формах МБТ [24, 25] объемом около $5,58 \times 10^6$ нм³. Это в 113 раз меньше, чем у полноценных микобактерий, но в 3,1 раза больше, чем у известных клеток минимального размера ($1,77 \times 10^6$ нм³) [28]. Вместе с тем, Amicon Ultracel® 100K пропускают частицы в пределах 10 нм. То

есть объем защитных форм должен быть максимум 524 нм^3 , что в 10 000 раз меньше, чем у известных фильтрующихся форм МБТ? Полный геном поместиться в них не может, и непонятно, почему посев ультрафильтратов дал рост CWD МБТ. Риск контаминации был маловероятным, так как ультрафильтраты содержали 0,5 % фенола и 0,1 % азида натрия, а рост колоний начался после 2 «слепых» пересевов, что не характерно для контаминантов.

Для исключения возможных дефектов использованный ультрафильтр Amicon Ultracel[®] 100K был проверен ультрафильтрацией IgG из антисыворотки к *M. bovis*. Оказалось, что ультрафильтрат не реагировал в ИФА с соникатом *M. bovis*, то есть ультрафильтр надежно задерживал молекулы 150 kDa и больше.

Полученные результаты показали, что фильтрующиеся жизнеспособные формы МБТ по размеру были меньше антител (IgG)! Этот парадоксальный вывод согласуется с результатами 89-летней давности G. Sanarelli и A. Alessandrini [29, 30]. В их опытах фильтрующиеся формы МБТ проходили через коллоидные фильтры, не пропускавшие столбнячный (150 kDa) и дифтерийный токсины (62 kDa) [29], но задерживались фильтром 397 Da (фильтруемость азотнокислого стрихнина) [30]! Единственным приемлемым объяснением может быть уникальная пластичность защитных форм МБТ, позволяющая «просачиваться» через ультрафильтры. Если это не так, то остается предполагать существование прионоподобных форм МБТ [20] и неизвестных способов передачи генетической информации и регенерации клеток.

Проведенная работа была направлена на бактериологическое исследование лейкозных клеток. Безусловно, эффективное выделение CWD МБТ было достигнуто благодаря применению стимулятора роста ВКГ и питательной среды МусСел DW, ранее успешно использовавшихся для изучения CWD МБТ [15–20]. На наш взгляд, основную роль играла инкубация исследуемого материала в стимуляторе роста. Меха-

низм стимуляции роста пока не известен, состав стимулятора роста подобран эмпирически [31]. Вероятно, он стимулирует поступление водных растворов в защитные формы МБТ и появление ростовых факторов, которые в субпиколярных концентрациях вызывают рост клеток [32].

Возможно, защитные формы МБТ, проходящие через ультрафильтры, несут только фрагменты генома, и для появления полноценных клеток необходимо их слияние с образованием протопластов и сетевидных структур, дающих начало CWD формам, что наблюдалось в первичных посевах. «Слепые» пересевы, скорее всего, обеспечивали контакт и слияние активированных защитных форм в протопласты.

Проведенные исследования позволили идентифицировать изоляты из культур лейкозных клеток, как CWD МБТ. На следующем этапе будет проведено изучение их геномов и сравнение на этом уровне с CWD МБТ из других источников. Пока не определен вид микобактерий, от которого происходили изоляты из лейкозных клеток, но однозначно, это МБТ млекопитающих. Необходимы дополнительные исследования, так как нет четких методов дифференциации CWD форм таких близких видов, как *M. tuberculosis* и *M. bovis*. Этот вопрос важен для выяснения возможных причин возникновения туберкулезной инфекции, приводящей к неопластическим процессам. Безусловно, это может быть *M. tuberculosis*, попадающий в организм трансплацентарно или обычными путями. С точки зрения индукции опухолей нуждается в изучении вопрос применения вакцины БЦЖ, а также туберкулина [18]. Высокий риск несет латентная туберкулезная инфекция у сельскохозяйственных животных и птиц, так как термическое обеззараживание продуктов животноводства эффективно в отношении типичной КУ формы возбудителей и профилактики классического туберкулеза, но не действует на возникающие при термическом шоке защитные формы, способные восстановить жизнеспособность в виде CWD МБТ [33].

ЛИТЕРАТУРА

1. Mazet, G. *Presence d'elements alcoolo-acido-resistants dans les moelles leucemiques et les moelles non leucemiques* / G. Mazet // *Le Sem. des Hopitaux*. – 1962. – Vol. 38. – P. 35–38.
2. *Morphological, biological, and immunological studies on isolates from tumors and leukemic bloods* / F. B. Seibert [et al.] // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1970. – Vol. 174. – № 2. – P. 690–728.
3. Alexander-Jackson, E. *Microscopic and Submicroscopic Phases of P. Cryptocides from Fresh Lymphocytic leukemia* / E. Alexander-Jackson // *J Int Acad Metab*. – 1978. – № 1. – P. 9–18.
4. Diller, I. C. *Growth and morphological variability of three similar strains of intermittently acid-fast organisms isolated from mouse and human malignant tissues* / I. C. Diller // *Growth*. – 1962. – Vol. 26. – P. 181–208.
5. Livingston, V. *Presence of consistently recurring invasive mycobacterial forms in tumor cells* / V. Livingston, R. M. Allen // *Microscop Soc Bull*. – 1948. – Vol. 2. – P. 5–18.
6. Wuerthele-Caspe, V. *Mycobacterial forms observed in tumors* / V. Wuerthele-Caspe // *J. Am. Med. Womens Assoc*. – 1949. – № 4. – P. 135–141.
7. Diller, I. C. *Three similar strains of pleomorphic acid-fast organisms isolated from rat and mouse tissues and from human blood* / I. C. Diller // *The American Review of Respiratory Disease*. – 1962. – Vol. 86. – P. 932–935.
8. Diller, I. C. *Isolation of pleomorphic, acid-fast organisms from several strains of mice* / I. C. Diller, A. J. Donnelly, M. E. Fisher // *Cancer Research*. – 1967. – Vol. 27, № 8. – P. 1402–1408.
9. Diller, I. C. *Experiments with mammalian tumor isolates* / I. C. Diller, A. J. Donnelly // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1970. – Vol. 174, № 2. – P. 655–674.
10. Broxmeyer, L. *Cancer and the Science of Denial – with Breast Cancer/Long Island Breast Cancer* / L. Broxmeyer // *Journal of Tumor Medicine and Prevention*. – 2017. – Vol. 1, № 3. – P. 555–563.
11. Zhang, S. *Detection of Mycobacterium tuberculosis L-form infection in tissues of lung carcinoma* / S. Zhang, Z. Guang-Ling, T. Yan-Sheng // *Chin. J. Public Health*. – 2009. – Vol. 25. – P. 1317–1318.
12. Tian, Y. Z. *Study on the relationship between Mycobacterium tuberculosis L-infection and lung cancer* / Y. Z. Tian, X. K. Cui, T. Hao // *Tumor*. – 2009. – № 29. – P. 1085–1089.
13. Tian, Y. *Detection of Mycobacterium tuberculosis L-forms and MPB64 gene in breast cancer tissues* / Y. Tian, X. K. Cui, T. Hao // *J. of Practical Medicine*. – 2013. – № 15. – P. 45–46.
14. *Clinical end-points associated with Mycobacterium tuberculosis and lung cancer: implications into host-pathogen interaction and coevolution* / Y. Tian [et al.] // *BioMed Research International*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–9.
15. *Further evidence for cancer as cell-wall-deficient mycobacterial disease* / A. P. Lysenko [et al.] // *Journal of Molecular Pathological Epidemiology*. – 2016. – Vol. 1, № 1. – P. 1–12.
16. *Вирус бычьего лейкоза – вирусоподобная форма микобактерий туберкулеза?* / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2019. – № 1. – С. 15–24.
17. *Выявление микобактерий туберкулеза в тканях с помощью дифференцирующей иммунопероксидазной окраски* / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез и болезни легких*. – 2014. – № 10. – С. 55–58.
18. *The tuberculin skin test: How safe is safe? – the tuberculins contain unknown forms capable of reverting to cell-wall-deficient mycobacteria* / A. P. Lysenko [et al.] // *Clinical and Experimental Medical Sciences*. – 2014. – Vol. 2. – P. 55–73.
19. *Микобактерии туберкулеза при термическом воздействии образуют защитные формы, проходящие через ультрафильтры и восстанавливающие жизнеспособность в виде CWD форм* / А. П. Лысенко [и др.] // *Эпизоотология, иммунология, фармакология, санитария*. – 2019. – № 1. – С. 33–45.
20. *CWD tuberculosis found in spongiform disease formerly attributed to prions: its implication towards mad cow disease, scrapie and Alzheimer's* / A. P. Lysenko [et al.] // *Journal of Molecular Pathological Epidemiology*. – 2017. – Vol. 3, № 3. – P. 1–13.
21. *A manual of quantitative immuno-electrophoresis: methods and applications* / ed. N. H. Axelsen. – Oxford: Blackwell, 1977. – 169 p.
22. *Borsos, T. Antigenic Relationship Between Mycobacterium bovis (BCG) and a Guinea Pig Hepatoma* / T. Borsos, H.J. Rapp // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. – 1973. – Vol. 51, № 3. – P. 1085–1086.

23. Bucana, C. *Immuno-electronmicroscopic Analysis of Surface Antigens Common to Mycobacterium bovis (BCG) and Tumor Cells* / C. Bucana, M.G. Hanna // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. – 1974. – Vol. 53, № 5. – P. 1313–1323.

24. Markova, N. *Filterable forms and L-forms of Mycobacterium bovis BCG: impact for live vaccine features* / N. Markova, G. Slavchev, L. Michailova // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2012. – Vol. 8, № 6. – P. 759–764.

25. Slavchev, G. *Stress-induced L-forms of Mycobacterium bovis: a challenge to survivability* / G. Slavchev, L. Michailova, N. Markova // *The New Microbiologica*. – 2013. – Vol. 36, № 2. – P. 157–166.

26. *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence* / S. T. Cole [et al.] // *Nature*. – 1998. – Vol. 393, № 6685. – P. 537–544.

27. *The complete genome sequence of Mycobacterium bovis* / T. Garnier [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – Vol. 100, № 13. – P. 7877–7882.

28. *Size limits of very small microorganisms: proceedings of a workshop : The Compass series. Size limits of very small microorganisms* / eds. National Research Council (U.S.), National Research Council (U.S.). – Washington, D.C: National Academy Press, 1999. – 148 p.

29. Sanarelli, G. *Demonstration in vivo et in vitro des formes filtrantes du virus tuberculeux* / G. Sanarelli, A. Alessandrini // *C. rend. Soc. Biol.* – 1930. – Vol. 104. – P. 1241.

30. Sanarelli, G. *Demonstration in vivo de l'ultravirus tuberculeux* / G. Sanarelli, A. Alessandrini // *C. rend. Soc. Biol.* – 1931. – Vol. 106. – P. 426–429.

31. Власенко, В. В. *Туберкулез в фокусе проблем современности* / В. В. Власенко. – Винница: Наука, 1998. – 350 с.

32. *A family of autocrine growth factors in Mycobacterium tuberculosis* / G. V. Mukamolova [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2002. – Vol. 46. – № 3. – P. 623–635.

33. *Оценка эффективности термического обеззараживания молока туберкулинпозитивных коров с использованием методов детекции CWD форм микобактерий туберкулеза* / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2017. – № 1. – С. 41–48.

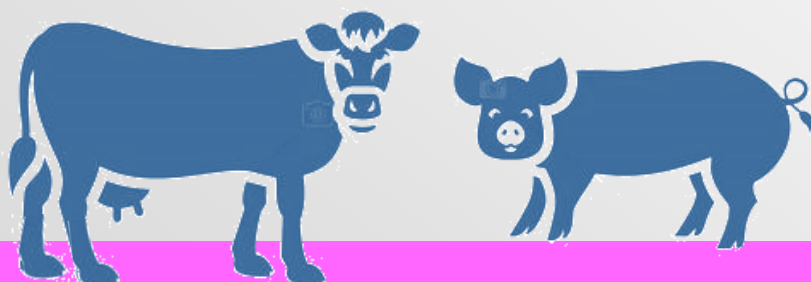
препарат
ветеринарный

«ХРОМАРЦИН»



- ▶ наночастицы железа, цинка, марганца
- легко преодолевают мембраны клеток,
- стимулируют синтез металлозависимых ферментов, которые улучшают работу сердечной мышцы, ускоряют ключевые биохимические процессы организма животных, повышают обмен веществ и устойчивость организма

животноводческая продукция используется сразу после применения препарата



WWW.BIEVM.BY

УДК 619:579:842.14

Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент

Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук

Дубаневич О.В., старший научный сотрудник

Стрельченя И.И., кандидат ветеринарных наук, доцент

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

**БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУЗЕЙНЫХ ШТАММОВ *SALMONELLA DUBLIN*,
SALMONELLA CHOLERAЕ SUIS, *SALMONELLA TYPHIMURIUM*****Резюме**

В статье приведены данные по биохимическим свойствам музейных штаммов *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*, установлены отличительные особенности ферментирования отдельных веществ. Серовариантная принадлежность музейных штаммов подтверждена в полимеразной цепной реакции с помощью разработанных РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого» тест-систем для обнаружения геномов *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*.

Summary

The article presents data on the biochemical properties of the museum strains of *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*, distinguishing features of the fermentation of individual substances are established. Serovariate accessories of the museum strains were confirmed in the polymerase chain reaction using the developed by RUE «Institute of Experimental Veterinary Medicine named after S.N. Vyshelskogo» test systems for the detection of the genomes of *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*.

Поступила в редакцию 25.05.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

Сальмонеллез остается серьезной социально-экономической проблемой для большинства стран мира. В настоящее время во всех экономически развитых странах, в том числе в Республике Беларусь и России, сальмонеллез распространен повсеместно, а заболеваемость им не имеет устойчивой тенденции к снижению [1, 2]. Рост заболеваемости сальмонеллезом совпадает с широким развитием животноводства, звероводства и птицеводства. Все это определяет актуальность проблемы.

В условиях повсеместного распространения сальмонеллеза особую озабоченность вызывает отсутствие эффективных методов предупреждения болезни. При интенсификации производства продуктов животноводства требуются новые критерии для диагностики сальмонеллеза [3].

Определение видовой принадлежности штаммов, а также подтверждение их аутентичности (установление подлинности по свойствам, заявленным в паспорте на момент поступления) в процессе воспроизводства с учетом требований современной систематики бактерий является одним из важных направлений деятельности группы коллекции микроорганизмов [4].

Традиционно установление таксономической принадлежности микроорганизмов основывается на изучении их морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных, антигенных и генетических свойств. Ключевым тестом при определении аутентичности является изучение биохимической активности патогена с использованием комбинированных (комплексных) сред Клиглера, Олькеницкого, Ресселя, Кларка, Гисса и коммерческих тест-систем: системы инди-

каторные бумажные – СИБ (Нижний Новгород), АПИ стрипы – API® (Bio-Mérieux, Франция) и др. [5, 6]. Это не всегда позволяет окончательно идентифицировать некоторые бактерии до вида, что является необходимым при включении их штаммов в коллекционный фонд. Нередки случаи, когда бактерия, идентифицированная по фенотипическим свойствам определенным видом, оказывается при более детальном изучении иной видовой принадлежности [7].

Контроль соответствия паспортным данным особенно необходим при консервации и воспроизводстве референтных штаммов, используемых в производственной, диагностической и образовательной деятельности, свойства которых недостаточно изучены, т.к. их выделение и описание осуществлялось в различное время, большей частью в середине XX века, когда сведения о фенотипических свойствах носили фрагментарный характер [8].

В ряде случаев для правильной видовой идентификации требуется расширить перечень используемых субстратов с помощью микробиологического анализатора Vitek 2 (Bio-Mérieux, Франция), позволяющего одновременно изучать более 60 различных биохимических свойств бактерий.

Наиболее полно отвечает требованиям метод выявления ДНК возбудителя, основанный на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР). С помощью ПЦР удается обнаружить крайне малое количество сальмонелл, идентифицировать их на видовом и серогрупповом уровнях и подтвердить принадлежность какого-либо штамма к определенному серовару сальмонелл [9]. Разработаны отечественные тест-системы для детекции генома возбудителя *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella dublin* [10, 11, 12].

Разработка новых современных методов экспресс-диагностики сальмонеллезов и методов типирования сальмонелл является одним из важных моментов сдерживания распространения возбудителей болезни.

Цель работы – подтвердить принадлежность музейных штаммов *Salmonella*

dublin, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium* к определенному серовару сальмонелл и изучить их биохимические свойства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали суточные культуры музейных штаммов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», выращенные на сердечно-мозговом бульоне:

- штамм *Salmonella dublin* (КМИЭВ-В124) – штамм-антиген;
- штамм *Salmonella cholerae suis* (КМИЭВ-В126) – штамм-антиген;
- штамм *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ-В130) – штамм-антиген.

Восстановление бактериологических культур из леофильной сушки проводили следующим образом: флакон с сухой культурой обрабатывали 70°-ным спиртом, обжигали в пламени спиртовки, вскрывали резиновую пробку, растворяли культуру в 1–2 см³ сердечно-мозгового бульона (Brain Heart Infusion Broth фирмы Biolab, Венгрия) и вносили ее в бактериологическую пробирку с сердечно-мозговым бульоном. Культивировали в течение 18–24 часов при температуре от +37 до +38 °С.

Для изучения биохимических свойств музейных штаммов *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium* суточные бульонные культуры пересевали на сердечно-мозговой агар (Brain Heart Infusion Agar фирмы Biolab, Венгрия) и культивировали в чашках Петри диаметром 90 мм (фирма Бион, г. Минск) в термостате при температуре 37 °С в течение 18–24 часов.

Для оценки чистоты культуры готовили мазки, которые окрашивали по Граму с использованием готового набора красителей фирмы Sigma-Aldrich.

Исследуемую культуру в виде бактериальной суспензии изолированной колонии готовили в 3 см³ специального солевого раствора производства фирмы Biomerieux (кат. № V1204). Концентрацию измеряли прибором DensiCHEK plus фирмы Biomerieux.

Готовую суспензию с оптической плотностью 0,5–0,63 McF по шкале МакФарланда исследовали для изучения биохимических свойств на приборе Vitek 2 compact, используя кассеты Vitek 2 GN.

При постановке ПЦР были использованы: буфер 10x PCR для Taq ДНК-полимеразы (ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»), 10x TE-буфер pH 8,0 (SIGMA), ТАЕ: трис ацетат, маркер молекулярного веса «GeneRuler 50 bp Ladder» (Fermentas, Литва), Taq-полимераза, 5 ед./мкл (ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»), раствор MgCl₂ (50 мМ), смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТП) (25 мМ) (Fermentas, Литва), агароза (helicon, Россия).

Для детекции геномов музейных штаммов *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium* выделяли ДНК колоночным методом набором «ДНК-ВК» (ИБОХ, г. Минск). Амплификацию ДНК проводили в 23 мкл реакционной смеси с 2 мкл выделенной ДНК. Использовали оптимальные концентрации компонентов реакционной смеси: количество полимеразы 1,25 единицы, магния 2 мМоль и дНТП 0,2 мМоль.

Проведение ПЦР осуществляли, используя программу амплификации:

1. 94 °C – 3 мин;
 2. 94 °C – 30 с;
 3. 57 °C – 45 с;
 4. 72 °C – 30 с;
- пункты 2–4 – повтор 40 циклов;
5. 72 °C – 6 мин;
 6. 10 °C – условие хранения.

