

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**

Борисовец Д.С., Журавлева Е.С., Зуйкевич Т.А., Красочко П.А., Яромчик Я.П., Морозов А.М., Курбат И.А. ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПРЭСНОВОДНЫХ ВОДОЕМОВ 3

Ломако Ю.В., Ананчиков М.А., Красникова Е.Л., Новикова О.Н. ХЛАМИДИИ И АССОЦИИРОВАННЫЕ С ХЛАМИДИЯМИ ИНФЕКЦИИ У ТЕЛЯТ 13

Дубин Р.А., Германенко М.Н. ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНЫЕ АССОЦИИАЦИИ У ТЕЛЯТ ПРИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ 21

ИММУНОБИОЛОГИЯ

Згировская А.А., Борисовец Д.С., Герасименко В.И., Зуйкевич Т.А. ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЯЕМЫХ ИНАКТИВИРОВАННЫХ И ЖИВЫХ ВАКЦИН И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПУТЕЙ ЕЕ ПОВЫШЕНИЯ 30

Насонов И.В., Кныш Н.В., Зинина Н.В., Гуринович О.Л., Захарик Н.В. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ ВАКЦИН ПРОТИВ ГЕМОФИЛЕЗА ПТИЦ В УСЛОВИЯХ ПРОИЗВОДСТВА 39

Борисовец Д.С., Насонов И.В., Зуйкевич Т.А., Красочко П.А., Журавлева Е.С., Кныш Н.В., Зинина Н.В., Згировская А.А., Яромчик Я.П., Бучукури Д.В., Якубовский С.М., Осипенко А.Е. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ АДЬЮВАНТОВ И ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ ДЛЯ ГИПЕРИММУНИЗАЦИИ КУР-НЕСУШЕК 43

Анишквичюс М., Малашко В.В. ВЛИЯНИЕ МЕЖПОЗВОНОЧНЫХ ГРЫЖ НА СТРУКТУРУ НЕЙРОНОВ СПИНОМОЗГОВЫХ ГАНГЛИЕВ СОБАК 48

Латвис В., Малашко В.В. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА СОБАК ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ 55

Борисовец Д.С., Насонов И.В., Зуйкевич Т.А., Красочко П.А., Журавлева Е.С., Кныш Н.В., Зинина Н.В., Яромчик Я.П., Бучукури Д.В., Якубовский С.М., Осипенко А.Е. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА АНТИГЕНОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЖЕЛТОЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ ГИПЕРИММУНИЗАЦИИ КУР-НЕСУШЕК 63

ФАРМАКОЛОГИЯ

Мясова Т.Я. ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОГО АНТГЕЛЬМИНТИКА «ТРИКЛАМИЗОЛ» НА НЕКОТОРЫЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОРГАНИЗМА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ 69

Кузьминский И.И., Степанова Е.А., Лиленко А.В. ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТА «МЕТРАФАРМ» 76

САНИТАРИЯ

Каменская Т.Н., Лукьянчик С.А., Кривенко Л.Л., Хендогина О.В. АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ И ВЛИЯНИЕ СРЕДСТВА ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО «АЛЬДЕЧАС» НА ПРОДУКТЫ УБОЯ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЕГО ПРИМЕНЕНИИ В РАБОЧИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ 82

CONTENTS**EPIZOOTOLOGY**

Barysavets D.S., Zhurauleva E.S., Zuykevich T.A., Krasochko P.A., Yaromchik Ya.P., Marozau A.M., Kurbat I.A. OPTIMIZATION OF MEDIUM COMPOSITION FOR CULTIVATION OF BACTERIA STRAINS OF *BACILLUS* GENUS ISOLATED FROM BOTTOM SEDIMENTS OF FRESH WATER RESERVOIRS 3

Lomako Yu.V., Ananchikov M.A., Krasnikova E.L., Novikova O.N. CHLAMIDIA AND CHLAMIDIA-ASSOCIATED INFECTIONS IN CALFS 13

Dubin R.A., Germanenko M.N. VIRAL-BACTERIAL ASSOCIATIONS IN CALFS WITH GASTROINTESTINAL DISEASES 21

IMMUNOBIOLOGY

Zgirouskaya A.A., Barysavets D.S., Gerasimenko V.I., Zuykevich T.A. STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF USED INACTIVATED AND LIVE VACCINES AND DETERMINATION OF WAYS OF ITS INCREASE 30

Nasonov I.V., Knysh N.V., Zinina N.V., Gurinovich O.L., Zakharik N.V. COMPARATIVE ASSESSMENT OF IMMUNOGENICITY OF VACCINES AGAINST BIRD HEMOPHILOSIS IN PRODUCTION CONDITIONS 39

Barysavets D.S., Nasonov I.V., Zuykevich T.A., Krasochko P.A., Zhurauleva E.S., Knysh N.V., Zinina N.V., Zgirouskaya A.A., Yaromchik Ya.P., Buchukuri D.V., Yakubousky S.M., Osipenko A.E. DETERMINATION OF EFFECTIVE ADJUVANTS AND IMMUNOSTIMULATORS FOR HYPERIMMUNIZATION OF CHICKENS 43

Anishkevichyus M., Malashko V.V. INFLUENCE OF INTER-VERTEBRAL HERNIAS ON THE STRUCTURE OF NEURONS OF SPINAL GANGLIES OF DOGS 48

Latvis V., Malashko V.V. MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE BRAIN STRUCTURES OF DOGS DURING THE ONCOLOGICAL PROCESS 55

Barysavets D.S., Nasonov I.V., Zuykevich T.A., Krasochko P.A., Zhurauleva E.S., Knysh N.V., Zinina N.V., Yaromchik Ya.P., Buchukuri D.V., Yakubousky S.M., Osipenko A.E. DETERMINATION OF THE OPTIMAL COMPOSITION OF ANTIGENS FOR OBTAINING OF YOLK IMMUNOGLOBULINS IN HYPERIMMUNIZATION OF NESTING CHICKENS 63

FARMACOLOGY

Myastsova T.Ya. INFLUENCE OF THE COMPLEX ANTHELMINTIC «TRIKLAMIZOL» ON SOME HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INDICATORS OF THE ORGANISM OF LABORATORY ANIMALS 69

Kuzminski I.I., Stepanova E.A., Lilenko A.V. PHARMACOTOXICOLOGICAL PROFILE OF THE DRUG «METRAFARM» 76

SANITATION

Kamenskaya T.N., Lukyanchik S.A., Krivenok L.L., Khendogina O.V. ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND INFLUENCE OF THE DISINFECTING AGENT «ALDECHAS» ON ANIMAL SLUTCHING PRODUCTS WHEN ITS APPLICATION IN WORKING CONCENTRATIONS 82

Компьютерная верстка: ЛУКЬЯНОВА И.А.

Подписано в печать 14.12.2020 г.

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

Уч.-изд. л. , усл. печ. л. 10,23. Тираж 100 экз. Заказ №

220063, 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 619:579.86

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
 Журавлева Е.С., кандидат ветеринарных наук¹
 Зуйкевич Т.А., кандидат ветеринарных наук¹
 Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор²
 Яромчик Я.П., кандидат ветеринарных наук, доцент²
 Морозов А.М., младший научный сотрудник¹
 Курбат И.А., младший научный сотрудник¹

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

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

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПРЕСНОВОДНЫХ ВОДОЕМОВ

Резюме

В статье показано влияние физических (рН, температура, аэрация) и химических (содержание сахаров, источники азотного и фосфорного питания) факторов на показатель роста штаммов рода *Bacillus* в условиях твердофазного и погруженного культивирования.

Определены оптимальные условия: температура роста *Bacillus subtilis* 42 °С, рН 6,7–7,3; *Bacillus licheniformis* – 37 °С, рН 6,8–7,2; *Bacillus megaterium* – 36–39 °С, рН 6,4–6,9; при погруженном культивировании – аэрация с интенсивностью 150 об/мин; концентрация мелассы (для всех исследованных штаммов рода *Bacillus*) – 30 г/л; сульфата аммония – 2,5 г/л; солей $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$ – 30 г/л.

На основании проведенных исследований создана оптимизированная питательная среда, использование которой позволяет увеличить скорость накопления бацилл до 85,7 % в сравнении с исходной средой.

Summary

The article shows the influence of physical (pH, temperature, aeration) and chemical (sugar content, sources of nitrogen and phosphorus nutrition) factors on the growth rate of strains of the genus *Bacillus* under conditions of solid-phase and submerged cultivation.