Результаты ПЦР регистрировали путем проведения электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле в стандартном трис-ЭДТА буфере (pH 8,0) путем внесения 10 мкл продукта ПЦР в лунки агарозного геля. Электрофорез проводили при напряжении 60 В 80 минут. Результаты электрофореза учитывали на приборе Gel Doc XR и с помощью программы ImageLab Software. Результат ПЦР считали положительным, если продукт ПЦР, выражаемый в количестве нуклеотидных пар в соответствии с маркером молекулярного веса, соответствовал искомому фрагменту и составлял для *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium* соответственно 399, 244 и 122 нуклеотидных пары (рисунки 1, 2, 3).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные на приборе Vitek 2 compact данные по биохимическим свойствам музейных штаммов сальмонелл представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Биохимические свойства музейных штаммов *Salmonella Dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*

Тест	Сокращение	КМИЭВ-В-124	КМИЭВ-В-126	КМИЭВ-В-130
1	2	3	4	5
Аla-Phe-Pro-АРИЛАМИДАЗА	APPA	-	-	-
АДОНИТОЛ	ADO	-	-	-
L-пирролидонАРИЛАМИДАЗА	PyrA	-	-	-
L-АРАБИТ	IARL	-	-	-
D-ЦЕЛЛОБИОЗА	dCEL	-	-	-
БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗА	BGAL	-	-	-
ПРОДУКЦИЯ H ₂ S	H ₂ S	+	-	+
БЕТА-N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИНИДАЗА	BNAG	-	-	-
Глютамилариламидаза рNA	AGLTp	-	-	-
D-ГЛЮКОЗА	dGLU	+	+	+
ГАММА-ГЛЮТАМИЛТРАНСФЕРАЗА	GGT	-	-	-
СБРАЖИВАНИЕ ГЛЮКОЗЫ	OFF	+	+	+

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
БЕТА-ГЛЮКОЗИДАЗА	BGLU	-	-	-
D-МАЛЬТОЗА	dMAL	+	+	-
D-МАННИТ	dMAN	+	+	+
D-МАННОЗА	dMNE	+	+	+
БЕТА-КСИЛОЗИДАЗА	BXYL	-	-	-
БЕТА-аланинариламидаза pNA	BAlap	-	-	-
L-пролинАРИЛАМИДАЗА	ProA	-	-	-
ЛИПАЗА	LIP	-	-	-
ПАЛАТИНОЗА	PLE	-	-	-
ТирозинАРИЛАМИДАЗА	TyrA	+	-	-
УРЕАЗА	URE	-	-	-
D-СОРБИТ	dSOR	+	+	+
САХАРОЗА	SAC	-	-	-
D-ТАГАТОЗА	dTAG	-	-	+
D-ТРЕГАЛОЗА	dTRE	+	-	+
ЦИТРАТ (НАТРИЯ)	CIT	+	+	+
МАЛОНАТ	MNT	-	-	-
5-КЕТО-D-ГЛЮКОНАТ	5KG	-	-	-
L-ЛАКТАТ, подщелачивание	ILATk	+	+	-
АЛЬФА-ГЛЮКОЗИДАЗА	AGLU	-	-	-
СУКЦИНАТ, подщелачивание	SUCT	+	+	-
Бета-N-АЦЕТИЛГАЛАКТОЗАМИНИДАЗА	NAGA	-	-	-
АЛЬФА-ГАЛАКТОЗИДАЗА	AGAL	+	-	+
ФОСФАТАЗА	PHOS	+	-	-
ГлицинАРИЛАМИДАЗА	GlyA	-	-	-
ОРНИТИНДЕКАРБОКСИЛАЗА	ODC	+	+	+
ЛИЗИНДЕКАРБОКСИЛАЗА	LDC	+	+	+
L-ГИСТИДИН, ассимиляция	IHISa	-	-	-
КУМАРАТ	CMT	+	+	+
БЕТА-ГЛЮКУРОНИДАЗА	BGUR	-	-	-
УСТОЙЧИВОСТЬ К O/129 (вибриостат, агент)	O129R	+	+	+
Glu-Gly-Arg-АРИЛАМИДАЗА	GGAA	-	-	-
L-МАЛАТ, ассимиляция	IMLTa	-	-	-
ЭЛЛМАН	ELLM	-	-	-
L-ЛАКТАТ, ассимиляция	ILATa	-	-	-

Исходя из полученных данных, представленных в таблице 1, было установлено что:

- музейный штамм *Salmonella dublin* (КМИЭВ-В124) – штамм-антиген продуци-

рует H₂S, сбраживает глюкозу, расщепляет D-глюкозу, D-мальтозу, D-маннит, D-маннозу, тирозинариламидазу, D-сорбит, D-трегалозу, альфа-галактозидазу, фосфатазу, орнитиндекарбоксилазу, лизинде-

карбоксилазу, кумарат. Подщелачивает L-лактат, сукцинат. Утилизирует цитрат (натрия). Обладает устойчивостью к 0/129 (вибриостат, агент);

- музейный штамм *Salmonella cholerae suis* (КМИЭВ-В126) – штамм-антиген сбраживает глюкозу, расщепляет D-глюкозу, D-мальтозу, D-маннит, D-маннозу, D-сорбит, орнитиндекарбоксилазу, лизиндекарбоксилазу, кумарат. Подщелачивает L-лактат, сукцинат. Утилизирует цитрат (натрия). Обладает устойчивостью к 0/129 (вибриостат, агент);

- музейный штамм *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ-В130) – штамм-антиген продуцирует H₂S, сбраживает глюкозу, расщепляет D-глюкозу, D-маннит, D-маннозу, D-сорбит, D-тагатозу, D-трегалозу, альфа-

галактозидазу, орнитиндекарбоксилазу, лизиндекарбоксилазу, кумарат. Утилизирует цитрат (натрия). Обладает устойчивостью к 0/129 (вибриостат, агент).

Однако на приборе Vitek 2 compact все три музейных штамма с вероятностью 97–99 % определены как *Salmonellas spp.* без указания серовариантной принадлежности.

В связи с необходимостью уточнения серовариантной принадлежности штаммов *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*, использованных в исследованиях, была проведена полимеразная цепная реакция тест-системами для обнаружения геномов *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium* (рисунки 1, 2, 3).



Рисунок 1. – Результаты амплификации с ДНК культур *Salmonella choleraesuis* (1), *Salmonella dublin* (2), *Salmonella typhimurium* (3), К- (4) амплификационная смесь для детекции *Salmonella dublin*

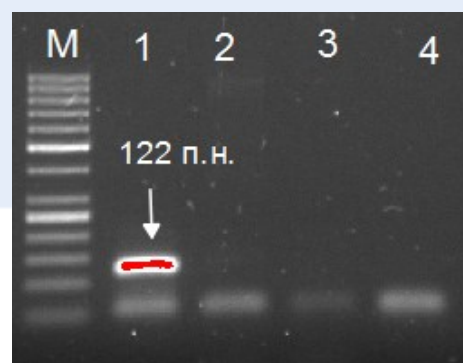


Рисунок 2. – Результаты амплификации с ДНК культур *Salmonella choleraesuis* (1), *Salmonella dublin* (2), *Salmonella typhimurium* (3), К- (4) амплификационная смесь для детекции *Salmonella typhimurium*



Рисунок 3. – Результаты амплификации с ДНК культур *Salmonella choleraesuis* (1), *Salmonella dublin* (2), *Salmonella typhimurium* (3), К- (4) амплификационная смесь для детекции *Salmonella choleraesuis*

Полученные данные указывают на то, что все исследуемые штаммы в ПЦР подтвердились и не давали перекрестных реакций между собой.

ВЫВОДЫ

1. Изучены биохимические свойства музейных штаммов *Salmonella dublin*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium* на приборе Vitek 2 compact.

2. В результате проведения ПЦР подтверждено, что:

- штамм *Salmonella dublin* (КМИЭВ-В124) – штамм-антиген содержит геном *Salmonella dublin*;

- штамм *Salmonella cholerae suis* (КМИЭВ-В126) – штамм-антиген содержит геном *Salmonella cholerae suis*;

- штамм *Salmonella typhimurium* (КМИЭВ-В130) – штамм-антиген содержит геном *Salmonella typhimurium*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Современные особенности эпидемического процесса сальмонеллезов СССР / Б. Д. Черкасский [и др.] // Журнал микробиологии – 1991. – № 1. – С. 32–36.
2. Altekruze, S. F. The Changing Epidemiology of Foodborne Diseases / S. F. Altekruze, D. L. Swerdlov // Am. J. Med. Sci. – 1996. – Vol. 311. – № 1. – P. 23–29.
3. Тенденция развития эпидемического процесса сальмонеллезов, обусловленных *Salmonella typhimurium* и *Salmonella enteritidis* / В. И. Сергеев [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1990. – № 5. – С. 38–42.
4. Smith, D. Culture Collections / D. Smith // Microbiology. – 2012; 79:73–118. DOI: 10.1016/B978-0-12-394318-7.00004-8.
5. Биргер, М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / М. О. Биргер. – М.: Медицина; 1982. – 464 с.
6. Лабинская, А. С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская, Л. П. Блинкова, А. С. Ещина. – М.: Медицина, 2004. – 576 с.
7. Леванова, Г. Ф. Фенотаксономия и геносистематика локтобацилл / Г. Ф. Леванова, Е. И. Ефимов. – Н. Новгород: изд. Ю.А. Николаев, 2009. – 248 с.
8. Белова, Л. Н. Биологические коллекции российской Федерации / Л. Н. Белова, В. Н. Мошенцева // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2013. – Т. 5. – С. 10–18.
9. Яцышина, С. Б. Выявление и типирование возбудителей сальмонеллеза молекулярно-генетическими методами: дис. ... канд. биол. наук / С. Б. Яцышина. – М., 2003. – 112 с.
10. Тяпша, Ю. И. Молекулярно-генетическая детекция генома *Salmonella cholerae suis* / Ю. И. Тяпша, О. В. Дубаневич, А. С. Андрусевич // Ученые записки Витебск. гос. вет. акад. – Витебск, 2018. – Т. 54, вып. 2. – С. 67–72.
11. Тяпша, Ю. И. Молекулярно-генетическая детекция генома *Salmonella typhimurium* / Ю. И. Тяпша [и др.] // Экология и животный мир. – 2018. – № 2. – С. 56–62.
12. Тяпша, Ю. И. Молекулярно-генетическая детекция генома штамма *Salmonella dublin* и его биохимические свойства / Ю. И. Тяпша [и др.] // Экология и животный мир. – 2019. – № 2. – С. 18–25.

УДК 619:615.37

Струк М.С., старший научный сотрудник

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

ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ЦИНКА «ИММУНОНАНОЦИНК» НА ОСНОВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ И ИММУНИТЕТ

Резюме

Описаны результаты фагоцитарной активности лейкоцитов после введения образцов препарата на основе наночастиц цинка. Дана оценка иммуностимулирующего действия образцов препарата на основе наночастиц цинка при проведении вакцинации против инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи у животных. Представлены данные по основным показателям крови до применения и через 7 и 14 дней после его использования.

Summary

The results of phagocytic activity of leukocytes after administration of samples of the preparation based on zinc nanoparticles are described. The immunostimulating effect of zinc nanoparticle-based drug samples during vaccination against infectious rhinotracheitis and viral diarrhea in animals is evaluated. Data on the main blood parameters before use and 7 and 14 days after its use are presented.

Поступила в редакцию 21.05.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

В организме млекопитающих функционируют два типа иммунного ответа: клеточный иммунитет, который обусловлен тимусзависимыми лимфоцитами (Т-лимфоциты), макрофагами и др. клетками, и гуморальный, где ключевыми элементами выступают иммуноглобулины, продуцируемые В-клетками.

Некоторые микроэлементы, такие как селен, цинк и йод, могут выступать в качестве иммуномодулирующих средств. В свою очередь, они способны влиять на все звенья врожденного и приобретенного иммунитета. Но наиболее активное участие в становлении защитных функций организма принимают ионы цинка. Известно, что цинк оказывает прямое воздействие на вилочковую железу, тем самым обеспечивая процесс лимфопоэза и сохранение защитных функций клеточного иммунитета [1]. По данным R.S. Pekarek, клеточный иммунитет более восприимчив к дефициту цинка, чем гуморальный. Так, цинк способен вызывать различный клеточно-специфический ответ по отношению к большинству клеток-эффекторов иммунной системы. Несмотря на это, известно,

что в некоторых случаях цинк сам может замедлять клеточные функции, если речь идет, например, о тучных клетках или тромбоцитах [2].

Таким образом, цинк поддерживает динамику клеточных циклов и клеточной репопуляции, влияет на формирование тимуса и дифференцировку Т-клеток в вилочковой железе. Доказано также, что цинк оказывает влияние непосредственно на структуру, метаболизм, количество, функцию Т- и В-клеток. Этот уникальный микроэлемент поддерживает необходимый синтез специфических антител классов IgG, IgA, IgM. Цинк принимает участие в создании системы секреторного иммунитета, оказывает влияние на активность компонента, нейтрофильный, макрофагальный фагоцитоз и другие факторы неспецифической защиты [3, 4].

Становление иммунитета напрямую зависит от уровня цинка в организме. При его недостатке развивается атрофия тимико-лимфатической системы, нарастает снижение функций макрофагов и Т-лимфоцитов, депрессии клеточного звена иммунитета и уменьшение уровня иммуноглобулинов. Недостаток цинка приводит к по-

давлению активности естественных киллеров, так как он является одним из основных кофакторов тимулина – стимулятора естественных киллеров [3].

Целью наших исследований являлось определение иммуностимулирующего действия препарата на основе наночастиц цинка и его влияние на основные показатели крови животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения иммуностимулирующего эффекта образца препарата на основе наночастиц цинка был выбран метод определения фагоцитарной активности лейкоцитов [5]. Из подопытных животных (кролики) сформировали 3 группы (n=3). Животным опытной группы (ОГ) № 1 вводили наночастицы цинка в разведении 1:5 (50 мкг/мл), животным ОГ № 2 – наночастицы цинка в разведении 1:10 (100 мкг/мл), а животным контрольной группы (КГ) – изотонический раствор натрия хлорида. Испытуемые образцы препарата на основе наночастиц цинка вводили в дозе 1,0 см³ внутримышечно. Кровь отбирали через 48 часов из ушной вены.

Изучение иммунного ответа на фоне введения образца препарата проводили на морских свинках. Было сформировано 6 групп (n=4). ОГ № 1 вводили вирус инфекционного ринотрахеита (ИРТ) и образец препарата в концентрации 250 мкг/мл двукратно с интервалом 14 дней, ОГ № 2 – вирус ИРТ и образец препарата в концентра-

ции 500 мкг/мл двукратно с интервалом 14 дней, ОГ № 3 – вирус ИРТ с физраствором двукратно с интервалом 14 дней. ОГ № 4 вводили вирус вирусной диареи (ВД) и образец препарата в концентрации 250 мкг/мл двукратно с интервалом 14 дней, ОГ № 5 – вирус ВД и образец препарата в концентрации 500 мкг/мл двукратно с интервалом 14 дней, ОГ № 6 – вирус ВД с физиологический раствором двукратно с интервалом 14 дней. Контрольная группа обработкам не подвергалась.

Влияние препарата «Иммунонаноцинк» на основные показатели крови телят исследовали в условиях животноводческих хозяйств Республики Беларусь. Для этого были сформированы 2 группы животных в возрасте от 35 до 40 дней (n=10) с клиническим проявлением вирусных респираторных инфекций и пневмоэнтеритов, подтвержденных лабораторно. Опытной группе вводили препарат «Иммунонаноцинк» в дозе 3,0 см³ 1 раз в 3 дня 2–4 раза до выздоровления. Контрольную группу подвергли лечению химиотерапевтическими и симптоматическими средствами, применяемыми в хозяйстве. Кровь от телят брали до обработки, через 7 и 14 дней после первого введения препарата.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При изучении фагоцитарной активности лейкоцитов при введении образцов препарата были получены следующие результаты (таблица 1).

Таблица 1. – Фагоцитарная активность лейкоцитов у кроликов после введения образцов препарата на основе наночастиц цинка

№ группы	Фагоцитарная активность до обработки, %	Фагоцитарная активность после обработки, %	Фагоцитарный индекс до обработки	Фагоцитарный индекс после обработки	Степень увеличения (уменьшения)
ОГ № 1 (ZnO) 50 мкг/мл	70,2±9,4	72,0±6,8	2,74±0,4	7,06±1,9	2,58
ОГ № 2 (ZnO) 100 мкг/мл	68,4±4,8	73,8±6,6	3,09±1,3	5,8±1,1	1,88
КГ	64,4±4,4	65,2±3,6	3,10±0,7	3,12±0,9	-

Из таблицы 1 следует, что при введении наночастиц цинка в организм лабораторных животных происходят изменения в неспецифическом клеточном иммунитете - фагоцитозе. Применение образцов препарата на основе наночастиц цинка увеличивает фагоцитарный индекс, что говорит о повышении поглотительной способности фагоцитирующих клеток крови.

Так, при введении кроликам образца препарата на основе наночастиц цинка в концентрации 50 мкг/мл отмечено увеличение фагоцитарного индекса (показателя, отвечающего за количество частиц, поглощенных одним фагоцитом) с $2,74 \pm 0,4$ до $7,06 \pm 1,9$, что соответствует увеличению данного показателя в 2,58 раза. При введении кроликам образца препарата на основе наночастиц цинка в концентрации 100 мкг/мл отмечено увеличение фагоцитарного индекса с $3,09 \pm 1,3$ до $5,8 \pm 1,1$, что соответствует увеличению данного показателя в 1,88 раза.

Разница между показателями до и по-

сле введения образцов препарата на основе наночастиц цинка демонстрирует активизацию метаболического потенциала фагоцитов и фактически характеризует их иммуностимулирующую активность. Соответственно, снижение активности и интенсивности фагоцитоза расценивается как показатель ослабления поглотительной функции фагоцитов, метаболического резерва как недостаточности их переваривающей функции.

Таким образом, проведенные исследования показали, что введение животным наночастиц цинка способствуют активизации фагоцитарного индекса лейкоцитов.

В результате полученных результатов был отобран образец препарата на основе наночастиц цинка в концентрации 50 мкг/мл.

Оценку иммуностимулирующего действия образца препарата на основе наночастиц цинка проводили по состоянию поствакцинального иммунитета против вирусов ИРТ и ВД (таблица 2).

Таблица 2. – Исследования иммуностимулирующих свойств образцов препарата на основе наночастиц цинка

Группа животных	Вирус	Сроки введения и дозы наночастиц	Титр антител (\log_2)	
			до введения	через 21 день после введения
ОГ № 1	ИРТ	одновременно с вакциной в дозе 250 мкг/мл двукратно с интервалом в 14 дней	$1,0 \pm 0,12$	$5,25 \pm 1,3$
ОГ № 2	ИРТ	одновременно с вакциной в дозе 500 мкг/мл двукратно с интервалом в 14 дней	$1,0 \pm 0,11$	$4,0 \pm 0,23$
ОГ № 3	ИРТ	одновременно с вакциной физраствор	$1,0 \pm 0,46$	$3,25 \pm 0,18$
ОГ № 4	ВД	одновременно с вакциной в дозе 250 мкг/мл двукратно с интервалом в 14 дней	$1,0 \pm 0,12$	$6,5 \pm 1,26$
ОГ № 5	ВД	одновременно с вакциной в дозе 500 мкг/мл двукратно с интервалом в 14 дней	$2,25 \pm 0,23$	$5,25 \pm 0,18$
ОГ № 6	ВД	одновременно с вакциной физраствор	$2,0 \pm 0,18$	$4,25 \pm 0,36$
КГ	-	-	$1,0 \pm 0,09$	$1,0 \pm 0,09$

Приведенные в таблице данные свидетельствуют, о том, что одновременное введение препарата «Иммунонаноцинк» в концентрации 250 мкг/мл с вакциной против ИРТ способствует увеличению титра антител на $4,25 \log_2$, в концентрации 500 мкг/мл – на $3,0 \log_2$, а одновременное использование его с вакциной против ВД –

на $5,5$ и $4,25 \log_2$ соответственно. В контрольной группе титры оставались фоновыми.

В таблицах 3 и 4 представлена динамика основных гематологических и биохимических показателей крови телят в ответ на введение препарата на основе наночастиц цинка «Иммунонаноцинк».

Таблица 3. – Динамика гематологических показателей крови при применении препарата «Иммунонаноцинк»

Наименование показателя	Исходные данные		Через 7 дней		Через 14 дней	
	ОГ	КГ	ОГ	КГ	ОГ	КГ
Лейкоциты, 10^9 /л	8,16	8,10	13,92	8,16	11,26	7,06
Эритроциты, 10^{12} /л	8,56	8,1	10,02	12,58	8,35	10,63
Гемоглобин, г/л	108,2	108,0	120,4	108,2	107	90,8
Тромбоциты, 10^9 /л	659,2	637,0	681,8	659,2	687,0	660,4
Гематокрит, %	37,38	37,0	38,66	37,38	36,62	36,2
СОЭ, мм/ч	2,76	3,35	3,9	3,76	1,1	3,1
Среднее содержание гемоглобина в эритроците	8,62	8,3	9,2	8,62	15,46	13,1

Результаты наших исследований показали (таблица 3), что применение препарата «Иммунонаноцинк» приводит к увеличению уровня лейкоцитов. Наибольшее увеличение отмечается на 7-й день и составляет $13,92 \pm 0,54 \times 10^9$ /л (в контрольной группе – $8,16 \pm 0,71 \times 10^9$). На 14-й день после применения препарата «Иммунонаноцинк» данный показатель остается на достоверно высоком уровне – $11,26 \pm 0,32 \times 10^9$ /л (в контрольной группе – $7,06 \pm 0,44 \times 10^9$ /л) при средней физиологической норме для телят данного возраста, равной $9,1 \times 10^9$ /л. Полученные данные свидетельствуют о стимулирующем влиянии разработанного препарата на клеточный иммунный ответ.

Также в опытной группе происходит повышение содержания эритроцитов с последующей их нормализацией в пределах физиологической нормы. Данный показатель имеет наибольшее увеличение на 7-й день исследований и составляет $10,02 \pm 0,62 \times 10^{12}$ /л (у животных контрольной груп-

пы – $12,58 \pm 0,75 \times 10^{12}$ /л). При этом средний показатель физиологической нормы для телят составляет $8,2 - 8,6 \times 10^{12}$ /л. Через 14 дней после применения препарата «Иммунонаноцинк» уровень эритроцитов достигает в опытной группе физиологической нормы, тогда как в контрольной еще остается на уровне $10,63 \pm 0,43 \times 10^{12}$ /л. Уровень гемоглобина в период исследований у животных опытной группы был выше, чем у животных контрольной группы, и на 7-й день составлял $120,4 \pm 3,36$ г/л (в контрольной группе – $108,2 \pm 6,24$ г/л). Полученные данные свидетельствуют о том, что применение разработанного препарата имеет высокий терапевтический эффект, который наступает в короткое время по сравнению с контрольной группой.

Оценивая содержание тромбоцитов, можно отметить, что данный показатель у животных опытной группы не имеет достоверных отличий и находится в пределах $637,0 \pm 5,24 - 687,0 \pm 7,86 \times 10^9$ /л, что соответ-

ствуется физиологической нормой ($260-710 \times 10^9/\text{л}$). Количество гематокрита у животных опытной группы варьирует в рамках физиологической нормы и составляет соответственно от $36,62 \pm 0,29$ до $38,66 \pm 0,52$ %, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния разработанного препарата «Иммунонаноцинк» на организм животных.

Анализ СОЭ показал, что в опытной и контрольной группах данный показатель до применения препаратов находился на высоком уровне. Это свидетельствовало о наличии воспалительного процесса, протекающего в организме животных обеих групп. В опытной группе данный показатель составлял $2,76 \pm 0,18$ мм/ч, а в контрольной – $3,35 \pm 0,14$ мм/ч. К 14-му дню исследований уровень СОЭ в контрольной

группе оставался на высоком уровне и составлял $3,1 \pm 0,16$ мм/ч, а в опытной – снижался до $1,1 \pm 0,02$ мм/ч, практически достигая значений физиологической нормы $0,7-1,0$ мм/ч.

Показатель среднего содержания гемоглобина в эритроцитах на 14-й день исследований составляет у животных опытной группы $15,46 \pm 1,15$ пг и находится в пределах физиологической нормы ($13-17$ пг). Таким образом, применение препарата «Иммунонаноцинк» не вызывает токсического нарушения ДНК и не изменяет значение эритроцитарных индексов.

В таблице 4 представлены результаты биохимических исследований крови до и после применения препарата на основе наночастиц цинка «Иммунонаноцинк».

Таблица 4. – Динамика биохимических показателей крови при применении препарата «Иммунонаноцинк»

Наименование показателя	Исходные данные		Через 7 дней		Через 14 дней	
	ОГ	КГ	ОГ	КГ	ОГ	КГ
Общий белок, г/л	64,22	62,7	63,9	64,67	66,3	62,6
Альбумин, г/л	33,4	32,9	32,2	31,78	32,68	31,49
Глюкоза, ммоль/л	1,78	1,54	1,89	1,71	1,94	1,76
Холестерин, моль/л	1,72	1,72	1,72	1,38	1,8	1,42
Мочевина, мкмоль/л	5,99	5,4	5,0	5,2	3,6	4,3
Биллирубин, мкмоль/л	5,6	5,86	5,93	4,43	6,99	5,63
Креатинин, мкмоль/л	68,87	68,87	68,87	71,37	77,06	64,67
Триглицериды, мкмоль/л	0,18	0,26	0,23	1,55	0,24	1,47
АЛАТ	31,79	28,1	32,56	21,88	32,78	25,9
АСАТ	76,03	80,7	77,9	86,32	79,61	91,84
Щелочная фосфатаза	91,3	91,8	92,8	92,75	96,12	89,96
Кальций	2,45	2,78	2,65	2,34	2,93	2,83
Фосфор	2,06	2,04	1,96	1,6	2,12	2,58
Магний	1,2	1,4	1,44	1,49	1,66	1,26
Железо	28,56	28,56	27,16	26,08	25,82	24,53

Изучение динамики общего белка (таблица 4) показало, что у животных опытной группы, как и у животных контрольной, существенных колебаний не происходит. Данный показатель соответствует физиологической норме для телят данной возрастной категории и составляет от $64,22 \pm 1,64$ г/л до $66,3 \pm 2,19$ г/л в опытной группе и от $62,6 \pm 3,15$ г/л до $64,67 \pm 2,84$ г/л в контрольной.

В течение всего периода исследований у животных опытной группы, как и у животных контрольной, уровень альбумина находился в пределах физиологической нормы ($29-33$ г/л). Через 14 дней после применения препарата «Иммунонаноцинк» концентрация альбумина не показала существенных колебаний по сравнению с исходными показателями и составила $32,68 \pm 3,96$ г/л. В опытной группе уровень глюкозы составляет от $1,78 \pm 0,13$ до $1,94 \pm 0,18$ ммоль/л, достоверно не отличается от такового у контрольных животных ($1,54 \pm 0,26$ до $1,76 \pm 0,11$ ммоль/л) и стремится к физиологической норме ($2,22-3,88$ ммоль/л). Следовательно, применение препарата «Иммунонаноцинк» не оказывает негативного влияния на эндокринную систему и может применяться для терапии вирусных пневмоэнтеритов.

Анализ динамики концентрации холестерина в крови показал, что у телят опытной группы на протяжении всего исследования существенных изменений не происходит. Данный показатель через 14 дней после применения препарата «Иммунонаноцинк» соответствует $1,8 \pm 0,03$ ммоль/л, что приближено к значениям физиологической нормы ($2,06-4,00$ ммоль/л).

Результаты исследований показали, что на 7-й и 14-й дни концентрация мочевины в крови телят опытной группы не имеет достоверных отличий от таковых у животных контрольной группы и находится в пределах $5,0 \pm 0,17$ мкмоль/л и $3,6 \pm 0,22$ мкмоль/л, что соответствует показателям физиологической нормы ($3,3-5,6$ мкмоль/л).

Уровень билирубина в крови телят опытной и контрольной групп показывает,

что данный показатель находится в пределах физиологической нормы ($2,4-20,5$ мкмоль/л) и составляет на 14-й день исследований соответственно $6,99 \pm 0,24$ мкмоль/л и $5,63 \pm 0,41$ мкмоль/л. Таким образом, применение препарата «Иммунонаноцинк» не имеет негативного влияния на организм животных.

Изучение концентрации креатинина в крови телят опытной группы показало, что данный показатель находился в пределах физиологической нормы во все дни исследований ($14-107$ мкмоль/л). Содержание его на 7-й день составляло $68,87 \pm 5,21$ мкмоль/л, а на 14 день – $77,06 \pm 5,56$ мкмоль/л, что не имело достоверных отличий от животных контрольной группы, у которых данный показатель соответствовал $71,37 \pm 7,32$ мкмоль/л и $64,67 \pm 6,73$ мкмоль/л.

Применение препарата «Иммунонаноцинк» поддерживает липидный обмен организма животного. При этом уровень триглицеридов в крови телят опытной группы составляет на 7 и 14 дни исследования соответственно $0,23 \pm 0,06$ мкмоль/л и $0,24 \pm 0,02$ мкмоль/л.

Результаты исследований ферментативной активности показывают, что активность АЛАТ у телят опытной группы выше, нежели в контрольной группе. На 14-й день исследований данный показатель соответствует в этих группах $32,78 \pm 2,65$ U/L и $25,9 \pm 4,14$ U/L, но он находится в пределах физиологической нормы ($25-50$ U/L). Активность АСАТ у животных опытной группы составила от $76,03 \pm 2,31$ до $79,61 \pm 1,45$ U/L, что соответствует показателям физиологической нормы ($30-90$ U/L). У животных в контрольной группе на 14-й день исследований он составлял $91,84 \pm 4,25$ U/L. Это указывает на то, что применение препарата «Иммунонаноцинк» приводит к более быстрому восстановлению функции печени, чем при использовании контрольной терапевтической схемы. Активность щелочной фосфатазы в крови животных опытной и контрольной групп во все дни исследований находилась в пределах физиологической

нормы (29–99 U/L) и составляла соответственно $91,3 \pm 6,72$ – $96,12 \pm 3,24$ U/L и $89,96 \pm 5,45$ – $91,3 \pm 7,14$ U/L.

Содержание кальция у животных опытной группы на 7-й день исследований составляло $2,65 \pm 0,04$ ммоль/л, у животных контрольной группы – $2,34 \pm 0,07$ ммоль/л. На 14-й день исследований данный показатель составлял соответственно $2,93 \pm 0,03$ ммоль/л и $2,83 \pm 0,08$ ммоль/л. Таким образом, применение препарата «Иммунонаноцинк» не оказывает негативного влияния на обмен кальция и поддерживает его высокий уровень.

Содержание фосфора у животных опытной и контрольной групп не имеют достоверных отличий. В опытной группе данный показатель находится в пределах $1,96 \pm 0,03$ – $2,12 \pm 0,05$ ммоль/л, в контрольной – $1,6 \pm 0,02$ – $2,58 \pm 0,08$ ммоль/л.

Также результаты исследований показали, что применение препарата «Иммунонаноцинк» способствует поддержанию высокого содержания магния. На 14-й день исследований данный показатель у животных опытной группы составляет $1,66 \pm 0,04$ ммоль/л, в контрольной группе – $1,26 \pm 0,06$ ммоль/л.

Достоверных изменений содержания железа у животных опытной и контроль-

ной групп не отмечается. Показатели железа у животных опытной группы составляют $25,82 \pm 2,12$ – $28,56 \pm 3,21$ ммоль/л, у животных контрольной группы – $25,82 \pm 3,24$ – $28,56 \pm 4,36$ ммоль/л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, применение кроликам образцов препарата на основе наночастиц цинка в концентрации 50 мкг/мл повышает фагоцитарный индекс с $2,74 \pm 0,4$ до $7,06 \pm 1,9$, т.е. в 2,58 раза, а фагоцитарное число – на 7,9 %. Применение его в концентрации 250 мкг/мл вместе с вакциной против инфекционного ринотрахеита увеличивает титр антител на $4,25 \log_2$, с вакциной против вирусной диареи – на $5,5 \log_2$ (в контрольных группах – на $2,25$ – $3,0 \log_2$).

Применение препарата на основе наночастиц цинка «Иммунонаноцинк» способствует стабилизации гематологических и биохимических показателей крови телят до уровня физиологической нормы. Использование его в комплексной терапии вирусных респираторных инфекций и пневмоэнтеритов способствует нормализации последствий инфекционного процесса в организме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бут, Г. Микроэлементы и их роль в обеспечении иммунного ответа / Г. Бут // *Новости медицины и фармации*. – 2008. – № 4 (235). – С. 13.
2. Хлебникова, А. Н. Цинк, его биологическая роль и применение в дерматологии / А. Н. Хлебникова, Д. Д. Петрунин // *Вестник дерматологии и венерологии*. – 2013. – № 6. – С. 101–102.
3. Попович, Ю. Г. Физиологическая роль цинка. / Ю. Г. Попович // *Педиатрия и детская хирургия*. – 2011. – № 1. – 37 с.
4. Шейбак, М. П. Недостаточность цинка у детей / М. П. Шейбак, Л. Н. Шейбак // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. – 2000. – Т. 45 (3). – С. 48–52.
5. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник / И. П. Кондрахин [и др.]; под ред. В. Н. Сайтаниди. – М. : Колос С, 2004. – 520 с.

УДК 619:579.842.11

Соловьёва А.В., младший научный сотрудник¹
Ломако Ю.В., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Новикова О.Н., кандидат ветеринарных наук¹
Овсяникова О.В., магистрант²

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

²Белорусский государственный университет, г. Минск

ВЫЯВЛЕНИЕ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ТЕРМОЛАБИЛЬНОГО ТОКСИНА *ESCHERICHIA COLI* И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕГО СПОСОБНОСТИ К ТОКСИНООБРАЗОВАНИЮ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Резюме

В статье представлены данные исследований по выявлению штамма-продуцента термолabile энтеротоксина *Escherichia coli* и определению его способности к токсинообразованию в условиях промышленного культивирования. Установлено, что концентрация термолabile энтеротоксина в среде культивирования составляет 23 нг/мл.

Summary

This article presents the research data of detection strain-producer of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and determining of its ability to toxin formation in industrial cultivation. It was established, the concentration of heat-labile enterotoxin in the culture medium is 23 ng/ml.

Поступила в редакцию 28.05.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

Энтеротоксигенные *Escherichia coli* (ЕТЕС) наряду с другими диареогенными *Escherichia coli* (энтероинвазивные, энтерогемморагические, энтероагрегативные, диффузно-агрегативные и др.) занимают ведущее место в развитии острых кишечных инфекций [3]. Среди сельскохозяйственных животных в группе риска находится молодняк (новорожденные телята, поросята). Стоит отметить, что другие животные (лошади, кролики, птица) крайне редко подвержены действию ЕТЕС [5].

Главными факторами патогенности ЕТЕС выступают фимбриальные адгезины и энтеротоксины. ЕТЕС используют фимбриальные адгезины для прикрепления к рецепторам эпителия слизистой оболочки тонкого кишечника. Фимбриальные адгезины ЕТЕС человека – F2 (СFAI), F3 (СFAII), ЕТЕС животных – F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F41, F17 (FY/Att25), F18 [1, 2]. Следующий главный фактор патогенности

ЕТЕС – энтеротоксины. Среди них выделяют два класса – термолabile (LT) и термостабильные (STa, STb) энтеротоксины [4].

Термолabile энтеротоксин (LT) представляет собой олигомерный белок с молекулярной массой 85 кДа, состоящий из субъединицы А (28 кДа) и пяти субъединиц В (11,5 кДа), соединенных в виде кольца. Субъединицы В отвечают за специфическое связывание энтеротоксина с рецепторами, расположенными на микроворсинках энтероцитов тонкого кишечника, а субъединица А выполняет каталитическую функцию, роль которой заключается в необратимом активировании аденилатциклазной системы, что приводит к увеличению концентрации хлорида натрия в просвете кишечника, нарушению водно-солевого баланса и развитию секреторной диареи [5].

В настоящее время проводятся исследования по разработке специфических

средств профилактики колибактериоза у человека и животных. Наличие энтеротоксигенных штаммов необходимо учитывать при конструировании вакцин против колибактериоза. Известно, что такие вакцины обладают доказанным профилактическим эффектом. Наиболее эффективными являются генно-инженерные вакцины, направленные против фимбриальных адгезинов и энтеротоксинов одновременно [6, 7].

Таким образом, изучение энтеротоксигенных свойств штаммов *Escherichia coli* является актуальным направлением.

Целью нашего исследования являлось выявление энтеротоксигенных штаммов *Escherichia coli* и определение их способности к токсинообразованию в условиях промышленного культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объект исследования – термолабильный энтеротоксин *Escherichia coli* (LT).

Методы исследования – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (Real-time PCR), GM₁-иммуноферментный анализ (GM₁-ИФА), реакция агглютинации (РА).

Для работы отбирали 8 адгезивных штаммов *Escherichia coli* из коллекции музея микроорганизмов: *Escherichia coli* «КМИЭВ-38», *Escherichia coli* «КМИЭВ-39а», *Escherichia coli* «КМИЭВ-98», *Escherichia coli* «КМИЭВ-В101», *Escherichia coli* «КМИЭВ-В102», *Escherichia coli* «КМИЭВ-В103», *Escherichia coli* «КМИЭВ-В104», *Escherichia coli* «КМИЭВ-В160».

Серотипирование отобранных штаммов *Escherichia coli* осуществляли путем постановки РА с использованием набора тест-сывороток для типирования адгезивных антигенов *Escherichia coli* F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F41, A20 (Att25) (РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»).

Идентификацию энтеротоксигенных штаммов *Escherichia coli*, экспрессирующих LT, определяли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием специфических праймеров.

Выделение ДНК проводили с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «Рибопрем» («AmpliSens», Россия) согласно инструкции набора. Полученные пробы, содержащие ДНК, амплифицировали на приборе «CFX96» («BioRad», США) в соответствии с инструкцией тест-системы для обнаружения генома энтеротоксигенных штаммов *E. coli*, содержащих ген термолабильного энтеротоксина, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»).

Амплификацию проводили в соответствии с программой: 95 °С – 3,0 мин – 1 цикл; (95 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с) – 40 циклов; хранение – 10 °С.