The optimal conditions have been determined: temperature of *Bacillus subtilis* growth 42 °C, pH 6,7–7,3; *Bacillus licheniformis* – 37 °C, pH 6,8–7,2; *Bacillus megaterium* 36–39 °C, pH 6,4–6,9; with submerged cultivation – aeration with an intensity of 150 rpm; molasses concentration (for all studied strains of the genus *Bacillus*) 30 g/l; ammonium sulfate – 2,5 g/l; salts $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$ – 30 g/l.

On the basis of the studies carried out, an optimized nutrient medium was created, the use of which makes it possible to increase the accumulation rate of bacilli up to 85,7 % in comparison with the initial medium.

Поступила в редакцию 22.10.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

Рынок биотехнологий (по наиболее объективному критерию – объему производства биотехнологических товаров) продолжает стремительно расти. Ежегодный рост мирового рынка биотехнологий составляет 7–9 процентов. Предполагается, что к 2025 году этот показатель достигнет уровня в 2 трлн долларов США [7, 8].

Традиционными производителями и потребителями продукции биотехнологии являются преимущественно высокоразвитые страны: США, Канада, Япония и госу-

дарства ЕС. В течение текущего десятилетия масштабные программы развития по всему спектру биотехнологий также стали реализовывать Китай, Индия и Бразилия. Приоритетное развитие получили медицина, сельское хозяйство, пищевая промышленность, химическое производство и другие [1].

Микроорганизмы – бактерии, дрожжи и микроскопические мицелиальные грибы – основные промышленные объекты биотехнологии. Они имеют высокую скорость роста, способны расти на дешевых

питательных средах и обладают пластичным метаболизмом, протекающим с высокой скоростью и эффективностью [2, 3, 6].

В настоящее время в развитых странах разработана и широко используется стратегия селекционной работы с микроорганизмами, которая заключается в поиске природных форм, обладающих какими-либо полезными для человека свойствами (синтез ценных соединений, высокая скорость роста, способность к усвоению дешевых и доступных субстратов и т. д.), а также дальнейшем их улучшении [7].

Современные тенденции развития селекции продуцентов – конструирование промышленных штаммов с полезными заданными свойствами при использовании новейших достижений фундаментальных отраслей биологии в сочетании с приемами классической селекции.

Кроме производства биологически активных веществ, клетки микроорганизмов также используются и для изготовления пробиотических препаратов.

В мире производится более 90 живых пробиотических продуктов коммерческого назначения, в том числе свыше 53 в Японии и более 45 в Европе. В последние годы произошел поворот от использования пробиотиков преимущественно с профилактической целью к активному их использованию в лечении инфекций желудочно-кишечного тракта, аллергических заболеваний, бактериальных и вирусных инфекций (Лахтин В.М. с соавт., 2008) [4, 7].

Способность спорообразующих бактерий оказывать пробиотическое действие привела к разработкам на их основе препаратов, отнесенных к поколению так называемых самоэлиминирующихся антагонистов. В итоге на сегодняшний день в мире создано более полусотни таких препаратов, которые полностью или частично составлены на основе спороформирующих бактерий. Штаммы бацилл для лечебного питания животных включают *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. clausii*, *B. polyfermentans* и *B. cereus* и др. (N.T. Hoa et al., 2000; K.H. Lee et al., 2001) [1, 4, 7].

В целом по уровню биотехнологиче-

ских исследований и разработок, их внедрения в промышленное производство Республика Беларусь отстает от развитых зарубежных стран. Недостаточны объемы производства биотехнологической продукции, которая закупается за рубежом. Отечественные биопрепараты значительно дешевле иностранных, однако более 70 процентов потребностей республики в них удовлетворяются за счет дорогостоящего импорта. Рынок биотехнологической продукции Республики Беларусь составляет около 400 млн долларов США, из них продукция отечественного производства составляет менее 20 процентов. Ежегодно закупается за рубежом более 200 наименований средств защиты растений, пробиотиков, премиксов, кормовых аминокислот, консервантов кормов, ветеринарных вакцин на общую сумму около 300 млн долларов США. Неблагоприятная ситуация сложилась и в области микробиологической промышленности ввиду того, что выпускаемая продукция в ряде случаев малорентабельна из-за низкой активности исходных микробиологических штаммов [2, 5].

Сложившаяся ситуация создает предпосылки для выделения природных форм микроорганизмов рода *Bacillus*, обладающих полезными свойствами (синтез ценных биологически активных соединений, высокая скорость роста), их селекции и дальнейшего улучшения, а также конструирования на их основе промышленных штаммов с заданными свойствами.

Цель работы – оптимизировать состав среды культивирования для получения максимального выхода биомассы штаммов рода *Bacillus* и биологически активных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», виварии института.

С целью изучения влияния физических факторов на показатель роста штаммов рода *Bacillus* в условиях твердофазного и погруженного культивирования была ис-

следована зависимость роста от следующих показателей: pH, температура, аэрация.

Исследования погруженного культивирования проводились на ферментере РФ-2.10 объемом 10 л. Культивирование проходило в объеме 4 л.

Твердофазное культивирование.

Для засева готовили микробную культуру следующим образом: смыв суточной агаровой культуры довели до 1 млрд микробных тел в 1 см³ стерильного физиологического раствора. Затем десятичными разведениями довели концентрацию до 10³ и 0,1 см³ микробной взвеси внесли на поверхность чашки Петри со средой SMS (минимальной солевой средой), распределяли шпателем по поверхности чашки и ставили в термостат при исследуемых температурах на 24 ч.

Погруженное культивирование.

Для засева готовили микробную культуру с концентрацией 1 млрд микробных тел в 1 см³ объемом 400 мл. Далее микробную культуру вносили в ферментер с исследуемыми показателями pH, температурой и аэрацией. Культивирование проводили, пока исследуемая культура не войдет в стадию раннего стационара, контролируя температуру, pH и аэрацию.

На первом этапе исследований для культивирования бацилл использовали три варианта среды: бульон Хоттингера, пептонную среду и солевую среду SMS. Культивирование бактерий проводили во флаконах объемом 500 мл на круговых качалках с частотой оборотов 220–240 об/мин при температуре 37 °С. Рабочий объем питательной среды во флаконе составлял 50 мл. Посевной материал вносили из расчета созда-

ния начальной численности бактерий в среде 1,0×10⁶–1,5×10⁶ м.т./мл. Продолжительность культивирования составляла 24 ч.

На втором этапе с целью оптимизации состава среды культивирования для получения максимального выхода биомассы штаммов рода *Bacillus* и биологически активных веществ была исследована зависимость роста от следующих показателей: содержание сахаров, источники азотного и фосфорного питания.

Исследования погруженного культивирования консорциума трех штаммов бактерий проводилось на ферментере РФ-2.10 объемом 10 л. Культивирование проходило в объеме 4 л.

В качестве источника углеводов использовалась меласса, источников азотного питания – (NH₄)₂SO₄, фосфорного питания – K₂HPO₄·3H₂O+KH₂PO₄.

При исследовании переменных факторов исследовали мелассу в концентрациях 20 и 30 г/л; (NH₄)₂SO₄ – 1–7,5 г/л; смесь фосфатов в равных долях K₂HPO₄·3H₂O+KH₂PO₄ – 5–45 г/л.

Критерием оптимизации служила численность жизнеспособных бактерий в культуральной жидкости (м.т./мл), количество которых определяли методом серийных разведений с последующим высевом на агаризированую питательную среду.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты исследований по изучению влияния физических факторов на показатель роста штаммов рода *Bacillus* в условиях твердофазного и погруженного культивирования представлены в таблицах 1–6.

Таблица 1. – Погруженное культивирование *Bacillus subtilis* на среде SMS

Аэрация, об/мин		Температура, °С							
		28		37		42		45	
		0	150	0	150	0	150	0	150
pH	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	био пленка	+/-	био пленка	+/-	био пленка	+/-	-	-
	6		+		+		+	-	-
	7		+		+		+	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста; «+» – наличие роста; «+/-» – слабое проявление роста

Таблица 2. – Погруженное культивирование *Bacillus licheniformis* на среде SMS

Аэрация, об/мин		Температура, °С							
		28		37		42		45	
		0	150	0	150	0	150	0	150
рН	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+/-	+/-	+	+/-	-	-	-	-
	6	+	+	+	+	-	-	-	-
	7	+	+	+	+	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста, «+» – наличие роста, «+/-» – слабое проявление роста

Таблица 3. – Погруженное культивирование *Bacillus megaterium* на среде SMS

Аэрация, об/мин		Температура, °С							
		28		37		42		45	
		0	150	0	150	0	150	0	150
рН	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+/-	+/-	+	+	+	+	-	-
	6	+	+	+	+	+	+	-	-
	7	+	+	+	+	+	+	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста, «+» – наличие роста, «+/-» – слабое проявление роста

Для более точного изучения влияния значения рН на рост штаммов бактерий *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* были проведены дополнительные исследования с более точным значением рН, значения были взяты от 6,0 до 8,0.