Снятие показаний флуоресценции производили на стадии отжига при 55 °С на канале FAM.

Культивирование выявленного энтеротоксигенного штамма *Escherichia coli* КМИЭВ-В160 проводили на сердечно-мозговом бульоне в биореакторе «BioFlo 5000» (New Brunswick Scientific, США) в течение 5 ч при температуре 37 °С при значении pH от 7,5±0,2. Отделяли супернатант от бактериальных клеток центрифугированием.

Концентрацию LT в бесклеточном супернатанте определяли методом иммуноферментного анализа (GM₁-ИФА). Для этого лунки микропланшета сенсibiliзировали специфическим реагентом моносиаловым ганглиозидом GM₁ («Sigma», США) в концентрации 0,5 мкг/мл (50 мкл/лунка), инкубировали 18 ч при температуре 4 °С. После каждого этапа реакции лунки промывали не менее 3 раз промывочным буферным раствором («IDEXX», США). С целью блокировки неспецифического связывания антител панель дополнительно обрабатывали 0,1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (50 мкл/лунка) в течение 30 мин при температуре 37 °С.

Далее в лунки добавляли стандартный опытный образец. В качестве стан-

дартного образца использовали рекомбинантную субъединицу В термолabileного токсина (rLTB) («Sigma», США), приготовленную в трех концентрациях – 1,0 нг/мл, 50,0 нг/мл и 200,0 нг/мл – для построения графика калибровки, в качестве опытного образца – бесклеточный супернатант. Соответствующие разведения стандартного и опытного образцов вносили в лунки планшета в объеме 50 мкл с последующей экспозицией при температуре 37 °С в течение 60 мин. Образцы вносили в трех повторностях. Затем добавляли специфическую антитоксическую кроличью гипериммунную сыворотку в разведении 1:64 в объеме 50 мкл/лунка с дальнейшей экспозицией в течение 60 мин при температуре 37 °С. Далее обрабатывали лунки планшета антикроличьим IgG («ThermoScientific», США) в разведении 1:5000 в количестве 50 мкл/лунка в течение 60 мин при температуре 37 °С. На заключительном этапе вносили ТМВ-субстрат («Applichem», Германия) в количестве 50 мкл/лунка. Реакцию оста-

навливали 10%-ным раствором серной кислоты. Учет реакции проводили на спектрофотометре («BioTek Instruments Inc», США) при длине волны 450 нм.

На следующем этапе строили калибровочный график, по которому определяли концентрацию ЛТ в бесклеточном супернатанте.

Статистическая обработка цифровых данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 8.0», описательная статистика. Количественные показатели представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего значения ($M \pm \mu$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследовали в ПЦР адгезивные штаммы *Escherichia coli*, идентифицировали у двух адгезивных штаммов *Escherichia coli* наличие гена *eltA*, кодирующего ЛТ (рисунок 1). Установили корреляцию между присутствием гена *eltA* и фимбриальным адгезином K88 (таблица 1).

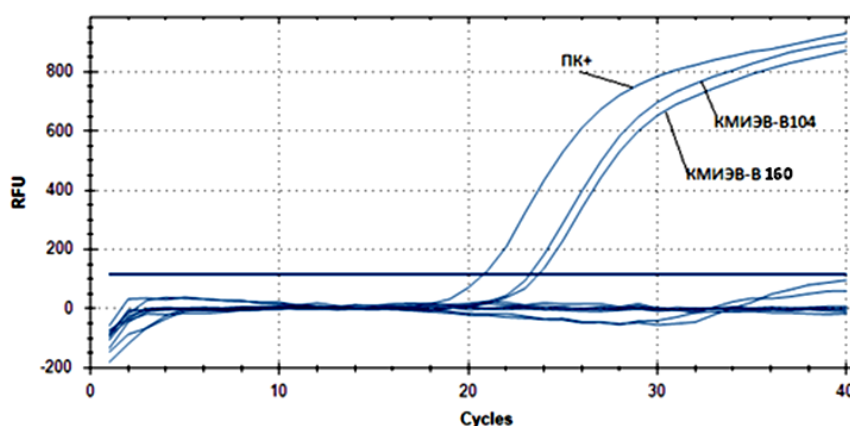


Рисунок 1. – Результаты постановки ПЦР в реальном времени по идентификации гена *eltA* у штаммов *Escherichia coli*

Таблица 1. – Определение корреляции адгезивного серотипа и наличия гена *eltA*

<i>Escherichia coli</i>	Ген <i>eltA</i>	Фимбриальный адгезин
КМИЭВ-38	-	F5 (K99)
КМИЭВ-39a	-	A20 (Att25)
КМИЭВ-98	-	F41
КМИЭВ-В101	-	F5 (K99)
КМИЭВ-В102	-	F5 (K99)
КМИЭВ-В103	-	F6 987p
КМИЭВ-В104	+	F4 (K88)
КМИЭВ-В160	+	F4 (K88)

Определение концентрации ЛТ в среде культивирования. Энтеротоксигенный штамм *Escherichia coli* «КМИЭВ-В160» культивировали в сердечно-мозговом бульоне, приготовили опытный образ-

зец (бесклеточный супернатант), содержащий ЛТ. Определили оптическую плотность стандартных и опытного образцов в реакции GM1-ИФА (таблица 2).

Таблица 2. – Учет результатов GM1-ИФА

Образец	Концентрация, нг/мл	Среднее значение оптической плотности (M±μ)
Стандарт (rLTB)	1	0,0795±0,001
Стандарт (rLTB)	50	0,3545±0,022
Стандарт (rLTB)	200	0,571±0,031
Опытный образец (бесклеточный супернатант)	x	0,232±0,024

Построили калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации по стандарту rLTB (рисунок 2).

По калибровочному графику определили концентрацию ЛТ в супернатанте, которая составила 23 нг/мл.

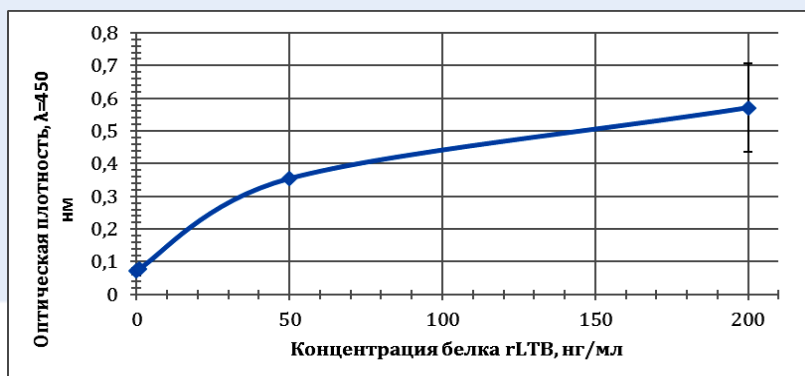


Рисунок 2. – График зависимости оптической плотности от концентрации белка rLTB

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам постановки ПЦР выявлен энтеротоксигенный штамм *Escherichia coli* «КМИЭВ-В160», продуцирующий ЛТ. Построен калибровочный график по результатам постановки GM1-ИФА с использованием rLTB и определена концентрация ЛТ в среде культивирования,

которая составила 23 нг/мл.

Выявление энтеротоксигенных штаммов *Escherichia coli*, экспрессирующих ЛТ, дает возможность подобрать штамм-продуцент ЛТ с целью накопления антигена ЛТ в среде культивирования и дозированного его внесения в препарат специфической профилактики колибактериоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Andrew, C. V. Partition of Heat-Labile-Enterotoxin Genes between Human and Animal *Escherichia coli* Isolates / C. V. Andrew, W. Dallas // *Infect. Immun.*, 1987. – Vol. 55, № 5. – P. 1329–1331.
2. Serotypes and colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in various countries / J. Blanco [et al.] // *Eur J Epidemiol.* – 1993. – Vol. 9. – P. 489–495.
3. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli* / M. A. Croxen [et al.] // *Clin Microbiol Rev*, 2013. – Vol. 26, iss. 4. – P. 822–880.
4. Dubreuil, J. D. Animal enterotoxigenic *Escherichia coli* / J. D. Dubreuil, R. E. Isaacson, D. M. Schifferli // *EcosalPlus.* – 2016. – Vol. 7(1): doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016.
5. Nagy, B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine / B. Nagy, P. Z. Fekete // *International Journal of Medical Microbiology.* – 2005. – Vol. 295. – P. 443–454.
6. Svennerholm, A. M. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* / A. M. Svennerholm, J. Tobias // *Expert Rev. Vaccines.* – 2008. – Vol. 7, iss. 6. – P. 795–804.
7. Protective immunity of a Multivalent Vaccine Candidate against piglet diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in a pig model / H. Zhang [et al.] // *Vaccine.* – 2018. – Vol. 36, iss. 5. – P. 723–728.

УДК 619:615.284

Мясцова Т.Я., кандидат ветеринарных наук, доцент
Якубовский М.В., доктор ветеринарных наук, профессор
Щемелева Н.Ю., кандидат ветеринарных наук, доцент

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

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КОМПЛЕКСНОГО АНТГЕЛЬМИНТНОГО ПРЕПАРАТА «ТРИКЛАМИЗОЛ»

Резюме

Изучены токсикологические параметры комплексного препарата, предназначенного для лечения и профилактики ассоциативных гельминтозов крупного рогатого скота (острая и хроническая токсичность, раздражающее и сенсибилизирующее свойства препарата), на лабораторных животных.

Summary

The toxicological parameters of a complex preparation intended for the treatment and prevention of associative helminthiasis in cattle have been studied – this is an acute and chronic toxicity irritating and sensitizing properties of the drug on laboratory animals.

Поступила в редакцию 10.01.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

В хозяйствах республики гельминтозные заболевания крупного рогатого скота все еще имеют значительное распространение. Потери продуктивности при хроническом фасциолезе составляют 8,17–12,75 %, выбраковка печени – 11,68–22,92 % [5]. Себестоимость 1 ц прироста живой массы повышается на 11,72 % и более.

Как правило, у животных наблюдается ассоциативное течение гельминтозов, среди которых наиболее часто встречаются фасциолез, стронгилятозы желудочно-кишечного тракта и др. Фасциолез является опасным зоонозом.

Для предупреждения потери животноводческой продукции необходимо проводить лечение животных на личиночной стадии развития трематод и нематод препаратами широкого спектра действия [4].

В связи с этим перспективным является создание комплексного препарата, эффективного как при преимагинальной личиночной форме трематод и нематод, так и при имагинальной стадии развития этих гельминтов. По сравнению с монокомпонентными препаратами, к данному препара-

ту не будет развиваться привыкание гельминтов [1, 2, 6].

Преимущество комплексных противопаразитарных препаратов состоит в том, что их компоненты обладают синергическим действием, и это значительно повышает их противопаразитарную эффективность, а также предупреждают развитие устойчивых видов фасциол, цестод и нематод к антгельминтикам.

Цель работы – исследование токсикологических параметров комплексного препарата широкого спектра действия для ранней терапии и профилактики трематодозов и ассоциативных нематодозов крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение токсикологических параметров разработанного ветеринарного препарата «Трикламизол» проводили согласно Методическим указаниям по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии. Расчет среднесмертельной дозы (LD₅₀) препарата проводили по Першину Г.Н. (2007) [3].

Определение острой токсичности препарата проводили в два этапа.

Первый этап. Предварительное определение дозы, не вызывающей гибели, и дозы, вызывающей 100%-ную гибель животных, провели на 20 клинически здоровых белых мышах живым весом 21–29 г, разделенных на 4 группы по 5 голов в каждой. Животным 1-й группы применили препарат в дозе 3000 мг/кг, 2-й группы – 5000 мг/кг и 3-й группы – 7000 мг/кг. Препарат вводили внутрижелудочно в виде 40%-ной суспензии на 1%-ном крахмальном геле. Животным 4-й группы вводили 1%-ный крахмальный гель в объеме 0,3 мл.

Второй этап. С учетом полученных в предварительном опыте результатов в основном опыте было сформировано 6 групп мышей по 7 голов. Мышам 1–5-й групп препарат вводили однократно внутрижелудочно с помощью зонда в дозах 3000 мг/кг, 5000 мг/кг, 7000 мг/кг, 8000 мг/кг, 9000 мг/кг, мышам контрольной группы – 1%-ный крахмальный гель в объеме 0,5 мл.

В связи с тем, что разрабатываемый препарат планируется применять крупному рогатому скоту внутрь, провели скармливание препарата белым мышам с половинной нормой корма в утреннее кормление: 1-й группе (10 голов) – 12000 мг/кг, 2-й группе – 14000 мг/кг, группа контроля препарат не получала.

Клиническое наблюдение за мышами вели в течение 14 дней. Учитывали общее состояние животных, поедаемость корма, двигательную активность, состояние шерстного покрова.

Изучение хронической токсичности препарата проводили на клинически здоровых белых мышах весом 21–28 г.

Для определения хронической токсичности готовили суспензию препарата в 30%-ной концентрации на 1%-ном крахмальном клейстере и вводили мышам внутрижелудочно с помощью зонда.

Было сформировано 4 группы мышей по 7 голов в каждой. Суспензию препарата задавали натошак внутрижелудочно ежедневно в течение 3 дней: животным 1-й группы – в дозе 600,0 мг/кг, равной

1/10 LD₅₀, 2-й группы – в дозе 300,0 мг/кг, равной 1/20 LD₅₀, 3-й группы – в дозе 120,0 мг/кг, равной 1/50 LD₅₀. Мышам 4-й группы вводили 1%-ный крахмальный гель в дозе 0,5 мл/гол.

Кормление и поение животных проводили через 3,5–4 часа после введения препарата. Клиническое наблюдение за состоянием мышей осуществляли в течение 14 дней после последнего введения препарата, при этом учитывали общее состояние, степень поедаемости корма, состояние шерстного покрова, наличие жажды и другие клинические признаки.

Определение раздражающего действия трикламизола на слизистые оболочки проводили методом конъюнктивальной пробы на 3 кроликах массой 2,0–2,5 кг путем внесения тонко измельченного препарата в дозе 50 мг однократно в конъюнктивальный мешок глаза. Другой глаз служил контролем.

Оценку местного раздражающего действия комплексного препарата «Трикламизол» на кожные покровы проводили на 3 кроликах и 3 морских свинках путем нанесения раствора препарата в дозе 0,1 мл/см² (на 96%-ном этиловом спирте) на выстриженный участок кожи. Наблюдения проводили в течение 14 дней.

Сенсибилизирующие свойства трикламизола определяли методом накожных аппликаций на 3 морских свинках массой 320–350 г. Сенсибилизацию проводили ежедневными аппликациями раствора трикламизола на 96%-ном этаноле в дозе 0,1 мл на один и тот же участок кожи в течение 14 дней. Затем после 14-дневного перерыва с момента последней аппликации на свежевыстриженные участки кожи с противоположной стороны наносили разрешающую дозу препарата в том же количестве.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение острой токсичности в предварительном опыте показало, что при внутрижелудочном введении минимальная доза препарата, которая не вызывает гибели мышей, равна 3000 мг/кг, максимальная – 7000 мг/кг.

Во втором опыте установлено, что первые признаки интоксикации у мышей 3–5-й групп появлялись через 30–40 минут. Основной падеж мышей в группах 2–4 наблюдался в первые сутки после введения

препарата (таблица). Токсическое действие препарата проявлялось в виде отсутствия активных движений, отказа от корма, тяжелого и частого дыхания, взъерошенности и влажности шерстного покрова.

Таблица. – Результаты проведения опыта по изучению острой токсичности комплексного препарата при внутрижелудочном введении

Номер группы	Доза, мг/кг	Кол-во, гол.	День наблюдений								Общее число, гол.	
			1-й		2-й		3-й		4–14-й			
			выжило	пало	выжило	пало	выжило	пало	выжило	пало	выжило	пало
1	3000	7	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0/0
2	5000	7	4	3	4	0	4	0	4	0	4	3/42,85
3	7000	7	2	5	2	0	2	0	2	0	2	5/71,43
4	8000	7	3	4	1	2	1	0	1	0	1	6/85,71
5	9000	7	0	7	0	0	0	0	0	0	0	7/100
Контроль	-	7	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0/0

Тяжесть клинического состояния белых мышей зависела от дозы препарата. Расчет среднесмертельной дозы препарата по Першину при внутрижелудочном введении показал, что она составляет 6000 мг/кг.

При скармливании с кашей мыши 1-й группы поедали корм неохотно, но съедали весь его объем, тогда как мыши 2-й группы в течение 3 часов не могли съесть весь корм с препаратом. Дальнейшее увеличение дозы не имело смысла, так как животные отказывались поедать корм с препаратом.

При скармливании препарата с кормом среднесмертельную дозу установить не представилось возможным, т.к. максимально введенная доза составила 14000 мг/кг.

Изучение хронической токсичности препарата показало, что после каждого его

введения и в течение всего периода наблюдений в клиническом состоянии мышей всех опытных и контрольной групп отклонений от физиологической нормы отмечено не было, т.е. животные были активны, охотно поедали корм, жажда отсутствовала, шерстный покров оставался гладким и блестящим.

Изучение раздражающего действия показало, что внесение тонко измельченного препарата в дозе 50 мг однократно в конъюнктивальный мешок глаза кроликов вызывало незначительное слезотечение и покраснение слизистой оболочки, которое проходило через 10–20 минут. При дальнейшем наблюдении через 24 и 48 часов каких-либо патологических изменений со стороны конъюнктивы и склеры глаза не отмечалось.

При оценке местного раздражающего действия комплексного препарата «Трикламизол» на кожные покровы кроликов и морских свинок было установлено, что при нанесении раствора препарата на выстриженный участок кожи гиперемии, отека, шелушения и других признаков в течение 16–24 и 48 часов после нанесения не наблюдалось. Общее состояние животных, поедаемость корма, состояние шерстного покрова были в норме, сохранялась двигательная активность.

Следовательно, комплексный препарат «Трикламизол» не обладает раздражающим действием при внесении в конъюнктивный мешок и нанесении на кожные покровы лабораторных животных.

Сенсибилизирующие свойства трикламизола после нанесения разрешающей дозы не проявлялись. Реакция со стороны кожи и организма животных отсутствовала, изменений в общем клиническом состоянии животных не происходило.

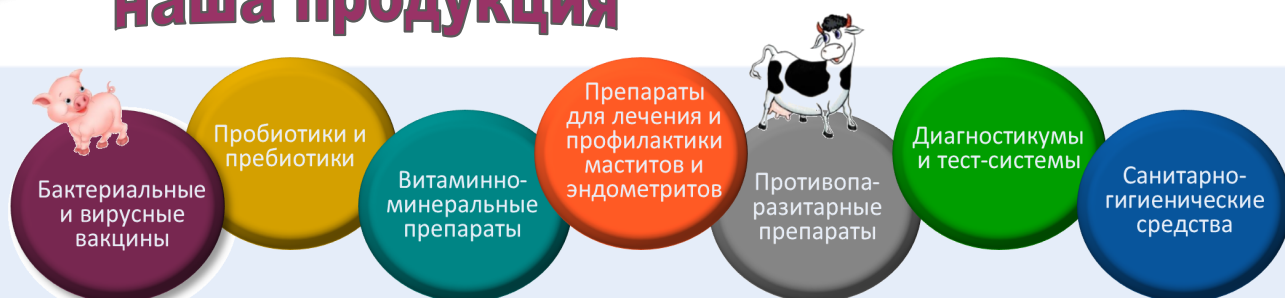
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты исследований показали, что среднесмертельная доза препарата по физическому весу при внутривенном введении для белых мышей составляет 6000 мг/кг. При скормлении препарата с кормом среднесмертельную дозу установить не представилось возможным, т.к. максимально введенная доза составила 14000 мг/кг. В хроническом опыте он не вызывает каких-либо отклонений от физиологической нормы в клиническом состоянии у мышей, получавших препарат в дозах 1/10 (600 мг/кг), 1/20 (300 мг/кг) и 1/50 (120 мг/кг) дозы LD₅₀, не обладает раздражающим действием на слизистые оболочки и кожные покровы лабораторных животных. Не обладает аллергизирующими свойствами. Согласно ГОСТ 12.1.007-76 комплексный препарат относится к веществам малоопасным, т.е. к 4-му классу опасности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бессонов, А. С. Резистентность к паразитоцидам: система интегрированного управления развитием паразитов / А. С. Бессонов // *Ветеринария*. – 2003. – № 2. – С. 29–32.
2. Викторов, А. В. Ивермектин, развитие резистентности / А. В. Викторов, В.А. Дриняев // *Ветеринария*. – 2002. – № 4. – С. 50–54.
3. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии / Э. А. Высоцкий [и др.]. – Минск, 2007. – 156 с.
4. Напалкова, В. В. Фармако-токсикологические свойства суспензии на основе триклабендазола и ее терапевтическая эффективность при фасциолезе крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. биол. наук / В. В. Непалкова. – М., 2008. – 33 с.
5. Якубовский, М. В. Фасциолез: успехи и проблемы профилактики / М. В. Якубовский, Н. Ю. Щемелева // *Эпизоотология, иммунология, фармакология, санитария*. – 2012. – № 1. – С. 3–8.
6. Byford, R. L. Horn fly resistance to insecticides / R. L. Byford, J. A. Lockwood, S. M. Smith. – *Louisiana AGR*. – 1986. – Т. 29. – P. 18–19, 21.

наша продукция



УДК 619:615.9:616-008.9

Кучинский М.П., доктор ветеринарных наук, профессор
Сонов А.А., научный сотрудник
Савчук Т.М., научный сотрудник

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

ИЗУЧЕНИЕ ЭМБРИОТОКСИЧНОСТИ, ТЕРАТОГЕННОСТИ И КОЖНО-РЕЗОРБТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА «КАЛЬЦЕМАГФОСВИТ»

Резюме

В статье приводятся результаты доклинических исследований по изучению эмбриотоксического и тератогенного, а также кожно-резорбтивного воздействия экспериментального образца нового ветеринарного препарата на лабораторных животных – белых крысах. На основании проведенных исследований и полученных результатов установлено, что фармацевтическая композиция не вызывает эмбриотоксического и тератогенного действия на эмбрионы и потомство лабораторных животных, а также не оказывает кожно-резорбтивного действия на кожу.

Summary

The article presents the results of preclinical research of the study of embryotoxic and teratogenic, skin-resorptive effects of an experimental sample of a new veterinary drug for laboratory animals – white rats. Based on the research the results obtained, that the pharmaceutical composition has not embryotoxic and teratogenic effects on the embryos and newborns of laboratory animals, and also does not have a skin-resorptive effect for skin.

Поступила в редакцию 05.05.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

Животноводство является ведущей отраслью агропромышленного комплекса Республики Беларусь. От его эффективности зависит уровень удовлетворения населения продуктами питания и экономическое благополучие аграрного сектора в целом. Для увеличения количества и качества получаемой животноводческой продукции в последние годы активно идет процесс интенсификации производства, увеличивается поголовье животных [8].

Стремление к постоянному увеличению продуктивности как молочного, так и мясного поголовья крупного рогатого скота на животноводческих комплексах обуславливает также и увеличение частоты проявления патологий различного генеза, среди которых преобладают заболевания, связанные с недостаточностью и дисбалансом биоэлементов. Это приводит к нарушению всех типов обмена веществ, следовательно, и к снижению количества и качества получаемой продукции [2, 6].

Для увеличения производства продукции животноводства важно использовать современные достижения научно-технического прогресса, в том числе в области ветеринарной фармакологии. С целью устранения дефицита макро- и микроэлементов в организме продуктивных животных актуально применение парентеральных ветеринарных препаратов, использование которых позволяет быстро нормализовать минеральный обмен, а также профилактировать возникновение гипобиозэлементозов [4].

Новые препараты, внедряемые в практику ветеринарной медицины, должны соответствовать современным требованиям безопасности, а также быть эффективными при лечении больных животных, повышать их продуктивность и воспроизводительную способность [5].

Одним из этапов оценки безопасности нового ветеринарного препарата на стадии доклинических испытаний является определение на лабораторных животных

его тератогенного, эмбриотоксического и кожно-резорбтивного действия. Под тератогенностью понимают способность некоторых физических, химических и биологических факторов, влияющих на организм беременной самки, вызывать анатомические аномалии (уродства) у развивающихся эмбрионов или плодов. Эмбриотоксичность – способность некоторых химических веществ и биологических агентов при проникновении в организм беременных животных вызывать гибель эмбрионов [3]. На более поздних сроках проявляется фетотоксическое действие.

Задачей изучения кожно-резорбтивного действия является получение ответа о возможности веществ, входящих в состав препарата, проникать через неповрежденную кожу и вызывать интоксикацию организма [7].

Следовательно, изучение эмбриотоксичности и тератогенности необходимо для исключения возможности токсического влияния препарата на эмбрионы животных, а также на развитие плодов и молодняка в постнатальный период. Ввиду того, что некоторые действующие и вспомогательные вещества препаратов могут вызывать преждевременные аборты, аномалии развития плодов и уродства, высокую смертность в первые месяцы жизни, такие исследования являются основополагающим при планировании доклинических испытаний экспериментального образца нового лекарственного средства.

Также важным начальным этапом исследований по созданию новых ветеринарных препаратов является определение кожно-резорбтивного действия на лабораторных животных. Это позволяет оценить способность новой фармацевтической композиции оказывать токсическое действие на кожные покровы, а также определить степень этих повреждений.

С учетом вышеизложенного, изучение эмбриотоксичности и тератогенности новых лекарственных средств, а также кожно-резорбтивного действия является важным и обязательным этапом их доклинических исследований.

Целью настоящих исследований явилось изучение на лабораторных животных возможной эмбриотоксичности и тератогенности нового ветеринарного препарата на основе макроэлементов «Кальцемагфосвит», а также определение его кожно-резорбтивного действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Комплексный ветеринарный препарат «Кальцемагфосвит» представляет собой прозрачную бесцветную жидкость или светло-желтого цвета без механических включений. В своем составе содержит кальций (в форме кальция глюконата), магний (в форме магния хлорида), фосфор (в форме бутофосфана), глюкозу, аскорбиновую и борную кислоты.

Исследования проводились на базе вивария и отдела токсикологии и незаразных болезней животных РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Животные – белые крысы – содержались согласно санитарным правилам при стандартном освещении, температуре воздуха 18–22 °С и относительной влажности 65–70 %, с одинаковыми условиями кормления и поения у всех групп животных.

Опыт по изучению тератогенного и эмбриотоксического влияния препарата проводили на 5 группах (1–4 – опытные, 5 – контрольная) половозрелых самок белых крыс массой 190–250 г согласно Методическим рекомендациям по токсико-экологической оценке лекарственных средств, применяемых в ветеринарии [1]. В каждой группе находилось по 8 животных.

Самок каждой группы подсаживали вечером к двум половозрелым самцам. Утром следующего дня готовили мазки из влагалища, затем исследовали их с помощью микроскопии. День обнаружения сперматозоидов в мазке считали началом беременности. Интактные самцы после подтверждения беременности из эксперимента были исключены.

Препарат самкам крыс вводили подкожно один раз в сутки в одно и то же вре-

мя в дозе 15625 мг/кг массы тела: 1-й группе – с 1-го по 7-й день беременности (период эмбриогенеза); 2-й группе – с 8-го по 14-й день беременности (период органогенеза); 3-й группе – с 15-го по 19-й день беременности (плодный период филогенеза); 4-й группе – с 1-го по 19-й день (в течение всего периода беременности). Животным контрольной группы кальцемагфосвит не применяли. За крысами велось ежедневное клиническое наблюдение.

Для выявления возможного эмбриотоксического и тератогенного эффекта на 20-й день беременности под эфирным наркозом было декапитировано по 6 самок из каждой группы. После их вскрытия проводилось исследование матки, плаценты, плодов, подсчет их количества, количества мест имплантации в матке. Для выявления тератогенного эффекта плоды переносили в чашки Петри с физиологическим раствором и исследовали под лупой с целью выявления уродств. От двух самок из каждой группы получали потомство, за которым вели клиническое наблюдение в течение 2 месяцев. При этом учитывали двигательную активность, сроки открытия глаз, появления шерстного покрова. Опыт по оценке кожно-резорбтивного действия препарата проводили согласно Методическим указаниям по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ве-

теринарии [7]. Из 16 белых крыс живой массой 150–170 г было сформировано две равные группы (контрольная и опытная).

Животных обеих групп фиксировали в горизонтальном положении, при этом хвосты погружали в пробирки, на 2/3 заполненные экспериментальным образцом препарата «Кальцемагфосвит», а в опытной группе – дистиллированной водой. Экспозиция составляла 4 часа, а учет результатов опыта проводили через 1 и 16 часов после его окончания. Наблюдение за общим состоянием вели в течение 14 суток [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При вскрытии беременных крыс, находившихся в опыте по определению эмбриотоксичности и тератогенности, установлено, что количество плодов у самок первой группы составило 61, второй – 63, третьей – 59, четвертой – 60, в контрольной группе – 60 соответственно. При этом количество мест имплантации совпадало с количеством плодов.

Исследования показали, что у плодов аномалий глаз (аноптальмия, микрофтальмия и др.), мозга (мозговая грыжа и др.), черепа (заячья губа, волчья пасть и др.), конечностей, пальцев, хвоста, позвоночника, передней брюшной стенки не выявлено (таблица).

Таблица. – Результаты изучения эмбриотоксического и тератогенного действия препарата «Кальцемагфосвит» при введении белым крысам

Показатели	Группа животных				
	1	2	3	4	5 (контроль)
Количество беременных самок	6	6	6	6	6
Количество плодов на одну самку	10,2	10,5	9,8	10	10
Количество мест имплантации	61	63	59	60	60
Аномалии развития внутренних органов и скелета	-	-	-	-	-
Уродства	-	-	-	-	-

Результаты наблюдений за рожденными крысятами показали, что в опытных группах патологических родов, уродств и мертворожденных животных не наблюдали. Количество рожденных крысят по группам составило: 24 (1-я), 25 (2-я), 22 (3-я), 20 (4-я) и 21 (контроль). У новорожденных

отмечали нормальную двигательную активность, хороший сосательный рефлекс, целостные кожные покровы. Опушение крысят начиналось в среднем на 9–10-й дни во всех группах, глаза открывались на 15–16-й дни. Во время наблюдений за рожденными крысятами в течение 2 месяцев

отклонений в развитии и физиологическом состоянии выявлено не было.

Таким образом, препарат, применяемый в различные сроки беременности (периоды эмбриогенеза, органогенеза, плодный период филогенеза и в течение всей беременности), не вызывает патологических изменений у беременных крыс, а также отклонений в развитии потомства, что свидетельствует об отсутствии у препарата тератогенных и эмбриотоксических свойств.

При проведении опыта по определению кожно-резорбтивного действия экспериментального образца препарата «Кальцемагфосвит» установлено, что отклонений в состоянии кожного покрова в опытной и контрольной группах не наблюдалось: отсутствовали гиперемия, изъязвления, дерматит и т.д. Клиническое состояние животных в обеих группах оставалось удовлетворительным в течение 14 суток наблюдения после окончания опыта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современном животноводстве ветеринарные препараты достаточно широко используются для профилактики болезней, лечения больных животных, повышения резистентности, продуктивности и воспроизводительной способности. Тем не менее, одной из основополагающих задач совре-

менной фармакологии является дальнейший поиск новых, более эффективных и безопасных для организма животных лекарственных средств, а также разработка схем и рекомендаций по их применению. Мишенью большинства препаратов являются ферменты организма животных. Поэтому весьма актуальной является разработка комплексных лекарственных средств, действующих на многие звенья биохимического гомеостаза организма. С учетом того, что у животных сельхозпредприятий Республики Беларусь достаточно часто диагностируются болезни, обусловленные дефицитом и нарушением обмена макроэлементов, создание на их основе эффективных и безопасных препаратов имеет важное значение для ветеринарной науки и практики.

Доклинические фармакологические исследования по определению эмбриотоксичности и тератогенности, а также кожно-резорбтивного действия экспериментального образца нового ветеринарного препарата «Кальцемагфосвит», проведенные в условиях вивария РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», показали, что разработанный препарат на основе макроэлементов не обладает негативным влиянием на беременных самок, эмбрионы и потомство лабораторных животных, а также не оказывает кожно-резорбтивного действия на кожу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арзунов, М. Н. Методические рекомендации по токсико-экологической оценке лекарственных средств, применяемых в ветеринарии / М. Н. Арзунов, Л. Б. Сафонова, В. В. Василенко. – Воронеж, 1998. – 24 с.
2. Зенькова, Н. Снова о кормах, качестве и технологиях / Н. Зенькова, Н. Разумовский // Белорусское сельское хозяйство – 2017. – № 5 (181) – С. 44–46.
3. Краткий токсикологический словарь / под ред. А. В. Иванова. – М. : ФГБНУ «Росинформагротех», 2012. – 252 с.
4. Кучинский, М. П. Болезни обмена веществ у сельскохозяйственных животных и их профилактика / М. П. Кучинский // Наука и инновации. – 2014. – № 8 (138). – С. 15–20.
5. Кучинский, М. П. Биоэлементный статус организма сельскохозяйственных животных хозяйств Республики Беларусь, способы и средства его коррекции / М. П. Кучинский // Экология и животный мир. – 2014. – № 2. – С. 37–45.
6. Кучинский, М. П. Витамины и минералы в рационах / М. П. Кучинский // Животноводство России – 2016. – № 10. – С. 53–55.
7. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии / Э. А. Высоцкий [и др.]. – Минск, 2007. – 156 с.
8. Мищенко, В. А. Современное состояние и направления повышения эффективности производства продукции животноводства в Республике Беларусь / В. А. Мищенко, Л. В. Мищенко // Вестник Брянской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. – С. 51–57.

УДК 611.441:636.92

Кучинский М.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹

Николаев С.В., аспирант²

Федотов Д.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент²

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

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

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ БИОЭЛЕМЕНТОВ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ХАРАКТЕРИСТИКУ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРОЛИКОВ

Резюме

В статье описана морфология щитовидной железы кроликов в постнатальном онтогенезе под влиянием препарата «Хромарцин». Установлены морфофункциональные особенности структур щитовидной железы и положительная динамика роста высоты тиреоидного эпителия после приема препарата.

Summary

The article describes material on the morphology of the thyroid gland in rabbits in postnatal ontogenesis and under the influence of the drug «Chromarcin». The morphological and functional features of the structural thyroid gland and the positive dynamics of the pattern of increase in the height of the thyroid epithelium under the influence of the drug are established.

Поступила в редакцию 11.02.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

Кролиководство занимает особую позицию в современном животноводстве, являясь одной из перспективнейших его отраслей. Основная продукция кролиководства – это диетическое мясо высокого качества, а также сырье для меховых изделий (шкурки и пух). Благодаря высокому содержанию белка, низкому уровню холестерина, сбалансированности по аминокислотному составу и хорошей усвояемости, крольчатину используют для лечебного питания при различных заболеваниях в рационах детей и людей пожилого возраста. Высокая плодовитость и скороспелость кроликов дает возможность в короткие сроки получить от них значительное количество мяса [1, 2, 3, 6, 9].

Для успешного развития кролиководства важна корректная и научно обоснованная оценка морфогенеза щитовидной железы кроликов в онтогенезе, а также изыскание новых способов и средств, регулирующих обмен веществ, повышающих продук-

тивность и сохранность поголовья молодняка, профилактирующих гипофункцию и патологию эндокринных желез [1, 6].

Обогащение организма животных микроэлементами происходит преимущественно за счет корма, воды и воздуха. Следовательно, важнейшим их поставщиком является сама окружающая среда. Однако нередки случаи, когда возникает дефицит одного или нескольких биоэлементов. В некоторых регионах отмечается дефицит, а в отдельных случаях даже полное отсутствие тех или иных химических элементов, в результате чего животные нуждаются в дополнительном их применении или назначении витаминно-минеральных добавок.

Для полноценного и качественного функционирования организм животного должен получать все эссенциальные микроэлементы, так как они участвуют в контроле кислотно-щелочного и водного баланса, обеспечивают осмос в клетке, уровень кислотности в крови, активность фер-

ментов. Помимо этого, минералы важны в процессах прохождения нервных импульсов по мышечным волокнам, двигательной активности мышц, свертываемости крови, насыщения кислородом тканей. Микроэлементы функционально связаны с витаминами, гормонами, ферментами и работают в тандеме, обеспечивая стройную систему обмена веществ и метаболизма [2, 4, 5, 7].

Щитовидная железа является самым крупным органом эндокринной системы. Она вырабатывает и накапливает йодсодержащие гормоны (тироксин, трийодтиронин), участвующие в регуляции обмена веществ и энергии в организме. Щитовидную железу называют «диспетчером» всей эндокринной системы, поскольку посредством тиреоидных гормонов она регулирует деятельность других желез внутренней секреции (гипофиз, половые железы) и тем самым оказывает влияние практически на все метаболические процессы в организме. Для нормального функционирования щитовидной железы необходим йод в сочетании с селеном, цинком, хромом и другими биоэлементами [5, 6, 8, 10, 11, 12, 13].

Гормоны щитовидной железы влияют на качество волосяного покрова и мясную продуктивность кроликов [2, 3, 6]. Для успешной работы эндокринного аппарата необходимо в рацион добавлять биоэлементы [11, 13]. Однако до сих пор недостаточно полно изучен вопрос влияния комплекса микроэлементов на организм кроликов и их щитовидную железу, что и послужило основанием для выполнения данной работы.

Цель исследования – изучить влияние ветеринарного препарата «Хромарцин» на морфофункциональную характеристику щитовидной железы кроликов. Препарат представляет собой однородную жидкость темно-коричневого цвета и содержит в виде наночастиц железо, цинк, марганец и хром.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились в условиях личного подсобного кролиководческо-

го хозяйства Витебского района, прозектория кафедры патологической анатомии и гистологии УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины».

Кролики в возрасте 120 дней по принципу условных аналогов были разделены на 2 группы: контрольную (n=20) и опытную (n=20). Животные обеих групп находились в унифицированных условиях содержания и были свободны от инфекционных и инвазионных болезней. В начале опыта провели диагностический убой кроликов (фоновые показатели), по 5 голов от каждой группы. Оставшимся животным опытной группы в течение 10 дней один раз в сутки задавали орально из расчета 5,0 мл на 10 л воды ветеринарный препарат «Хромарцин». Кролики контрольной группы препарат не получали. Кормление и поение животных обеих групп проводилось общепринятым методом.