Оптимальный рост для *Bacillus subtilis* наблюдался при значениях рН 6,7–7,3 при аэрации 150 об/мин. При значениях рН выше 7,3 наблюдалось хлопьеобразование, при значении рН 7,8–8,0 рост прекращался или полностью отсутствовал. Оптимальной температурой роста бактерий является значение 42 °С.

Оптимальный рост для *Bacillus li-*

cheniformis наблюдался при значениях рН 6,8–7,2 при аэрации и ее отсутствии. При значениях рН выше 7,2 наблюдалось хлопьеобразование, при значении рН 7,8–8,0 рост прекращался или полностью отсутствовал. Оптимальной температурой роста бактерий является значение 37 °С.

Оптимальный рост для *Bacillus megaterium* наблюдался при значениях рН 6,4–6,9 при аэрации и ее отсутствии. При значениях рН выше 7,5 наблюдалось хлопьеобразование, при значении рН 8,0 и выше рост прекращался или полностью отсутствовал. Оптимальной температурой роста бактерий является диапазон от 36 °С до 39 °С.

Таблица 4. – Твердофазное культивирование *Bacillus subtilis* на среде SMS

рН	Температура, °С			
	28	37	42	45
4	-	-	-	-
5	+/-	+/-	+/-	-
6	+	+	+	-
7	+	+	+	-
8	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста, «+» – наличие роста, «+/-» – слабое проявление роста

Таблица 5. – Твердофазное культивирование *Bacillus licheniformis* на среде SMS

рН	Температура, °С			
	28	37	42	45
4	-	-	-	-
5	+/-	+/-	-	-
6	+	+	-	-
7	+	+	-	-
8	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста, «+» – наличие роста, «+/-» – слабое проявление роста

Таблица 6. – Твердофазное культивирование *Bacillus megaterium* на среде SMS

рН	Температура, °С			
	28	37	42	45
4	-	-	-	-
5	+/-	+	+	-
6	+	+	+	-
7	+	+	+	-
8	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста, «+» – наличие роста, «+/-» – слабое проявление роста

При твердофазном культивировании оценка роста происходила визуально по внешнему виду колоний, при этом оптимальные параметры роста штаммов соответствовали показателям, полученным в

процессе погруженного культивирования.

Результаты исследований по изучению оптимальной питательной среды для глубинного культивирования бацилл представлены на рисунках 1–3.

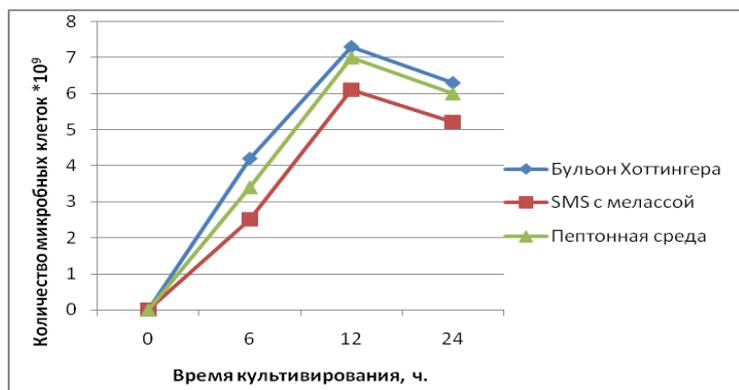


Рисунок 1. – Рост *Bacillus subtilis* на различных типах питательных сред

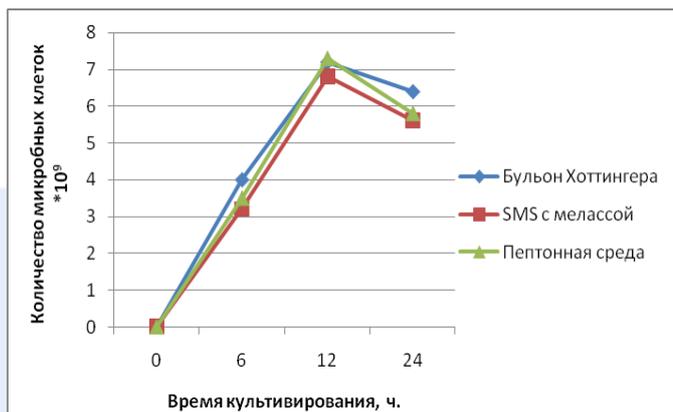


Рисунок 2. – Рост *Bacillus licheniformis* на различных типах питательных сред

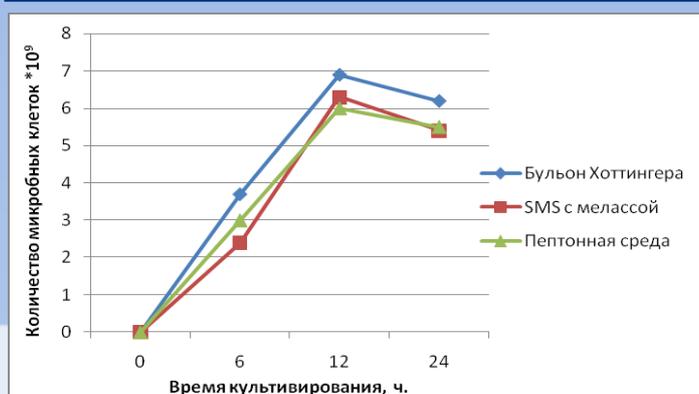


Рисунок 3. – Рост *Bacillus megaterium* на различных типах питательных сред

При культивировании штаммов бацилл на изучаемых средах различного состава (рисунки 1–3) бактерии проявили неодинаковую ростовую активность. На бульоне Хоттингера и пептонной среде, богатых по содержанию органических соединений, наблюдали наиболее интенсивный рост бацилл. Максимальное содержание клеток в среде через 12 ч культивирования для всех штаммов составляло $6,0 \times 10^9$ – $7,3 \times 10^9$ м.т./мл. Однако компоненты данных сред являются дорогостоящими для наработки биомассы клеток в производственных условиях. Более дешевой для применения в производстве является

среда SMS с мелассой, которую бактерии могут использовать в качестве основного источника углерода и энергии. При росте на этой среде в течение 12 ч численность жизнеспособных бацилл составляла $6,1 \times 10^9$ – $6,8 \times 10^9$ м.т./мл.

Таким образом, показано, что среда SMS с мелассой (как более дешевая) является приемлемой для дальнейшей оптимизации и использования в производственных условиях.

Результаты исследований по оптимизации состава среды культивирования по содержанию сахаров представлены в таблицах 7–12.

Таблица 7. – Скорость роста *Bacillus megaterium* при концентрации мелассы 20 г/л

Время культивирования, ч	Оптическая плотность	Титр, м.т./мл
0	0,412	-
1	0,498	-
2	0,621	$1,7 \times 10^9$
3	0,732	$1,9 \times 10^9$
4	0,912	$2,3 \times 10^9$
5	1,130	$2,9 \times 10^9$
6	1,237	$3,1 \times 10^9$
7	1,231	$3,1 \times 10^9$

Таблица 8. – Скорость роста *Bacillus megaterium* при концентрации мелассы 30 г/л

Время культивирования, ч	Оптическая плотность	Титр, м.т./мл
0	0,401	-
1	0,485	-
2	0,701	$1,9 \times 10^9$
3	0,923	$2,4 \times 10^9$
4	1,132	$2,8 \times 10^9$
5	1,328	$3,3 \times 10^9$
6	1,489	$3,7 \times 10^9$
7	1,604	$4,1 \times 10^9$
8	1,599	$4,0 \times 10^9$

Культивирование штамма *Bacillus megaterium* происходило при оптимальных условиях: температура 38 °С, рН 6,6, аэрация 150 об/мин.