По достижении кроликами 130-дневного возраста опять проводили убой животных, по 5 от каждой группы. В период со 130-го по 140-й дни жизни кролики опытной группы препарат не получали. По достижении 140-дневного возраста вновь проводили убой 5 животных из каждой группы. Остальным кроликам опытной группы в течение 10 дней продолжали выпаивать препарат «Хромарцин» по описанной выше схеме. По достижении 150-дневного возраста провели убой оставшихся животных.

В конце каждого периода для гистологического исследования от каждой группы кроликов проводили отбор щитовидных желез. После убоя щитовидные железы взвешивали, измеряли и фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина и в жидкости Бродского. Затем морфологический материал подвергали уплотнению путем заливки в парафин по общепринятым методикам. Изготавливали гистологические срезы толщиной 3–5–7 мкм на санном микротоме. Для изучения общей гистологической картины срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Терминология описываемых гистологичес-

ких структур семенников приводилась в соответствии с Международной гистологической номенклатурой.

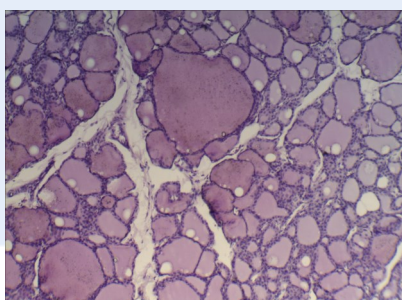
Абсолютные измерения структурных компонентов щитовидной железы кроликов осуществляли при помощи светового микроскопа «Olympus» модели ВХ-41 с цифровой фотокамерой системы «Altra₂₀» и спектрометра HR 800 с использованием программы «Cell^A».

Все цифровые данные, полученные при проведении экспериментальных исследований, были обработаны статистически с помощью компьютерной программы

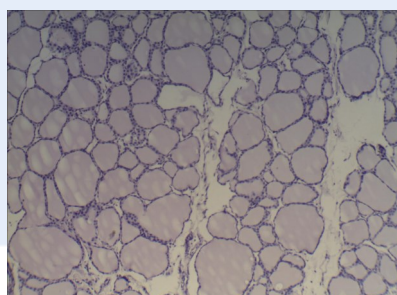
«Microsoft Office Excel», критерий Стьюдента на достоверность различий сравниваемых показателей оценивали по трем порогам вероятности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

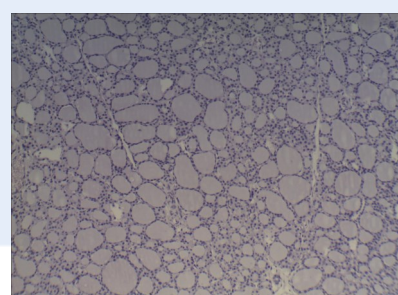
При гистологическом исследовании щитовидной железы кроликов установлено, что паренхима органа представлена всеми классическими структурными элементами (рисунки 1, 2, 3). Строму органа представляет капсула и отходящие от нее соединительнотканые перегородки, разделяющие орган на дольки.



Фон, окраска гематоксилин-эозином, ×100
Рисунок 1. – Гистологическое строение щитовидной железы кроликов 120-суточного возраста



Контроль, окраска гематоксилин-эозином, ×100
Рисунок 2. – Гистологическое строение щитовидной железы кроликов 130-суточного возраста.



Опыт, окраска гематоксилин-эозином, ×100
Рисунок 3. – Гистологическое строение щитовидной железы кроликов 130-суточного возраста

Тиреоциты преимущественно кубической формы, формируют стенку для каждого фолликула. Ядра тиреоидного эпителия – от уплощенной до округлой формы, расположены в центре клеток. Высота тиреоцитов щитовидной железы у 120-суточных кроликов контрольной и опытной групп (фон) составляла соответ-

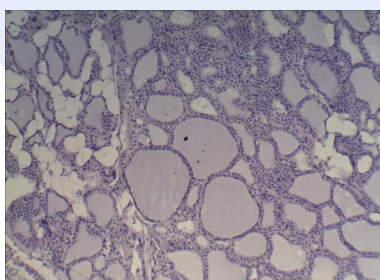
ственно $3,50 \pm 0,41$ и $3,13 \pm 0,21$ мкм (таблица). В этот изучаемый период большинство тиреоцитов имело низкокубическую форму с преобладанием в ядрах гетерохроматина. Фолликулы были растянуты коллоидом и имели форму от овально-округлой до неправильной. Коллоид густой, без признаков резорбции.

Таблица. – Морфометрические показатели гистологических структур щитовидной железы кроликов под влиянием препарата «Хромарцин»

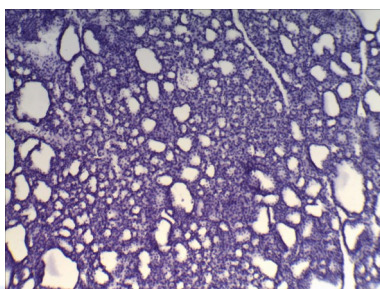
Показатели	Возраст кроликов (суток) и группа							
	120		130		140		150	
	К	О	К	О	К	О	К	О
Высота тиреоцитов, мкм	$3,50 \pm 0,41$	$3,13 \pm 0,21$	$3,26 \pm 0,26$	$5,15 \pm 0,20^*$	$3,60 \pm 0,34$	$4,93 \pm 0,70$	$3,14 \pm 0,51$	$7,80 \pm 0,38^{***}$
Средний диаметр фолликулов, мкм	$65,41 \pm 6,04$	$63,75 \pm 4,24$	$68,01 \pm 8,48$	$45,19 \pm 7,02^*$	$74,16 \pm 6,22$	$44,71 \pm 5,34^{**}$	$81,25 \pm 6,14$	$41,77 \pm 6,04^{**}$

Примечание – К – контрольная группа; О – опытная группа; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ по отношению к контрольной группе

На 130-е сутки применения препарата «Хромарцин» форма тиреоцитов трансформировалась с низко-кубической в кубическую, а высота увеличивалась в 1,58 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В фолликулах коллоид местами становился пенным, выявлялись резорбционные вакуоли. Диаметр таких фолликулов в опытной группе составлял $45,19 \pm 7,02$ мкм, что меньше в 1,50 раза ($p < 0,05$) по сравнению с размером фолликулов в контроле ($68,01 \pm 8,48$ мкм). На 140-сутки опыта в щитовидной железе кроликов высота тиреоидного эпителия увеличивалась, а средний диаметр фолликулов уменьшался в 1,66 раза ($p < 0,01$) и составлял $44,71 \pm 5,34$ мкм. Ядра тиреоцитов у животных опытной группы имели шаровидную форму, содержали эухроматин и два ядрышка. В контроле ядра тиреоидного эпителия были палочковидной формы с гетерохроматинном (рисунки 4, 5).

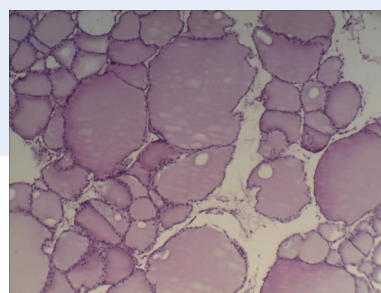


Контроль, окраска гематоксилин-эозином, $\times 100$
Рисунок 4. – Гистологическое строение щитовидной железы кроликов 140-суточного возраста

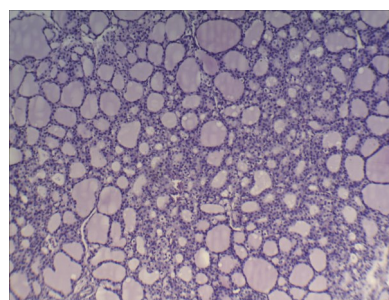


Опыт, окраска гематоксилин-эозином, $\times 100$
Рисунок 5. – Гистологическое строение щитовидной железы кроликов 140-суточного возраста

На 150-сутки в опытной группе форма тиреоцитов с кубической трансформировались в призматическую, высота увеличивалась в 2,48 раза ($p < 0,001$), а фолликулы приобретали округлую форму с резорбционными вакуолями в коллоиде, и их диаметр уменьшался в 1,95 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контролем (рисунки 6, 7). В контрольной группе фолликулы представлены тиреоцитами преимущественно крупных размеров ($81,25 \pm 6,14$ мкм) с густым коллоидом без признаков резорбции и плоскими, что свидетельствует о низкой функциональности структур щитовидной железы. Следовательно, применение препарата «Хромарцин» в период со 120-го по 150-й день развития кроликов способствует увеличению высоты тиреоцитов в 2,49 раза и уменьшению размера фолликулов в 1,53 раза.



Контроль, окраска гематоксилин-эозином, $\times 100$
Рисунок 6. – Гистологическое строение щитовидной железы кроликов 150-суточного возраста



Опыт, окраска гематоксилин-эозином, $\times 100$
Рисунок 7. – Гистологическое строение щитовидной железы кроликов 150-суточного возраста

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У кроликов 120-суточного возраста щитовидная железа имеет сформированное дефинитивное строение паренхимы и хорошо развитый соединительнотканый каркас. Применение препарата «Хромарцин»

способствует повышению морфофункциональной активности щитовидной железы, что проявляется достоверным изменением высоты тиреоцитов (призматическая форма) и размера фолликулов (мелкие с пенистым коллоидом).

ЛИТЕРАТУРА

1. Балакирев, Н. А. Кролиководство / Н. А. Балакирев, Е. А. Тинаева. – М. : КолосС, 2006. – 232 с.
2. Выращивание и болезни молодняка: практ. пособие / А. И. Ятусевич [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2012. – 816 с.
3. Комлацкий, В. И. Эффективное кролиководство: учеб. пособие / В. И. Комлацкий [и др.]. – Ростов-на-Дону : Феникс, 2014. – 238 с.
4. Кучинский, М. П. Профилактика гипомикроэлементозов у телят препаратом КМП / М. П. Кучинский // Эпизоотология. Иммунобиология. Фармакология. Санитария. – 2004. – № 2. – С. 47–52.
5. Кучинский, М. П. Биоэлементы – фактор здоровья и продуктивности животных: монография / М. П. Кучинский. – Минск : Бизнесофсет, 2007. 372 с.
6. Николаев, С. В. Морфологическая перестройка щитовидной железы и гормональный статус кроликов под влиянием селенсодержащего препарата / С. В. Николаев, Д. Н. Федотов, М. П. Кучинский // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – Витебск : УО ВГАВМ, 2016. – Т. 52, вып. 3. – С. 66–69.
7. Обмен микроэлементов и микроэлементозы животных: монография / А. П. Курдеко [и др.] / Белорусская государственная сельскохозяйственная академия. – Горки, 2009. – 144 с.
8. Организация гистологических исследований, техника изготовления и окраски гистопрепаратов: учеб.-метод. пособие / В. С. Прудников [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2011. – 28 с.
9. Соколова, А. П. Кролиководство: тенденции и перспективы развития / А. П. Соколова, В. Д. Можегова, Г. В. Соколова // Научное обеспечение агропромышленного комплекса. – 2016. – № 5. – С. 760–761.
10. Федотов, Д. Н. Формообразовательные процессы и морфологические изменения периферических эндокринных желез при адаптивно-приспособительных реакциях енотовидной собаки в зоне снятия антропогенной нагрузки и при действии радиоактивного загрязнения / Д. Н. Федотов, И. С. Юрченко // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2019. – № 1 (10). – С. 68–71.
11. Федотов, Д. Н. Морфология и патология щитовидной железы крупного рогатого скота в условиях Республики Беларусь / Д. Н. Федотов, М. П. Кучинский, Г. М. Кучинская // Veterinaria Meditsinasi. – Ташкент, 2019. – № 9 (142). – С. 7–11.
12. Федотов, Д. Н. Общая ветеринарная гистология : учеб.-метод. пособие для студентов по специальностям 1-74 03 02 «Ветеринарная медицина», 1-74 03 04 «Ветеринарная санитария и экспертиза» / Д. Н. Федотов. – Витебск : ВГАВМ, 2019. – 58 с.
13. Якимов, О. А. Особенности микроструктуры щитовидной железы и надпочечников у пушных зверей семейства псовых в онтогенезе и эксперименте : автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук : 16.00.02 / О. А. Якимов. – Екатеринбург : Уральская сельскохозяйственная академия, 2000. – 26 с.

УДК 619.615.9/.37

Струк М.С., старший научный сотрудник

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

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ ЦИНКА И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРЕПАРАТА НА ИХ ОСНОВЕ

Резюме

Описана методика получения наночастиц цинка. Приведены результаты исследований наночастиц цинка с помощью атомно-силовой микроскопии. Представлены результаты проверки препарата на острую токсичность.

Summary

The method of obtaining zinc nanoparticles is described. The results of studies of zinc nanoparticles using atomic force microscopy are presented. The results of testing the drug for acute toxicity are presented.

Поступила в редакцию 21.05.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наноматериалы находят широкое применение в биологии и медицине. Но, к сожалению, далеко не все свойства данных веществ в достаточной степени изучены. На сегодняшний день по номенклатуре ИУРАС (Международного союза теоретической и прикладной химии) наночастицы – это объекты, размеры которых по крайней мере по одному измерению не превышают 100 нм [1].

Эволюционно сложилось, что организм животных развивался в постоянном контакте с природными наночастицами, которые в свою очередь были аналогичны искусственным наночастицам микроэлементов. Это, а также высокий потенциал полезного действия привело к тому, что внимание к наночастицам заметно выросло. В настоящее время они представляют большой научный интерес, поскольку являются, по сути, мостом между сыпучими материалами и атомной или молекулярной структурой. Сыпучие материалы должны иметь постоянные физические свойства независимо от их размеров, но в наномасштабе часто наблюдаются свойства, на которые размеры оказывают влияние.

В связи с этим перспектива применения наночастиц заключается во внедрении

в практику препаратов на их основе, синтезе и безопасном использовании в различных областях сельского хозяйства.

Впрочем, вместе с бесспорными перспективами использования в животноводстве, нанотехнологии имеют и весьма строгие сдерживающие факторы. К ним можно отнести труднопрогнозируемые новые свойства наночастиц и большой риск токсического воздействия на организм животных. Это привело к введению особых мер по регулированию и контролю производства наноматериалов. Между тем искусственные наночастицы микроэлементов могут считаться условно безопасными при выполнении определённых условий их изготовления [2].

Целью наших исследований являлось усовершенствование методики синтеза наночастиц цинка, их морфологическая оценка методом оптической и атомно-силовой микроскопии, а также токсикологическая оценка образцов препарата на их основе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для синтеза наночастиц цинка была усовершенствована методика, сущность которой состояла в очистке коллоидного раствора от побочных продуктов.

Для очистки коллоидного раствора цинка от сопутствующих побочных продуктов нами было опробовано центрифугирование и последующее диспергирование осадка ультразвуком в режиме кавитации. Для полной очистки от примесей операцию центрифугирование-диспергирование повторяли несколько раз.

В качестве дисперсионной среды использовали полиэтиленгликоль со степенью полимеризации 200 (ПЭГ 200).

Навеску кристаллического $Zn(NO_3)_2$ помещали в колбу из кварцевого стекла, куда добавляли дистиллированную воду. К полученному раствору добавляли 20%-ный водный раствор аммиака до выпадения белого осадка. Полученный раствор центрифугировали в течение 15 мин при 4000 об/мин. В результате центрифугирования раствор расслаивался. В осадке были сконцентрированы наночастицы цинка, в прозрачной части – побочные продукты реакции восстановления. Прозрачный слой отделяли от осадка декантацией. К очищенному таким образом осадку добавляли 20 мл ПЭГ 200. На полученную композицию воздействовали ультразвуком в течение 10 мин до образования однородного коллоидного раствора. Операцию центрифугирование-диспергирование повторяли 3 раза.

Управление размерами частиц достигалось варьированием концентрации восстановителя, стабилизирующих добавок, а также добавок, влияющих на вязкость раствора. В качестве стабилизаторов наночастиц нами были использованы растворимые в воде полимеры. В результате взаимодействия с полимерами на частицах металла формировалась оболочка (так называемый структурно-механический барьер), препятствующая контакту металлических частиц друг с другом и, следовательно, их агрегации и седиментации.

В качестве стабилизатора растворов наночастиц нами использовались также бромиды и иодиды натрия либо калия бромид и иодид. В результате этого ионы избирательно собирались на поверхности металлических частиц, приобретая отрица-

тельный потенциал. Одноименно заряженные частицы отталкивались, что предохраняло коллоидный раствор от коагуляции и последующей седиментации.

Для оценки морфологии наночастиц цинка проводили исследования методом оптической и атомно-силовой микроскопии в условиях лаборатории нанопроцессов и технологий ГНУ «Институт тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова Национальной академии наук Беларуси».

Первоначально оценку качества подготовленного образца наночастиц проводили с помощью светового микроскопа Микро200 («Planar», Беларусь). Исследование размерных параметров наночастиц выполняли при помощи атомно-силового микроскопа (АСМ) НТ-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь) в контактном режиме. Использовали кремниевые зонды («Mikro Masch» Co, Эстония) NSC11 с константой жесткости 3 Н/м.

Токсикологическую оценку образцов препарата на основе наночастиц цинка проводили в соответствии с Методическими указаниями по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии (утверждены ГУВ с Государственной ветеринарной и Государственной продовольственной инспекциями Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь 16.03.2007, № 10-1-5/198) [3].

Главная проблема в создании антисептических составов на основе цинка состоит в соблюдении баланса между величиной их активности и продолжительностью антисептического действия. Поскольку коллоидные растворы цинка предназначены для введения животным, они должны удовлетворять еще ряду требований, главными из которых являются биохимическая совместимость с компонентами крови и размер 50–100 нм, а также устойчивость к коагуляции в плазме крови.

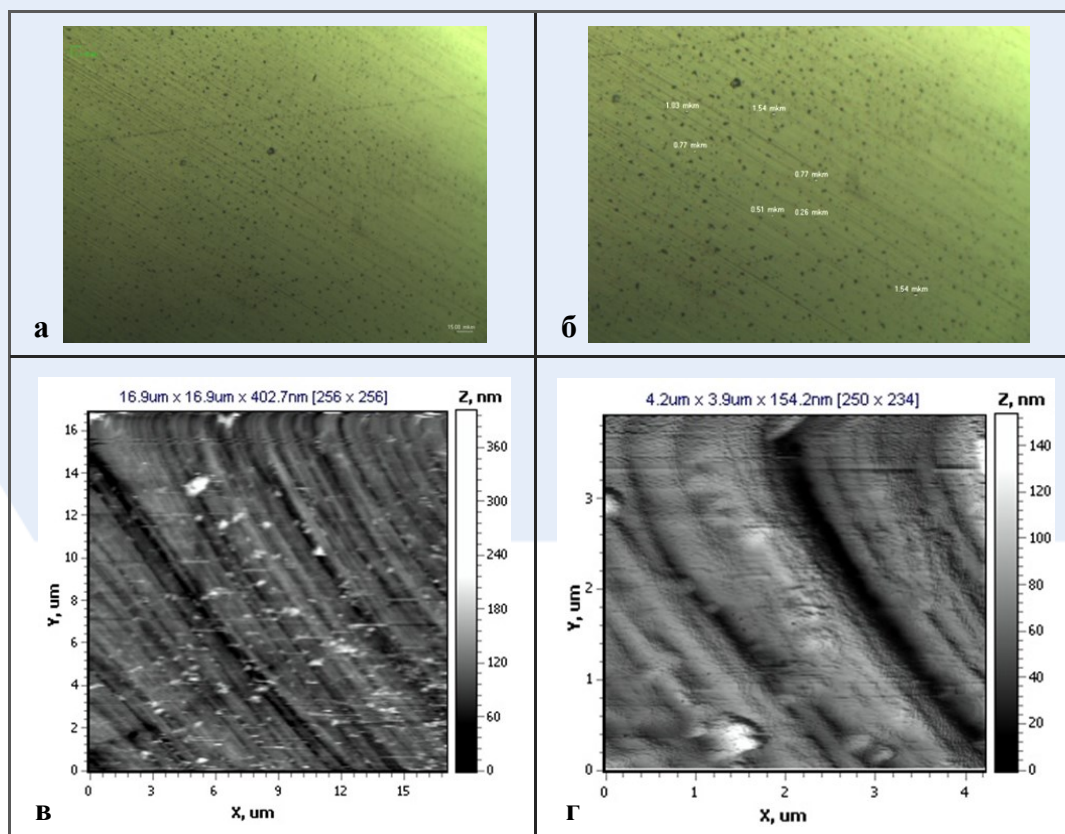
Усовершенствование методики синтеза наночастиц состояла в очистке коллоидного раствора от побочных продуктов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные растворы сохраняются без заметной седиментации в течение двух суток.