Таблица 9. – Скорость роста *Bacillus licheniformis* при концентрации мелассы 20 г/л

Время культивирования, ч	Оптическая плотность	Титр, м.т./мл
0	0,220	-
1	0,521	-
2	0,728	1,9×10 ⁹
3	1,068	2,5×10 ⁹
4	1,435	3,7×10 ⁹
5	1,804	4,5×10 ⁹
6	1,798	4,2×10 ⁹

Таблица 10. – Скорость роста *Bacillus licheniformis* при концентрации мелассы 30 г/л

Время культивирования, ч	Оптическая плотность	Титр, м.т./мл
0	0,371	-
1	0,670	-
2	0,826	2,0×10 ⁹
3	1,182	2,6×10 ⁹
4	1,454	3,7×10 ⁹
5	1,978	4,9×10 ⁹
6	1,990	4,9×10 ⁹
7	2,024	5,0×10 ⁹

Культивирование штамма *Bacillus licheniformis* происходило при оптимальных условиях: температура 37 °С, рН 7,0, аэрация 150 об/мин.

Таблица 11. – Скорость роста *Bacillus subtilis* при концентрации мелассы 20 г/л

Время культивирования, ч	Оптическая плотность	Титр, м.т./мл
0	0,371	-
1	0,402	-
2	0,826	2,1×10 ⁹
3	1,254	3,0×10 ⁹
4	1,476	3,7×10 ⁹
5	1,698	4,1×10 ⁹
6	1,862	4,5×10 ⁹
7	1,924	4,9×10 ⁹

Таблица 12. – Скорость роста *Bacillus subtilis* при концентрации мелассы 30 г/л

Время культивирования, ч	Оптическая плотность	Титр, м.т./мл
0	0,229	-
1	0,282	-
2	0,710	1,8×10 ⁹
3	1,152	3,9×10 ⁹
4	1,510	4,1×10 ⁹
5	1,935	4,9×10 ⁹
6	2,195	5,3×10 ⁹
7	2,235	5,6×10 ⁹

Культивирование штамма *Bacillus subtilis* происходило при оптимальных условиях: температура 42 °С, рН 6,8, аэрация 150 об/мин.

Для всех штаммов оптимальной концентрацией мелассы является 30 г/л, при использовании которой выход бакте-

риальной массы бацилл был на $0,7 \times 10^9 - 0,9 \times 10^9$ м.т./мл выше в сравнении с концентрацией 20 г/л.

Результаты исследований по оптимизации состава среды культивирования по содержанию источников азотного питания представлены в таблице 13.

Таблица 13. – Влияние различных концентраций сульфата аммония на рост штаммов бацилл

Время культивирования, ч	Концентрация бактериальных клеток, м.т./мл		
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
без добавления сульфата аммония			
6	$2,7 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$
12	$3,5 \times 10^9$	$3,8 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$
1 г/л сульфата аммония			
6	$3,5 \times 10^9$	$3,3 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$
12	$4,8 \times 10^9$	$4,2 \times 10^9$	$3,8 \times 10^9$
2,5 г/л сульфата аммония			
6	$4,7 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$
12	$6,8 \times 10^9$	$6,8 \times 10^9$	$6,5 \times 10^9$
5 г/л сульфата аммония			
6	$4,8 \times 10^9$	$4,4 \times 10^9$	$4,3 \times 10^9$
12	$6,8 \times 10^9$	$7,0 \times 10^9$	$6,6 \times 10^9$
7,5 г/л сульфата аммония			
6	$4,2 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$	$5,0 \times 10^9$
12	$6,8 \times 10^9$	$6,8 \times 10^9$	$6,4 \times 10^9$

По данным таблицы 13 установлено, что оптимальной концентрацией сульфата аммония в качестве источника азота для культивирования штаммов бацилл является 2,5 г/л, т.к. ее увеличение до 5,0–7,5 г/л не приводило к существенному росту интенсивности накопления биомассы бацилл.

Результаты исследований по оптимизации состава среды культивирования по содержанию источников фосфорного питания представлены в таблице 14.

По данным таблицы 14 установлено, что оптимальной концентрацией солей $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$ в качестве источника фосфора для культивирования штаммов

бацилл является 30 г/л. Дальнейшее ее увеличение до уровня 45 г/л не привело к существенному росту интенсивности накопления биомассы бацилл.

По результатам проведенных исследований изготовлена оптимизированная питательная среда для накопления штаммов бацилл на основе солевого концентрата SMS (минимальной солевой среды) с добавлением мелассы свекловичной в концентрации 30 г/л, $(NH_4)_2SO_4$ – в концентрации 2,5 г/л и $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$ – в концентрации 30 г/л. Ростовые свойства изготовленной среды сравнивали со свойствами исходной (таблица 15).

Таблица 14. – Влияние различных концентраций $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$ на рост штаммов бацилл

Время культивирования, ч	Концентрация бактериальных клеток, м.т./мл		
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
без добавления $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$			
6	$2,2 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$
12	$3,4 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$
5 г/л $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$			
6	$2,7 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$
12	$5,5 \times 10^9$	$5,2 \times 10^9$	$4,8 \times 10^9$
15 г/л $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$			
6	$2,7 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$
12	$5,8 \times 10^9$	$5,8 \times 10^9$	$5,5 \times 10^9$
30 г/л $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$			
6	$3,0 \times 10^9$	$3,7 \times 10^9$	$4,2 \times 10^9$
12	$6,2 \times 10^9$	$6,7 \times 10^9$	$6,3 \times 10^9$
45 г/л $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$			
6	$3,2 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$
12	$6,0 \times 10^9$	$6,5 \times 10^9$	$5,9 \times 10^9$

Таблица 15. – Рост штаммов бацилл на питательных средах после оптимизации

Варианты питательной среды	Количество клеток <i>Bacillus subtilis</i> , % после выращивания в течение, ч		Количество клеток <i>Bacillus licheniformis</i> , % после выращивания в течение, ч		Количество клеток <i>Bacillus megaterium</i> , % после выращивания в течение, ч	
	6	12	6	12	6	12
	Исходная среда	$3,4 \times 10^9$	$5,5 \times 10^9$	$3,2 \times 10^9$	$5,3 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$
Оптимизированная среда	$5,6 \times 10^9$	$7,5 \times 10^9$	$5,5 \times 10^9$	$7,4 \times 10^9$	$5,2 \times 10^9$	$7,4 \times 10^9$

По данным таблицы 15 установлено, что в результате оптимизации состава среды по содержанию сахаров, источников азотного и фосфорного питания уровень накопления штаммов бацилл через 6 часов увеличивался на 64,7–85,7 % и на 36,4–48 % – через 12 часов культивирования в сравнении с исходной питательной средой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучение показателей роста штаммов рода *Bacillus* в условиях твердофазного и погруженного культивирования показало, что оптимальной температурой роста *Bacillus subtilis* является значение 42 °С, pH 6,7–7,3, *Bacillus licheniformis* – 37 °С, pH 6,8–7,2, *Bacillus megaterium* – от

36 до 39 °С, pH 6,4–6,9. Также необходима аэрация в условиях погруженного культивирования с интенсивностью 150 об/мин, особенно для штамма *Bacillus subtilis*, т.к. без аэрации данная культура образовывала плохо разбивающуюся биопленку.

2. Среда SMS с мелассой (как более дешевая) является приемлемой для оптимизации и использования в производственных условиях.

3. Для всех штаммов оптимальной концентрацией мелассы является 30 г/л, сульфата аммония в качестве источника

азота для культивирования штаммов бацилл – 2,5 г/л, солей $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$ – 30 г/л приводило к существенному увеличению интенсивности накопления биомассы бацилл.

4. Оптимизация состава питательной среды по содержанию сахаров, источникам азотного и фосфорного питания приводит к увеличению накопления штаммов бацилл через 6 часов на 64,7–85,7 % и на 36,4–48 % – через 12 часов культивирования в сравнении с исходной питательной средой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беденко, А. Пробиотики в рационе молодняка крупного рогатого скота: опыты на телятах молочного периода в ФРГ / А. Беденко // Молоко & Корма. Менеджмент. – 2007. – № 4. – С. 32–34.

2. Влияние препарата на основе фитолектинов и пробиотиков «Метафитохит» на обменные процессы телят при энтеритах / П. А. Красочко [и др.] // Актуальные проблемы и инновации в современной ветеринарной фармакологии и токсикологии : материалы V Междунар. съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов, Витебск, 26–30 мая 2015 г. / УО ВГАВМ ; редкол. : А. И. Ятусевич (гл. ред.) [и др.]. – Витебск, 2015. – С. 105–109.

3. Идентификация и изучение свойств природных микроорганизмов, выделенных из донных отложений пресноводных водоемов / П. А. Красочко [и др.] // Актуальные проблемы биотехнологии в аграрно-промышленном комплексе : материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 26–27 ноября 2015 г. / РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»; редкол. : П. А. Красочко (гл. ред.) [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2015. – С. 97–100.

4. Каврус, М. А. Гигиенические аспекты использования пробиотических препаратов в животноводстве / М. А. Каврус, В. В. Малашко // Ветеринарная наука – производству. – 2005. – № 38. – С. 242–246.

5. Лечебная и профилактическая эффективность про- и пребиотических препаратов при инфекционных энтеритах телят / П. А. Красочко [и др.] // Актуальные проблемы биотехнологии в аграрно-промышленном комплексе : материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 26–27 ноября 2015 г. / РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»; редкол. : П. А. Красочко (гл. ред.) [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2015. – С. 114–117.

6. Лысак, В. В. Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям, контроль самостоятельной работы студентов / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова, – Минск : БГУ, 2002. – 97 с.

7. Олива, Т. В. Производство экологически безопасной продукции животноводства путем направленного формирования бактериоциноза кишечника молодняка животных / Т. В. Олива // Мировой опыт и перспективы развития сельского хозяйства : материалы Междунар. конф., посвящ. 95-летию Воронеж. гос. аграр. ун-ту, Воронеж, 23–24 окт. 2007 г. / Воронеж. гос. аграр. ун-т. – Воронеж, 2008. – С. 115–117.

8. Пестис, В. К. Пробиотики в животноводстве и ветеринарии / В. К. Пестис, М. А. Каврус, А. Н. Михалюк. – Гродно : Гродн. гос. аграр. ун-т, 2006. – 94 с.

УДК 619:616.98:579.882.11

Ломако Ю.В., кандидат ветеринарных наук, доцент
Ананчиков М.А., кандидат ветеринарных наук, доцент
Красникова Е.Л., научный сотрудник
Новикова О.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент

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

ХЛАМИДИИ И АССОЦИИРОВАННЫЕ С ХЛАМИДИЯМИ ИНФЕКЦИИ У ТЕЛЯТ

Резюме

В статье показано распространение хламидий среди телят с клиническими признаками инфекционных заболеваний в хозяйствах Республики Беларусь, рассматривается их участие в этиологической структуре заболеваемости, определены наиболее часто встречаемые виды хламидий.

Summary

In the article it was shown the spreading of *Chlamydia* infection in calves with clinical infection pathology in farms of Belarus Republic. It was revealed the importance of *Chlamydia* infection in the etiology structure of infection diseases and detected the most common *Chlamydia* species.

Поступила в редакцию 18.11.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе развития животноводства у крупного рогатого скота на фоне нарушений условий содержания, выпойки телят и погрешностей кормления клинически проявляются инфекции, как правило, в виде ассоциаций. С социальной и экономической точки зрения наиболее опасными представляются природно-очаговые инфекции, общие для животных и человека, представителем которых являются хламидиозы. Ветеринарными практикующими специалистами не до конца осознана роль хламидий при возникновении и развитии ассоциированных инфекционных заболеваний у телят.

Хламидии представляют собой мелкие граммотрицательные микроорганизмы округлой формы, характеризующиеся облигатным внутриклеточным паразитизмом. Существуют в виде двух основных форм: элементарные тельца (инфекционная форма) и ретикулярные тельца (вегетативная, неинфекционная форма). Элементарные тельца (диаметр 250–450 нм) окружены двумя трехслойными мембранами, которые по своему строению сходны с клеточной оболочкой граммотрицательных бактерий, способны выживать вне клетки хозяина [2, 8]. В результате жизнедея-

тельности ретикулярных телец (размер 400–600×800–1000 нм) формируется новое поколение элементарных телец [12], которые разрушают клетку, выходят в окружающую среду и инфицируют другие соседние клетки. Ретикулярные тельца так же, как и элементарные покрыты двумя трехслойными мембранами; ригидный слой клеточной стенки отсутствует, что определяет чувствительность хламидий на этой стадии развития к физико-химическим факторам. Кроме основных форм, при развитии хламидий различают промежуточные, или переходные, тельца, а также L-подобные формы [15], которые отличаются слабой антигенностью и не способны активно взаимодействовать с иммунокомпетентными клетками организма. L-формы хламидий могут появляться при неблагоприятных условиях существования, в том числе в случаях бесконтрольного применения антибиотиков. Жизненный цикл развития хламидий при благоприятных для паразита условиях составляет 48–72 часа. Основными мишенями в организме крупного рогатого скота для хламидий являются эпителиальные и эндотелиальные клетки. Наряду с этим размножение хламидий может происходить в лейкоцитах и макрофагах [14, 9, 3], с

помощью которых возбудитель способен проникать в ткани, находящиеся далеко от первичного очага инфекции. Хламидии могут персистировать в организме на протяжении нескольких лет [6, 7]. По наблюдениям ряда исследователей персистенция хламидий значительно увеличивает риск осложнений, характеризующихся хронизацией патологических процессов [1].

Благодаря способности длительно сохраняться в клетках организма хозяина, изначально хламидии были отнесены к вирусам. Однако в связи с наличием клеточной стенки, процесса деления вегетативных форм, содержанием ДНК и РНК, чувствительностью микроорганизмов к ряду антибиотиков и некоторых других морфологических и биохимических характеристик хламидий их отнесли к бактериям семейства *Chlamydiaceae*. Согласно уточненной классификации, в 2009 году все патогенные хламидии были отнесены к семейству *Chlamydiaceae* и выделены в один род *Chlamydia*, в котором насчитывают на сегодняшний день 12 видов, различающихся между собой по ряду молекулярно-генетических признаков. Отсутствие видо-специфичности у хламидий является одной из наиболее важных эпизоотологических особенностей этих микроорганизмов: один и тот же вид можно обнаружить у животных, птиц и человека. Например, ранее считали, что *Chlamidia trachomatis* паразитирует исключительно у человека. С развитием молекулярно-генетических методов диагностики установлено, что *C. trachomatis* зачастую является причиной абортос у крупного и мелкого рогатого скота [13, 16], а циркулирующие среди животных и птиц виды хламидий могут вызывать различной тяжести заболевания у людей [4]. Хламидиоз может протекать в виде персистирующей или латентной инфекции, которая при снижении иммунной защиты организма сменяется острой или хронической формой. Антигенное воздействие хламидий на организм сопровождается воспалительными процессами в эндотелии кровеносных сосудов различных внутренних органов и серозных оболочек, приводящими к дистрофии и некрозу эндотелиоцитов, образованию атеросклеротических бляшек, по-

вышению тканево-сосудистой проницаемости, деструкции элементов соединительной ткани, формированию тромбов [5]. Как правило, хламидии встречаются в ассоциациях с другими патогенными и условно-патогенными микроорганизмами (вирусами, бактериями и др.). В ассоциациях микроорганизмов хламидии быстрее адаптируются к внутриклеточному паразитированию; кроме того, повышается патогенность и устойчивость к действию антибиотиков каждого возбудителя ассоциации [11]. Среди причин хронизации инфекционного процесса, развития репродуктивной патологии и патологии других органов указывают колонизацию хламидиями желудочно-кишечного тракта [1, 17]. Также очагом хронической инфекции с системными проявлениями и прямой связью с другими очагами инфекции являются верхнечелюстные пазухи [10].

В связи с тем, что хламидиоз крупного рогатого скота за последние годы, согласно сообщениям исследователей различных стран, получает все большее распространение и постепенно вырастает в экономическую и социально-медицинскую проблему, мы поставили перед собой **цель** установить роль хламидийной инфекции в структуре инфекционной патологии телят в животноводческих хозяйствах Республики Беларусь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На молочно-товарных фермах и комплексах по производству молока от телят с поражением органов дыхания, желудочно-кишечного тракта, суставов и конъюнктивитами отбирали пробы биоматериала для последующих серологических (ИФА) и ПЦР-исследований с целью исключения бактериальных и вирусных инфекций. Для постановки реакции иммуноферментного анализа (ИФА) на хламидиоз и вирусные инфекции использовали наборы ИФА для выявления антител к *Chlamydia abortus*, вирусу инфекционного ринотрахеита (ИРТ), вирусу вирусной диареи (ВД) крупного рогатого скота (IDEXX, Швейцария), а также антигенов рота- и коронавируса инфекции (IDEXX, Франция). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) стави-

ли с использованием набора «*Chlamydia spp.* PCR real-time», тест-систем для обнаружения генома вирусов ИРТ, ВД, ПГ-3, рота- и коронавирусной инфекции, возбудителей пастереллеза (РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского») и коммерческого набора «ПЦР-ХЛАМИДИЯ-ФАКТОР» фирмы «Ветфактор» (Россия).