Увеличить срок хранения до практически неограниченного времени можно, охладив раствор до температуры ниже 3 °С. Оттаивание раствора не приводит к разрушению коллоидного раствора.

Нами была проведена визуализация поверхности наночастиц цинка для оценки их морфологии с использованием атомно-силовой микроскопии в различных режимах. В связи с высокой жесткостью наночастиц цинка для наблюдения выбрали контактный режим, не предпринимая специальных мер для минимизации силы воздействия острия на поверхность частицы.



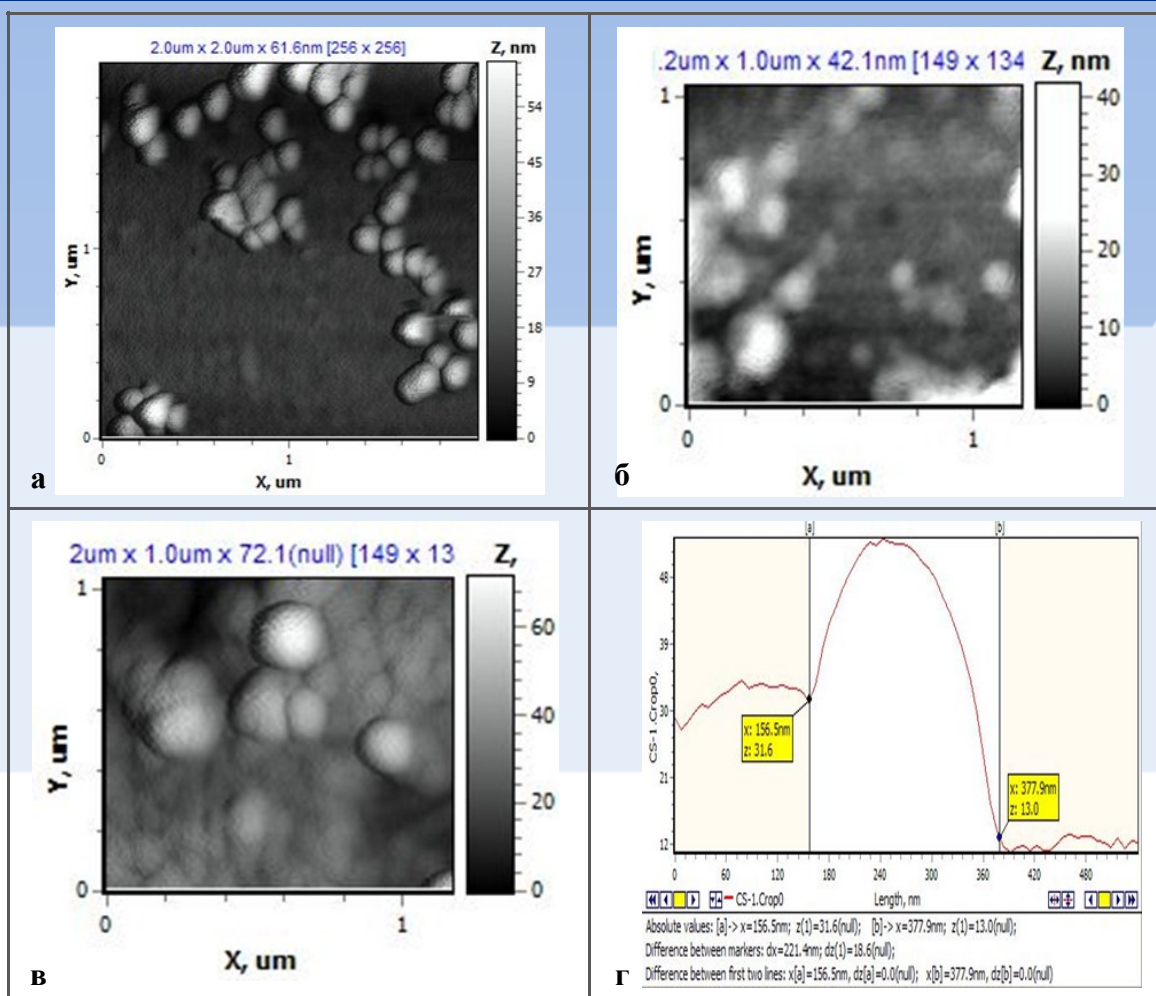
а – оптическое изображение кремневой подложки с частицами цинка, увеличение $\times 400$; б – размеры частиц на кремниевой подложке (оптическая микроскопия); в – топография поверхности, область сканирования $5,1 \times 5,1$ мкм; г – профиль сечения частицы цинка

Рисунок 1. – Оптические и АСМ-изображения наночастиц цинка

На рисунке 1 видно, как из полученных частиц окиси цинка на поверхности кремния образовывалась пленка, кроме того, видны отдельные частицы и крупные агрегаты. Частицы равномерно распределены по поверхности кремниевой подложки. Размеры частиц цинка определяли по профилю сечения поверхности изображения

подложки с наночастицами в обрабатываемой программе после сканирования исследуемого образца. Средний размер частиц составляет для образца $202,6 \pm 10,7 - 230,7 \pm 9,8$ нм.

Исследованы два различных образца препарата на основе наночастиц цинка (рисунки 2 и 3).



а – область сканирования 2×2 мкм; б – область сканирования 1,2×1 мкм;
в – область сканирования 2×1 мкм; г – профиль сечения наночастицы

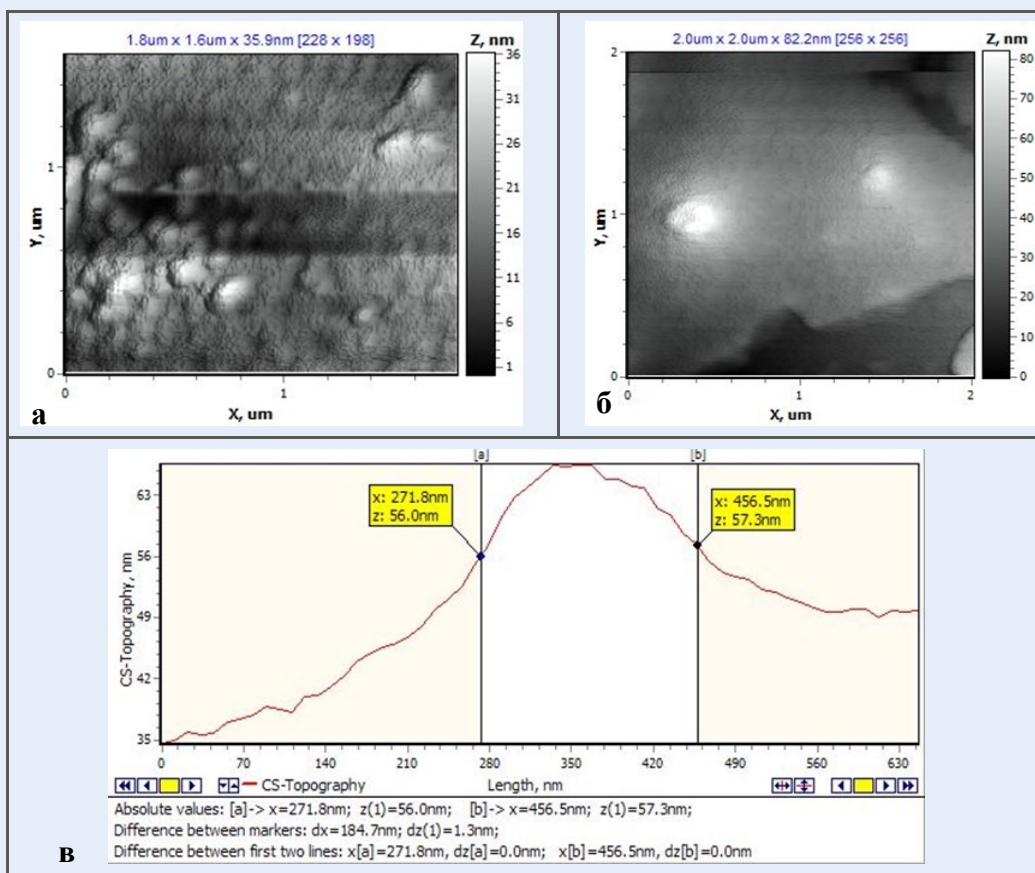
Рисунок 2. – АСМ-изображения препарата на основе наночастиц цинка (серия № 1), входящих в состав разработанного комплексного препарата, и профиль сечения отдельной наночастицы

В образце препарата, представленном на рисунке 2, наночастицы цинка не образуют крупных агрегатов, что свидетельствует о более стабильной системе. Оценка размера наночастиц с помощью АСМ-исследования показала, что он составил в среднем $178,8 \pm 8,4$ нм.

В образце препарата на основе наночастиц цинка, представленном на рисунке 3, образуются крупные агрегаты, в которых можно визуально отличить отдельные наночастицы. Их средний размер составил $175,8 \pm 10,5$ нм.

Таким образом, наночастицы цинка, являющиеся основой образцов препарата, имеют размер от $175,8 \pm 10,5$ нм до $230,7 \pm 9,8$ нм.

Полученные вышеописанным способом наночастицы цинка вошли в состав образцов препарата на их основе. Им была дана токсикологическая оценка. Так, острую внутрижелудочную токсичность изучали на белых мышах обоего пола живой массой 18,0–20,0 г. Было сформировано 6 опытных групп (ОГ) и одна контрольная (КГ), по 10 голов в каждой группе. Раствор образцов препарата на основе наночастиц цинка вводили мышам принудительно в желудок в дозе 0,6 мл. Использовали следующие концентрации: 10000,0; 5000,0; 2500,0; 1250,0; 625; 312,5 мг/кг живой массы. Контрольной группе вводили 0,6 мл физиологического раствора (таблица 1).



а – область сканирования 1,8×1,6 мкм; б – область сканирования 2×2 мкм;
в – профиль сечения наночастицы

Рисунок 3. – АСМ-изображения полученных вторым способом наночастиц цинка, входящих в состав разработанного комплексного препарата, и профиль сечения отдельной наночастицы

Таблица 1. – Схема опыта по определению токсичности наночастиц цинка

Группа животных	Доза образца препарата на голову	Концентрация наночастиц цинка
ОГ № 1	0,6 мл	10,0 г/л (10 мг/мл), или 10000 мг/кг живой массы
ОГ № 2	0,6 мл	5,0 г/л (5 мг/мл), или 5000 мг/кг живой массы
ОГ № 3	0,6 мл	2,5 г/л (2,5 мг/мл), или 2500 мг/кг живой массы
ОГ № 4	0,6 мл	1,25 г/л (1,25 мг/мл), или 1250 мг/кг живой массы
ОГ № 5	0,6 мл	0,625 г/л (0,625 мг/мл), или 625 мг/кг живой массы
ОГ № 6	0,6 мл	0,312 г/л (0,312 мг/мл), или 312 мг/кг живой массы
КГ	0,6 мл	физиологический раствор

Наблюдение за животными вели в течение 14 дней. При этом учитывался внешний вид и поведение, состояние шерстного покрова и видимых слизистых

оболочек, поедаемость корма, подвижность, ритм и частота дыхания, время и характер интоксикации, её тяжесть, обратимость, гибель животных (таблица 2).

Таблица 2. – Влияние наночастиц цинка на сохранность, реакция на месте инъекции при подкожном введении белым мышам

Группа животных	Показатель	Сутки после введения препарата													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ОГ № 1	Количество выживших/павших	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	Реакция на месте инъекции	-	-	-	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
ОГ № 2	Количество выживших/павших	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	Реакция на месте инъекции	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ОГ № 3	Количество выживших/павших	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	Реакция на месте инъекции	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ОГ № 4	Количество выживших/павших	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	Реакция на месте инъекции	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ОГ № 5	Количество выживших/павших	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	Реакция на месте инъекции	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ОГ № 6	Количество выживших/павших	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	Реакция на месте инъекции	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
КГ	Количество выживших/павших	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	Реакция на месте инъекции	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Установлено, что при однократном внутрижелудочном введении образца препарата на основе наночастиц цинка в дозе 10000 мг/кг массы тела и менее признаков интоксикации не было отмечено, после непродолжительного угнетения все живот-

ные активно двигались и динамично дышали. При наблюдении в течение 14 суток гибели животных не происходило, при вскрытии мышей опытной и контрольной групп визуальных изменений не обнаружено.

Таким образом, при внутрижелудочном введении максимальной дозы (10000 мг/кг) образца препарата гибели животных не отмечается. Согласно ГОСТ 12.1.007-76, он относится к IV классу (вещества малоопасные).

Аллергенные свойства (сенсibiliзирующее действие) образца препарата на основе наночастиц цинка изучали

с помощью метода накожных аппликаций. Установлено, что накожные аппликации морским свинкам вызывали образование незначительной эритемы и отека у 2 животных (20 %) через 24 часа на месте нанесения разрешающей дозы (распространенность аллергизации <25 %), которые исчезали у 1 животного через 72 часа (таблица 3).

Таблица 3. – Результаты по изучению аллергенной активности образца препарата на основе наночастиц цинка

Время учета реакции, ч	Количество животных в группе, голов	Количество реагирующих животных, голов	Процент аллергизации
24	10	2	20
48		2	20
72		1	10

Примечание – Во всех случаях $P \geq 0,05$

Таким образом, образец препарата на основе наночастиц цинка не обладает аллергенными свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований нами было установлено, что наночастицы цинка, являющиеся основой препарата, получены путем осаждения оксида цинка солями аммиака, очисткой, ультразвуковой дезинтеграцией и стабилизацией раствором активированной целлюлозы и имеют размер от $175,8 \pm 10,5$ нм до $230,7 \pm 9,8$ нм.

Введение мышам образцов препарата на основе наночастиц цинка в дозах 10 000 мг/кг и менее не оказывает отрицательного воздействия на их организм. Препарат не обладает аллергенными свойствами и согласно ГОСТ 12.1.007-76 относится к IV классу опасности (вещества малоопасные).

Таким образом, наночастицы биоэлементов в настоящее время имеют весьма обширные перспективы использования во многих сферах сельского хозяйства, в частности в животноводстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сравнительное исследование ранозаживляющего действия веществ различной природы / О. А. Богословская [и др.] // *Естественные и технические науки*. – 2007. – № 6(32). – С. 91–99.
2. Мирошников, С. А. Наноматериалы в животноводстве (обзор) / С. А. Мирошников, Е. А. Сизова // *Вестник мясного скотоводства*. – 2017. – № 3(99). – С. 7.
3. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии»: утв. ГУВ с Гос. ветеринарной и Гос. продовольственной инспекциями М-ва сельского хозяйства и продовольствия Респ. Беларусь 16.03.2007, № 10-1-5/198.

УДК 619:576.895.772

Дубина И.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Криворучко Е.Б., кандидат ветеринарных наук, доцент²

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

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

ВЛИЯНИЕ САНИТАРНЫХ СРЕДСТВ НА МИНЕРАЛЬНОЙ ОСНОВЕ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ВЫПЛОДА МУХ

Резюме

Комплекс санитарных средств на минеральной основе оказывает воздействие на все стадии развития мух, приводя к выраженному снижению активности их выплода, что позволяет использовать их на животноводческих объектах при получении биологически чистой продукции.

Summary

The complex effect of mineral-based sanitary products has an impact on all stages of development of flies, leading to a marked decrease in the activity of their brood, which allows them to be used in livestock facilities to obtain biologically pure products.

Поступила в редакцию 05.05.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

В населенных пунктах нашей страны встречается более 80 видов мух [1]. Степень распространения мух и их видовое разнообразие находится в зависимости не только от климатических факторов, но и определяется характером хозяйственной деятельности человека, в первую очередь уровнем развития животноводства, санитарной очистки животноводческих объектов, а также населенных мест.

Одна самка мухи за свою жизнь откладывает до 1000 яиц. Подобрав укромное место, содержащее органический субстрат, оплодотворенная самка откладывает около сотни яиц. По истечении нескольких часов они становятся червеобразными безногими личинками. Этот период развития может варьироваться, в природных условиях личинки из яиц могут выходить за 8–20 часов. По истечении 5–6 дней выросшая личинка мухи, размеры которой увеличиваются в 60–80 раз, начинает темнеть, приобретая буро-коричневый окрас. После этого она переходит в самый пассивный этап развития – стадию куколки, длительность кото-

рого не превышает 14 дней. Внутри куколки завершается процесс метаморфоза: происходит распад тканей личинки и формирование всех жизненно важных органов имагинальной особи [2, 3].

Биологические и экологические особенности мух определяют их эпидемиологическое значение. Активно размножаясь и перелетая с выделений животных (фекалии, мокрота и др.) на предметы ухода, корма, попадая в молоко, воду, мухи могут обсеменять их патогенными микроорганизмами, а также распространять инвазионное начало гельминтов и простейших.

Таким образом, важным вопросом профилактики ряда инвазионных и инфекционных заболеваний животных, а также факультативно-трансмиссивных болезней человека является максимальное снижение численности зоофильных и синантропных мух. Предотвращение возможности развития мух, осуществляемое лишь при условии проведения комплексных мероприятий по санитарной очистке животноводческих помещений, населенных мест, а также специальных истребительных работ, представ-

ляет по существу санитарно-эпидемиологическую задачу оздоровления окружающей среды, в первую очередь животноводческих помещений.

В последние десятилетия в республике большое внимание уделяется замене пестицидов органического синтеза, представляющих опасность для окружающей среды, веществами природного происхождения.

Мы обратили внимание на природные соединения минерального происхождения, используемые для улучшения санитарно-зоогигиенических условий содержания сельскохозяйственных животных, не содержащих в своем составе компонентов, способных оказать негативное воздействие на окружающую среду (хлор, аммонийные соединения, формалин и др.).

Целью настоящей работы являлось экспериментальное изучение возможности использования биоразлагаемых санитарно-зоогигиенических средств для снижения интенсивности выплода мух на животноводческих объектах и в местах скопления коммунальных отходов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в лабораторных условиях. По 18 личинок мух, полученных лабораторно, поместили в 5 емкостей с различными биоразлагаемыми материалами, используемыми в качестве подстилочного материала при выращивании сельскохозяйственных животных и птиц. В качестве основного подстилочного материала – контроля – нами были выбраны древесные опилки. Опилки мы смешали в равных долях (1:1) с биосубстратом, насыщенным природным минералом трепелом, санитарно-зоогигиеническим средством «Санитар» производства Республики Беларусь, также мы смешали опилки с биосубстратом и санитарно-зоогигиеническим средством «Санитар» в равных долях.