От трупов и вынужденно убитых телят отбирали пробы патологического материала: паренхиматозные органы, соскобы со слизистой кишечника, региональные лимфоузлы для бактериологических и ПЦР-исследований. Выделенные культуры микроорганизмов идентифицировали с использованием биохимического анализатора «Vitek 2» (США). Патогенность изолированных культур микроорганизмов изучали на белых мышах. От коров с признаками маститов и послеродовых эндометритов методом ПЦР исследовали молозиво, молоко и соскобы со стенок канала шейки матки. На отдельных молочно-товарных фермах проводили отстрел голубей, патологический материал которых (кишечник, легкие, печень) также исследовали в полимеразной цепной реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате исследований 300 проб биологического и патологического материала от телят и коров в полимеразной цепной реакции в 36 пробах (12,0 %) установлен геном возбудителей, относящихся к семейству *Chlamydiaceae*. При дальнейшем изучении видового состава хламидий было показано, что в 29 пробах биологического материала (что составляет 9,7 % от всех исследованных проб) обнаружен геном *C. abortus*, в том числе в 14 пробах носовой слизи, в 6 пробах патологического материала, в 7 пробах фекалий от телят и 2 пробах молока от коров с клиническими маститами. В 27 пробах биологического материала (что составляет 9,0 % от всех исследуемых проб), в том числе в 11 пробах носовой слизи, 5 пробах патологического материала, 5 пробах фекалий от телят, в 3 пробах молока от коров с клиническими маститами и 2 пробах от коров с субклини-

ческими маститами, 1 пробе соскобов со слизистой оболочки канала шейки матки обнаружен геном *C. pecorum*. Геном *C. psittaci* установлен в 22 пробах биологического материала, что составляет 7,3 % от всех исследованных проб. В пробах носовой слизи от телят *C. psittaci* встречалась в 8 случаях, в 5 пробах патологического материала, в 6 пробах фекалий, у коров – в 2 пробах молока при клиническом и субклиническом мастите, в 1 пробе соскоба из стенки канала шейки матки.

Необходимо отметить, что в большинстве случаев (61,1 %) различные виды хламидий паразитировали ассоциативно. Так, в 13 пробах встречалась ассоциация *C. pecorum* + *C. abortus* + *C. psittaci*, в 2 случаях – *C. pecorum* + *C. abortus* и в 7 пробах – *C. pecorum* + *C. psittaci*. В виде монохламидийной инфекции регистрировали *C. pecorum* и *C. abortus*.

Для уточнения источников инфицирования крупного рогатого скота хламидиями на одной из молочно-товарных ферм республики нами был проведен отбор проб молока от коров с признаками маститов, соскобы со слизистой канала шейки матки при послеродовом эндометрите и патологического материала (кишечник, легкие и печень) от голубей, которые присутствовали на ферме. Из 9 проб патологического материала от голубей в 5 случаях обнаружен геном *C. psittaci*, в 2 – ассоциация *C. pecorum* + *C. psittaci*. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Как показано в материалах наших исследований (таблица 1), из патматериала от синантропной птицы (голубей) выделен генотип возбудителей хламидиоза, причем как *Chlamydia psittaci*, так и *Chlamydia pecorum*. Из молока коров при клинических и субклинических маститах, а также из соскобов со слизистой оболочки канала шейки матки коров с признаками эндометрита был обнаружен в полимеразной цепной реакции генотип тех же возбудителей хламидиоза. Однако *Chlamydia pecorum* у коров регистрировался несколько чаще. *Chlamydia psittaci* у телят до 2-месячного возраста встречается редко. Как правило,

представителем хламидий в этой группе животных является *Chlamydia pecorum*. Однако у отдельных телят генотип *Chlamydia psittaci* обнаруживали в носовой сли-

зи, легких и фекалиях, что может указывать на различные пути инфицирования животных: воздушно-капельный и пероральный.

Таблица 1. – Результаты ПЦР-исследований проб молока, соскобов со стенок канала шейки матки коров, биологического материала от телят и патологического материала от голубей, отобранных на молочно-товарной ферме Республики Беларусь

Наименование пробы	<i>Chlamydia pecorum</i>		<i>Chlamydia psittaci</i>		<i>Chlamydia abortus</i>	
	Ст (пороговое число циклов)	Результаты	Ст (пороговое число циклов)	Результаты	Ст (пороговое число циклов)	Результаты
Клин. мастит (молоко)	-	отриц.	-	отриц.	-	отриц.
Клин. мастит (молоко)	44,69	полож.	-	отриц.	-	отриц.
Клин. мастит (молоко)	34,98	полож.	24,35	полож.	38,04	полож.
Клин. мастит (молоко)	35,63	полож.	-	отриц.	-	отриц.
Клин. мастит (молоко)	-	отриц.	-	отриц.	24,04	полож.
Субкл. мастит (молоко)	-	отриц.	-	отриц.	-	отриц.
Субкл. мастит (молоко)	-	отриц.	-	отриц.	-	отриц.
Субкл. мастит (молоко)	42,15	полож.	-	отриц.	-	отриц.
Субкл. мастит (молоко)	36,09	полож.	28,66	полож.	-	отриц.
Соскоб со стенок канала шейки матки	-	отриц.	-	отриц.	-	отриц.
Соскоб со стенок канала шейки матки	-	отриц.	-	отриц.	33,79	полож.
Соскоб со стенок канала шейки матки	38,38	полож.	24,58	полож.	-	отриц.
Соскоб со стенок канала шейки матки	-	отриц.	-	отриц.	-	отриц.
Фекалии теленка	-	отриц.	37,47	полож.	-	отриц.
Легкое теленка	-	отриц.	37,63	полож.	-	отриц.
Носовая слизь теленка	-	отриц.	39,35	полож.	-	отриц.
Кишечник голубя	45,03	полож.	26,56	полож.	-	отриц.
Легкое голубя	35,11	полож.	34,81	полож.	-	отриц.
Печень голубя	-	отриц.	42,74	полож.	-	отриц.
Положительный контрольный образец	22,42	полож.	22,28	полож.	22,89	полож.
Отрицательный контрольный образец	-	отриц.	-	отриц.	-	отриц.

Голуби, являясь одним из основных природных резервуаров хламидий и биоконпонентов экосистемы, вероятно, способны длительное время без проявления клинических признаков заболевания поддерживать жизнедеятельность бактерий в своем организме и периодически контаминировать окружающую среду, создавая таким образом угрозу заражения крупного рогатого скота на ферме возбудителями *C. pecorum* и *C. psittaci*. Инфицированные хламидиями коровы клинически могут оставаться незамеченными, однако являются бактерионосителями и выделяют возбудителя во внешнюю среду с послеродовыми истечениями из половых органов, молозивом и молоком. В организм новорожденных телят хламидии могут попасть как из окружающей среды, так и от матерей при родах и выпойке.

Таким образом, одним из основных природных источников возбудителей хламидиоза крупного рогатого скота в экосистеме молочно-товарных ферм являются синантропные птицы (голуби), которые контаминируют своими выделениями воздух, корма и питьевую воду. Телята, молодняк крупного рогатого скота и взрослый скот инфицируются хламидиями из внешней среды воздушно-капельным и пероральным путем. Больные животные также активно выделяют возбудителей в окружающую среду и при групповом содержании способствуют заражению чувствительных к инфекции особей. Взрослые животные, как правило, переболевают бессимптомно и длительный период времени являются бактерионосителями, рассеивая хламидии во внешней среде. Лактирующие коровы способны передавать инфекцию новорожденным телятам с молозивом и молоком.

Хламидии являются облигатными внутриклеточными паразитами, отличающимися широким тропизмом, и в связи с эндотелио- и эпителиотропностью вызывают заболевания с полиорганными поражениями, в том числе с поражением иммунокомпетентных органов. Подавление формирования иммунокомпетентных клеток в

организме, особенно растущем, способствует персистенции возбудителя, поражению различных органов и тканей и дальнейшей хронизации инфекционного процесса. Кроме того, хроническому течению хламидийной инфекции также способствует снижение резистентности организма телят в результате нарушения обменных процессов на фоне погрешностей кормления (неполноценное, некачественное, несбалансированное кормление), следствием чего является создание благоприятных условий для развития хламидий и других возбудителей инфекционных заболеваний.

Этиологическую структуру заболеваемости телят на различных молочно-товарных фермах и комплексах по производству молока изучали на телятах в возрасте до 6 месяцев. Биоматериал (носовая слизь, соскобы с конъюнктивы глаз, фекалии, кровь) для лабораторных исследований отбирали у животных с клиническими признаками поражения глаз, суставов, респираторного и желудочно-кишечного тракта. В случае вынужденного убоя или падежа телят бактериологическими методами исследовали патологический материал (головной мозг, паренхиматозные органы, региональные лимфоузлы). В результате проведенных исследований установлено, что основными компонентами ассоциативных вирусно-бактериальных инфекций у телят являются эшерихиоз, пастереллез, инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея крупного рогатого скота, рота- и коронавирусная инфекция, хламидиоз (таблица 2). На молочно-товарных фермах и комплексах наблюдается тенденция распространения хламидий среди поголовья крупного рогатого скота. По результатам клинических и лабораторных исследований подозрительных по заболеванию и больных хламидиозом телят наиболее часто можно обнаружить на фермах, где наблюдается скопление синантропной птицы (голуби, воробьи, скворцы, ласточки) и отсутствует специфическая профилактика инфекции. У новорожденных телят в первую неделю жизни отмечается диарея, трудно поддающаяся лечению с использо-

ванием антибиотиков. В материалах, представленных в таблице 2, показано, что при исследовании проб фекалий от таких телят методом ПЦР в одной из 7 проб обнаружен геном хламидий (14,3 %), в одной пробе – возбудителя коронавирусной инфекции и в двух пробах – геном возбудителя вирусной диареи (28,6 %). Причем геном хламидий обнаружен у серонегативного по хламидиям теленка. Бактериологическими исследованиями из 100 % проб выделена *E. coli*, патогенная для белых мышей. Серологическими исследованиями сыворотки крови в ИФА, отобранной от этих же телят, специфические антитела к хламидиям обнаружены в 4 пробах, к возбудителю ко-

ронавирусной инфекции – в 5 (+2 – сомнительный результат), к вирусу диареи – в 6 пробах. Почти 100%-ное наличие специфических антител у новорожденных телят к возбудителю коронавирусной инфекции и вирусу диареи можно объяснить проведением вакцинации стельных коров и нетелей в хозяйстве против данных инфекций и присутствием в связи с этим в организме телят колостральных антител. Наличие у 57,1 % исследованных телят антител к хламидиям профилактическими вакцинациями объяснить нельзя, так как они в хозяйстве не проводились, однако геном возбудителя (*Chlamidia psittaci*) обнаружен у 1 головы (14,3 %).

Таблица 2. – Результаты изучения вирусно-бактериальных ассоциаций крупного рогатого скота

Группы животных	Кол-во животных, гол.	Диагноз по клиническим признакам	Результаты исследований методом ИФА	Результаты исследований методом ПЦР	Результаты бакисследований	Заключительный диагноз
Телята в возрасте 3–7 дней	7	диарея	хламидиоз – 4 (положительно), 3 (отрицательно); ВД – 6 (положительно), 1 (отрицательно); коронавирусная инфекция – 5 (положительно); 2 (сомнительно)	хламидиоз – 1 (положительно), 6 (отрицательно); ВД – 2 (положительно); 5 (отрицательно); коронавирусная инфекция – 1 (положительно); 6 (отрицательно)	<i>E. coli</i> – 7 проб	хламидиоз + эшерихиоз – 1; ВД + эшерихиоз – 3; коронавирусная инфекция + эшерихиоз – 1; эшерихиоз – 2
Телята в возрасте 20–25 дней	5	полиартрит	хламидиоз – 3 (положительно), 2 (отрицательно)	хламидиоз – 5 (отрицательно); ВД – 5 (отрицательно)	не исслед.	этиология не установлена
Телята в возрасте 2–3 мес.	9	бронхопневмония	хламидиоз – 6 (положительно), 3 (отрицательно); ИРТ – 6 (положительно), 2 (сомнительно), 1 (отрицательно)	хламидиоз – 2 (положительно), 6 (отрицательно); ИРТ – 1 (положительно), 7 (отрицательно); пастерелла – 7 (положительно), 1 (отрицательно)	патматериал от 1 трупа: выделены <i>P. multocida</i> и <i>M. haemolytica</i>	хламидиоз + пастереллез – 2; ИРТ + пастереллез – 1; пастереллез – 6
Телята в возрасте 4–6 мес.	14	кератоконъюнктивит	хламидиоз – 11 (положительно), 3 (отрицательно)	хламидиоз – 2 (положительно), 12 (отрицательно)	стафилококки	хламидиоз

При поражении запястных и скакальных суставов у телят в возрасте 20–25 дней на одной из молочно-товарных ферм исследованиями сыворотки крови в ИФА в трех пробах (60,0 %) выявлены противохламидийные антитела, но ни в крови, ни в смывах из носовой полости этих животных геном хламидий не обнаружен. Исследование парных сывороток крови на хламидиоз не выявило каких-либо существенных изменений в титрах антител, что может указывать на латентную хламидийную инфекцию.

Обследование с использованием лабораторных методов 9 телят с клиническими признаками бронхопневмонии показало, что в ИФА 6 из них позитивно реагировали на хламидии и вирус инфекционного ринотрахеита; исследованиями в ПЦР установлен диагноз на хламидиоз (обнаружен геном возбудителя в носовой слизи) у 2 (22,2 %) телят, на инфекционный ринотрахеит – у 1 (11,1 %), на пастереллез – у 8 (88,9 %) телят. Кроме того, бактериологическими исследованиями из паренхиматозных органов одного павшего теленка выделены культуры *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica*. Ассоциативная форма заболевания (хламидиоз + пастереллез) у телят протекает наиболее тяжело: высокая температура тела (до 41,7 °С), угнетение, полный отказ от корма, отсутствие движений, учащенное дыхание, обильные катаральные истечения из носа, болезненный кашель, летальный исход в течение суток.

У 14 телят в возрасте 4–6 месяцев наблюдали поражение глаз, главным образом одностороннее – кератоконъюнктивит. При исследовании сыворотки крови на хламидиоз в ИФА получено 11 (78,6 %) положительных результатов, в ПЦР геном возбудителя обнаружен в двух пробах (14,3 %). При промывании конъюнктивального мешка пораженных глаз физиологическим раствором и последующей микроскопии центрифугата собранной жидкости телязий не обнаружено. Бактериологическими исследованиями смывов с конъюнктивы специфических возбудителей инфекционного кератоконъюнктивита (моракселла) не установлено; обнаружена сопутству-

ющая микрофлора: грамположительные кокки, диплококки, грамтрицательные палочки. При микроскопии мазков-отпечатков содержимого конъюнктивального мешка после окраски по методу Романовского-Гимзы риккетсий не найдено. Характерные клинические признаки, наличие в организме больных животных специфических к хламидиям антител, а также присутствие генома хламидий в двух пробах позволяют подозревать вызванные поражения глаз возбудителями хламидиоза крупного рогатого скота. Исследования биоматериала с использованием полимеразной цепной реакции позволили выявить ассоциированную инфекцию *C. abortus* + *C. psittaci* у обоих быков.

Обнаружение генетического материала возбудителей инфекционных заболеваний при наличии характерных клинических признаков и патологоанатомических изменений у животных дает основание для постановки диагноза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Возбудители заболеваний крупного рогатого скота семейства *Chlamydiaceae* (*Chlamydia pecorum*, *Chlamydia abortus* и *Chlamydia psittaci*) паразитируют в организме животных в виде моноинфекции и ассоциаций.

2. Основными возбудителями ассоциативных инфекционных заболеваний, характеризующихся поражением органов дыхания у телят в возрасте до 3 месяцев, являются *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, вирус инфекционного ринотрахеита, хламидии; при наличии синдрома диареи – *E. coli*, вирус диареи, ротавирус, коронавирусы, хламидии.