Трепел – природный минерал на основе эффективных в сорбционном и ионообменном отношении структур – монтмориллонита и клиноптилолита.

«Санитар» – санитарно-зоогигиеническое средство на основе трепела с внесе-

нием стабилизированной наноразмерной меди.

Емкости с личинками мух были размещены в помещении при постоянной температуре 14–16 °С и влажности 72–78 %. Температура и влажность контролировались 3 раза в сутки с помощью цифрового термогигрометра ПИ-2. В течение всего периода морфогенеза мух – развитие от личинок до имагинальных особей – осуществлялось ежедневное наблюдение за состоянием и изменением морфологических характеристик стадий их развития. Учитывали жизнеспособность и активность личинок, время их окукливания, срок выхода имагинальных особей из куколок, количество вышедших имагинальных особей, состояние имагинальных особей: их активность (подвижность, движение лапок), сохранение жизнеспособности в течение 5 суток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Наблюдение за личинками мух (рисунок 1), размещенными в емкостях с подстилочным материалом, показало, что в разных материалах процесс окукливания личинок существенно отличается (таблица 1).



Рисунок 1. – Личинки мух в опилках

Во всех видах используемых подстилочных материалов образование пупария на личинках мух началось в течение 24 часов их активной жизнедеятельности, однако в подстилочном материале, содержащем санитарные компоненты (трепел, санитар), пупарием покрылось в 1,7–3 раза больше личинок, чем в контрольных материалах – опилках, опилках с биосубстратом (таблица 1).

Таблица 1. – Сроки образования пупария у личинок мух в различных подстилочных материалах

Подстилочный материал	Количество личинок, покрывшихся пупарием в течение			
	24–36 ч	36–48 ч	48–62 ч	56–72 ч
Опилки	3	5	5	5
Опилки в смеси с биосубстратом	3	3	4	8
Опилки в смеси с трепелом	5	7	6	–
Опилки в смеси со средством «Санитар»	9	9	–	–
Опилки в смеси с биосубстратом и средством «Санитар»	4	6	8	–

Обращает на себя внимание высокая интенсивность окукливания личинок в подстилочном материале, содержащем санитарные компоненты (таблица 2). Так, в опилках, смешанных с санитарно-зоогигиеническим средством «Санитар», окукливание всех личинок (100,0 %) произошло не позднее 48 часов, тогда как в чистых опилках за это время окуклилось только

44,4 % личинок. Добавление трепела с размером частиц 0,5–2,0 мм в опилки также способствовало более высокой интенсивности окукливания личинок мух (таблица 2). В опилках, смешанных с трепелом, в течение 48 часов окуклилось 66,7 % личинок, в течение 62 часов – 100,0 % личинок, что на 22,3–27,8 % больше, чем в чистых опилках.

Таблица 2. – Интенсивность окукливания личинок мух в различных подстилочных материалах

Подстилочный материал	Процент окуклившихся личинок в течение			
	24–36 ч	36–48 ч	48–62 ч	56–72 ч
Опилки	16,7	44,4	72,2	100,0
Опилки в смеси с биосубстратом	16,7	33,3	55,5	100,0
Опилки в смеси с трепелом	27,8	66,7	100,0	–
Опилки в смеси со средством «Санитар»	50,0	100,0	–	–
Опилки в смеси с биосубстратом и средством «Санитар»	22,2	55,5	100,0	–



Рисунок 2. – Переход личинок, находящихся в опилках, в куколок мух



Рисунок 3. – Окукливание личинок, находящихся в опилках, смешанных с трепелом

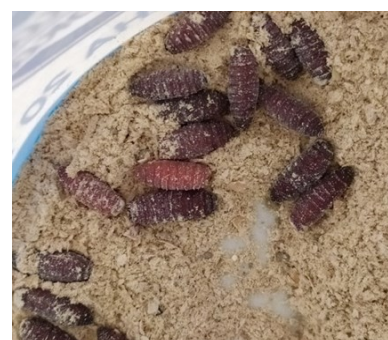


Рисунок 4. – Окукливание личинок, находящихся в опилках, смешанных с санитарно-зоогигиеническим средством «Санитар»

Морфологически все окуклившиеся личинки как в контрольных подстилочных материалах, так и в смешанных с санитарны-

ми материалами идентичны (рисунки 2, 3, 4). Таким образом, можно предположить, что внесение санитарных средств в под-

стилочный материал создает условия, некомфортные для личинок, что вынуждает их, окукливаясь, переходить из активной формы в пассивную в 2-3 раза интенсивней, чем в чистых опилках и опилках, загрязненных биосубстратом.

Создание некомфортных условий, дефицитных по влаге, в подстилочном материале не только повышало интенсивность окукливания, но и выражено увеличило сроки выхода имаго из куколок (таблица 3). Во всех подстилочных материалах первые имагинальные особи мух отмечены на 11 день после полного окуклива-

ния, но в опилках и опилках, смешанных с биосубстратом, количество вышедших имаго в 2 раза превышало количество имаго в опилках, смешанных с санитарно-зоогигиеническим средством (таблица 3). К 13-му дню в опилках и опилках с биосубстратом имаго вышли из всех куколок (рисунок 5). В опилках, содержащих санитарные средства, в это же время вышло в 2 раза меньше имаго. Необходимо отметить, что в опилках, содержащих санитарно-зоогигиеническое средство «Санитар», из 2 куколок процесс выхода имаго начался, но не завершился (рисунки 6, 7).

Таблица 3. – Сроки и интенсивность выхода имаго из куколок

Подстилочный материал	Количество вышедших имаго на день/интенсивность выхода имаго в %					
	11	12	13	14	15	16
Опилки	4/22,2	10/55,5	18/100,0	–	–	–
Опилки в смеси с биосубстратом	3/16,7	10/55,5	18/100,0	–	–	–
Опилки в смеси с трепелом	1/5,5	2/11,1	8/44,4	14/77,8	18/100,0	–
Опилки в смеси со средством «Санитар»	2/11,1	4/22,2	9/50,0	12/66,7	14/77,8	16/88,9
Опилки в смеси с биосубстратом и средством «Санитар»	1/5,5	7/38,9	13/72,2	15/83,3	18/100,0	–



Рисунок 5. – Выход имаго мух из куколок в опилках



Рисунок 6. – Выход имаго мух в подстилочном материале с добавлением трепела



Рисунок 7. – Незавершившийся процесс выхода имаго из куколки в подстилочном материале, смешанном со средством «Санитар»

Необходимо обратить внимание на тот факт, что в контрольных материалах (опилках, опилках с биосубстратом) наблюдалась высокая интенсивность выхода имаго: за три дня из куколок вышло 100 % имаго, при этом 77,8–83,3 % имаго вышли всего за 2 дня (таблица 3). В то же время выход имаго из подстилочного материала, содержащего санитарные средства, оказался растянутым по времени до 5–6 дней, а интенсивность выхода имаго в каждый последующий день снижалась практически в 1,5–2 раза (27,8 %, 16,7 %, 11,1 %, 11,1 %), таблица 3.

Влагопоглощающая активность санитарно-зоогигиенического средства «Санитар» находится на уровне 140–200 %, трепела – 50–80 %. Таким образом, санитарные средства, внесенные в подстилочный материал, активно поглощают свободную воду, создавая среду с минимальным содержанием влаги.

При средней массе имаго, полученных в контрольном подстилочном материале, равной $15,47 \pm 0,66$ мг, имаго, полученные в подстилочном материале с добавлением санитарных средств, по массе не превышали 11,0 мг ($9,45 \pm 1,55$). Имаго, развивающиеся в среде, дефицитной по влаге, формируются ослабленными, с недоста-

точной функциональной активностью. Обезвоженные имаго не могут активно выходить из куколок (рисунок 7), что растягивает процесс их выхода и снижает его интенсивность (таблица 3).

Имагинальные особи мух в различных подстилочных материалах ведут себя не идентично. Имаго, полученные на контрольных материалах, очень активные, летают по всему свободному пространству емкости, в которой находятся, обтираются лапками, осматривают (изучают, опробуют) стенки емкости. При исследовании емкости, в которой содержались имагинальные стадии мух в ультрафиолетовом освещении, в контрольных емкостях хорошо заметно загрязнение стенок продуктами жизнедеятельности мух (рисунок 8). В то же время на стенках емкости, в которых имаго содержались на подстилочном материале, смешанном со средством «Санитар», при обследовании в ультрафиолетовом свете следов жизнедеятельности имагинальных стадий не отмечается (рисунок 9).

Наблюдение за имаго, выходящими в подстилочном материале с добавлением санитарных средств, показывает их низкую активность и гибель на ранних сроках жизнедеятельности (таблица 4).



Рисунок 8. – Стенки контрольных емкостей в ультрафиолетовом свете



Рисунок 9. – Стенки емкости, в которой выращивались мухи с добавлением средства «Санитар», в ультрафиолетовом свете

Таблица 4. – Активность и жизнеспособность имаго мух

Подстилочный материал	Процент жизнеспособных имагинальных форм от вышедших из куколок					
	12 дн.	13 дн.	14 дн.	15 дн.	16 дн.	19 дн.
Опилки	высокая активность, 100	высокая активность, 100	высокая активность, 100	высокая активность, 100	высокая активность, 100	умеренная активность, 83,3
Опилки в смеси с биосубстратом	высокая активность, 100	высокая активность, 100	высокая активность, 100	высокая активность, 100	высокая активность, 100	умеренная активность, 93,7
Опилки в смеси с трепелом	пассивные, 100	пассивные, 100	пассивные, 75,0	пассивные, 71,42	пассивные, 61,11	крайне пассивные, 27,8
Опилки в смеси со средством «Санитар»	крайне пассивные, имаго погибает спустя 3–5 ч после выхода из куколки					
Опилки в смеси с биосубстратом и средством «Санитар»	умеренная активность, 100	умеренная активность, 85,7	пассивные, 76,92	пассивные, 66,70	пассивные, 44,4	крайне пассивные, 11,1

Все имаго, вышедшие из куколок в подстилочном материале, содержащем санитарно-зоогигиеническое средство «Санитар», теряли жизнеспособность в течение 3–5 часов с момента выхода из куколок (рисунок 10).



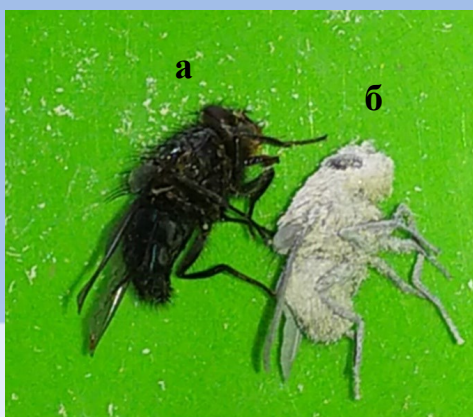
Рисунок 10. – Погибшие имаго в подстилочном материале, содержащем санитарно-зоогигиеническое средство «Санитар»

Осмотр погибших особей из подстилочного материала с добавлением средства «Санитар» показал, что все они покрыты налетом (рисунок 10, 11 б). У имаго, полученных на контрольных подстилочных материалах (опилки, опилки с биосубстратом), такого налета не выявлено (рисунок 11 а, 15). Изучение погибших особей в ультрафиолетовом свете показывает, что дан-

ный налет не дает свечения (рисунок 12), соответственно, не содержит органических продуктов, то есть налет полностью состоит из минеральных веществ санитарно-зоогигиенического средства «Санитар».

Тело движущегося насекомого в результате трения о субстрат и воздух приобретает электрический заряд. Заряд тела насекомого взаимодействует с зарядами окружающих предметов. Возникающие механические силы прямо пропорциональны произведению взаимодействующих зарядов. Эти силы приводят к налипанию на тело мелких заряженных частиц [4].

Санитарно-зоогигиеническое средство «Санитар» в своем составе содержит стабилизированную наноразмерную медь в виде монослойного покрытия на поверхности наночастиц минерального сорбента. Ионы меди имеют электрический заряд, притягивающийся к поверхности тела мух, что и создает минеральный налет. Мы предполагаем, что налипание на поверхности имагинальных стадий мух средства «Санитар» затрудняет их движения, что и приводит к низкой активности мух на подстилочном материале с добавлением указанного санитарно-зоогигиенического средства.



а – выращенные на опилках;
б – выращенные на опилках с добавлением средства «Санитар»

Рисунок 11. – Имаго мух



а – выращенные на опилках;
б – выращенные на опилках с добавлением средства «Санитар»

Рисунок 12. – Имаго мух в ультрафиолете

Визуальная оценка имагинальных форм мух, полученных на подстилочном материале с добавлением санитарных средств, с мухами, полученными на чистых опилках, показывает наличие налета на поверхности тела как у мух на подстилочном материале, смешанном со средством «Санитар», так и на подстилочном материале, смешанном с трепелом (рисунки 13, 14, 15). Сопоставляя степень образовавшегося минерального налета на имагинальных формах мух, видим, что у имаго, полученных на опилках, смешанных с трепелом, налет значительно меньше, чем налет на имаго, полученных на опилках, смешанных с санитарно-зоогигиеническим средством «Са-

нитар» (рисунки 13, 14), чем, вероятно, и объясняется более высокая активность имаго, находящихся в опилках с трепелом (мухи передвигаются, способны летать), таблица 4.

Наружный покров мух – кутикула – в основном состоит из органических веществ, а неорганические соединения составляют менее 1 % сухой массы. Наиболее важными органическими соединениями кутикулы являются хитин, белки, липиды и фенолы. Хитин составляет от 25 до 60 % сухого вещества кутикулы. Совместно с белками он формирует основную часть наружного скелета насекомых [5].



Рисунок 13. – Налет на имагинальной форме мухи, полученной на опилках с добавлением средства «Санитар», ×4



Рисунок 14. – Налет на имагинальной форме мухи, полученной на опилках с добавлением трепела, ×4



Рисунок 15. – Имагинальная форма мухи, полученная на чистых опилках, без добавления санитарных средств, ×4

Слои кутикулы снизу доверху пронизаны многочисленными поровыми каналами, которые начинаются от эпидермиса и обеспечивают связь с наружной поверхностью покрова. Внутри поровых канальцев проходят нитевидные отростки эпидермальных клеток. Поровые каналы участвуют в синтезе и транспортировании веществ, формирующих эпикутикулу. Эпикутикула – наружный, самый тонкий слой кутикулы, не содержащий хитина. Ее главную часть составляет кутикулин – вещество, включающее жиро- и воскоподобные соединения. Восковой слой играет роль барьера, ограничивающего транспирацию и защищающего насекомых от потерь воды [6].

Мы предполагаем, что в результате механического воздействия налипшего на поверхность тела имагинальных форм мух минерального порошка (как средства «Санитар», так и трепела) нарушается целостность защитного воскового слоя насекомого, способствуя развитию их обезвоживания. Сопоставляя массу имаго мух, вышедших в течение 24–36 часов в чистых опилках ($15,47 \pm 0,66$ мг), с массой имаго, полученных в опилках с добавлением трепела ($13,35 \pm 1,35$ мг), видим, что она в среднем на 2,12 мг ниже. Масса же имаго мух, находящихся в опилках, смешанных с трепелом, в течение 72 часов уменьшилась в среднем еще на 2,75 мг, с этого же перио-

да отмечается гибель 30,0 % имагинальных форм мух (таблица 4).

Кроме того, мы полагаем, что ионы меди, содержащиеся в санитарно-зоогигиеническом средстве «Санитар», прилипая к поверхности кутикулы, растворяются в ее восковом слое и активно проникают в тело имагинальных форм мух. Ионы меди, поступившие в достаточно высокой концентрации в клетки, взаимодействуют с различными ферментами, содержащими имидазольные, карбоксильные и тиольные группы, и подавляют их активность. При этом ингибируются процессы, которые входят в дыхательный цикл, в частности процесс превращения пировиноградной кислоты в ацетилфермент А. Также они вызывают неспецифическую денатурацию белков.

В совокупности обезвоживание, денатурация белков, а также нарушения метаболических процессов приводят к гибели имагинальных особей мух в подстилочном материале, содержащем санитарно-зоогигиеническое средство «Санитар», в очень короткие сроки (таблица 4).

Кроме того, медьсодержащие соединения также снижают воспроизводительную функцию. Гонадотоксическое действие соединений меди в малых дозах связано с изменением метаболических процессов в половых клетках, вследствие чего в

них развиваются аномалии хромосомного набора. Такие клетки вскоре после оплодотворения гибнут. Это позволяет предположить, что имагинальные особи мух, выжившие в подстилочном материале, содержащем санитарно-зоогигиеническое средство «Санитар», будут иметь низкую воспроизводительную способность, что снизит количество мух на животноводческих объектах.

ВЫВОДЫ

Внесение санитарных средств на минеральной основе (санитарно-зоогигиеническое средство «Санитар», трепел) в подстилочный материал создает условия, неблагоприятные для активной жизнедеятельности личинок мух, что вынуждает их окукливаться быстрее (в 1,5-2 раза), чем в чистых опилках и опилках, смешанных с биосубстратом.

Санитарно-зоогигиеническое средство «Санитар», внесенное в подстилочный материал, приводит к развитию окуклившихся форм в среде с дефицитом влаги, что способствует формированию имаго со сниженной массой – $9,45 \pm 1,55$ мг (контроль – $15,47 \pm 0,66$ мг), низкой функциональной активностью, не способных активно выйти из куколок.

Санитарно-зоогигиеническое средство «Санитар» благодаря электрическому заряду ионов меди обладает способностью активно прилипать к поверхности тела имагинальных форм мух, полностью покрывая их, делая невозможным активное передвижение имаго. Налипание на поверхности тела имагинальных форм мух минеральных частиц трепела и санитарно-зоогигиенического средства «Санитар» оказывает механическое воздействие на защитно-восковой слой кутикулы, приводя к его разрушению, что способствует активному обезвоживанию насекомых и их гибели.

Входящие в состав санитарно-зоогигиенического средства «Санитар» ионы меди оказывают комплексное воздействие на мух, нарушая метаболические процессы, происходящие в их организме, что приводит к их гибели в течение 3–5 часов после выхода из куколок.

Санитарные средства на минеральной основе оказывают воздействие на все стадии развития мух, приводя к выраженному снижению активности их выльода, что позволяет использовать данные средства на животноводческих объектах при получении биологически чистой продукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фауна Беларуси [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://faunarb.info/animals/semeystvo-nastoyashchie-muhi-muscidae>. – Дата доступа: 20.04.2020.
2. Строение мухи [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://apest.ru/muhi/o-muhah/stroenie-muhi>. – Дата доступа: 20.04.2020.
3. Арахноэнтомозные болезни животных: монография / А.И. Ятусевич [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2019. – 304 с.
4. Чернышев, В. Б. Экология насекомых / В. Б. Чернышев. – М. : Изд-во МГУ, 1996. – 304 с.
5. Внутреннее строение насекомых [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://agroflora.ru/vnutrennee-stroenie-nasekomyx>. – Дата доступа: 22.04.2020.
6. Где обитают мухи. Строение мухи [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://sds-us.ru/gde-obitayut-muhi-stroenie-muhi.html>. – Дата доступа: 20.04.2020.