3. В организме синантропной птицы (голуби) – одного из основных природных источников возбудителей хламидиоза – сохраняются различные виды хламидий, в частности *Chlamydia psittaci* и *Chlamydia pecorum*. От коров-матерей, у которых заболевание хламидиозом, как правило, протекает скрыто, телята могут заражаться при родах и в результате скормливания им контаминированного хламидиями молозива и молока.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондарева, Н. Е. Роль колонизации хламидиями органов желудочно-кишечного тракта в развитии и поддержании хронических хламидийных инфекций / Н. Е. Бондарева, Е. А. Королева, Н. А. Зигангирова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2018. – 36 (4). – С. 177–181.
2. Ионова, О. П. Ультраструктурные особенности хламидий, выделенных от крупного рогатого скота / О. П. Ионова, И. А. Курбанов, И. А. Курбанова // Особенности возникновения и проявления заразных заболеваний в условиях промышленной технологии : сб. науч. тр. – Казань, 1983. – С. 94–96.
3. Мавров, Г. И. Хламидийные инфекции: биология возбудителей, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика / Г. И. Мавров. – Киев, 2006. – 522 с.
4. Митрофанов, П. М. Возбудители хламидиозов домашних животных и патогенность их для человека / П. М. Митрофанов, Л. Н. Митрофанова // Проблемы репродукции. – 2007. – Т 13, № 5. – С. 28–32.
5. Митрофанов, П. М. Иммунокомплексная патология у животных, больных хламидиозом / П. М. Митрофанов, Н. К. Кириллов, Л. Н. Митрофанова // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2009. – № 4. – С. 51–52.
6. Обухов, И. Л. Молекулярный механизм паразитизма хламидий и их внутриклеточное развитие / И. Л. Обухов // С.-х. биол. сер. Биол. животных. – 1996. – № 2. – С. 86–98.
7. Обухов, И. Л. Хламидийные инфекции у животных и птиц / И. Л. Обухов // Ветеринария. – 1996. – № 10. – С. 19–29.
8. Овчинников, М. Н. Ультраструктура возбудителей венерических заболеваний и ее клиническое значение / М. Н. Овчинников, В. В. Дилекторский. – М.: Медицина, 1986. – С. 175.
9. Погодин, О. К. Хламидийная инфекция в акушерстве, гинекологии и перинатологии / О. К. Погодин. – Петрозаводск, 1997. – 166 с.
10. Пониделко, С. Н. Клиника, диагностика и лечение воспалительных заболеваний верхнечелюстных пазух, ассоциированных с хламидийной инфекцией : автореф. дисс. ... канд. мед. наук / С. Н. Пониделко. – Санкт-Петербург, 2002.
11. Прилепская, В. Н. Урогенитальный хламидиоз / В. Н. Прилепская, П. Р. Абакарова // Гинекология. – 2004. – Т. 6, № 1. – С. 10–14.
12. Терских, И. И. Орнитоз и другие хламидийные инфекции / И. И. Терских // Вопросы вирусологии. – 1976. – 224 с.
13. Обнаружение *Chlamidia trachomatis* у абортировавших овец / В. А. Федорова [и др.] // Ветеринария. – 2016. – № 1. – С. 22–25.
14. Цинзерлинг, А. В. Хламидиозы: диагностика, роль в патологии человека / А. В. Цинзерлинг // Архив патологии. – 1989. – Вып. 1. – С. 3–9.
15. *Chl. psittaci elementary body envelopes Ingestion and inhibition of phagolysosome fusion* / L. G. Eissenberg [et al.] // Infect. And Immunol. – 1983. – Vol. 40, № 2. – P. 741–751.
16. *Can Chlamydia trachomatis human biovars cause abortion in cattle? An immunohistochemical study on a new host-pathogen relationship.* / A. Ozbek, [et al.] // Mikrobiyol. Bul. – 2008. – Vol. 42. – P. 599–605.
17. Rank, R. G. Hidden in plain sight: chlamydial gastrointestinal infection and its relevance to persistence in human genital infection. / R. G. Rank, L. Yeruva // Infect Immun. 2014. – Vol. 82, № 4. – P. 1362–1371.

наша продукция



УДК 619:616.34:578/9.8:636.2/4.082.35

Дубин Р.А., кандидат ветеринарных наук, доцент
Германенко М.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент

Луганский национальный аграрный университет, г. Старобельськ, Украина

ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНЫЕ АССОЦИАЦИИ У ТЕЛЯТ ПРИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Резюме

Изучена эпизоотическая ситуация по желудочно-кишечным заболеваниям телят, вызванным бактериями и вирусами. Установлена этиологическая структура возбудителей и распространения бактериальных и бактериально-вирусных ассоциаций при энтеритах телят в исследуемых хозяйствах. Полученные нами результаты доказывают, что ведущее место в этиологии заболеваний желудочно-кишечного тракта новорожденных животных занимают ассоциации бактерий и вирусов. От телят с синдромом диареи выделено 18 видов бактерий и идентифицировано 4 вида вирусов, вызвавших заболевание. Наибольшую долю в этиологии заболеваний желудочно-кишечного тракта молодняка занимали следующие бактерии: *E. coli*, сальмонеллы, стафилококки, стрептококки, иерсинии, клебсиеллы, а протеи идентифицировали значительно реже. Также выделяли и некоторые виды вирусов родов *Rotavirus*, *Coronavirus*, *Enterovirus*, *Reovirus*. Ассоциации микроорганизмов при желудочно-кишечных заболеваниях телят с двумя патогенными агентами составляли 44,94 %, из трех или более сочленов – 21,35 %; ассоциации, в которые входили вирусные агенты, составляли 33,71 % в различных вариациях.

Summary

The epizootic situation of gastrointestinal diseases of calves caused by bacteria and viruses has been studied. The etiological structure of pathogens and the spread of bacterial and bacterial-viral associations in enteritis of calves in the studied farms has been established. Our research results prove that the leading place in the etiology of diseases of the gastrointestinal tract of newborn animals is occupied by associations of bacteria and viruses. 18 types of bacteria were isolated from calves with diarrhea syndrome and 4 types of viruses that caused the disease were identified. The largest share in the etiology of diseases of the gastrointestinal tract of young animals was occupied by the following bacteria as *E. coli*, salmonella, staphylococcus, streptococcus, yersinia, klebsiella, and proteas were identified much less frequently. The following types of viruses of the genera *Rotavirus*, *Coronavirus*, *Enterovirus*, *Reovirus* were also isolated. Isolation of associations of microorganisms in gastrointestinal diseases of calves with two pathogenic agents was 44,94 %; of three or more joints in 21,35 %; associations that included viral agents accounted for 33,71 % in various variations.

Поступила в редакцию 20.05.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время среди инфекционных болезней молодняка крупного рогатого скота особое место занимают желудочно-кишечные заболевания бактериальной этиологии. Ведущую роль в нозологическом профиле данных заболеваний играют патогенные штаммы *Escherichia coli*, которые вызывают расстройства желудочно-кишечного тракта у телят в первые недели жизни [1, 3, 4].

На сегодняшний день специалисты ветеринарной медицины не обращают внимания на то, что большинство патологий крупного рогатого скота (КРС) вызываются

ся не одним возбудителем, а ассоциацией условно-патогенных бактерий. Они относятся к инфекционным заболеваниям, которые до сих пор не в полной мере контролируются. Если при инфекционных заболеваниях КРС, вызванных облигатными возбудителями, ветеринарные специалисты имеют на вооружении эффективные средства профилактики и борьбы, то при заболеваниях преимущественно молодняка, вызываемых условно-патогенными бактериями, такие средства отсутствуют, малоэффективны или быстро теряют эффективность [2].

В последние десятилетия в структуре

инфекционных патологий произошло уменьшение процента заболеваний, вызванных облигатно-патогенной микрофлорой, и, наоборот, увеличение удельного веса заболеваний, вызванных условно-патогенной микрофлорой [5].

Факторами, которые снижают эффективность противоэпизоотических мероприятий при желудочно-кишечных заболеваниях телят, вызванных условно-патогенными бактериями, являются недостаточная изученность эпизоотического процесса при этих заболеваниях, отсутствие методов прогнозирования и комплексной системы мер борьбы с данными патологиями. Поэтому изучение микробиоценоза, эпизоотического процесса заболеваний КРС, вызываемых условно-патогенными бактериями, будет способствовать успешному ведению скотоводства в Украине.

Целью работы является выделение и идентификация микроорганизмов как в монокультуре, так и в ассоциациях с вирусами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в 4 хозяйствах Днепропетровской области Украины, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям молодняка сельскохозяйственных животных. Из отобранного патологического материала делали посевы на мясопептонный агар (МПА), мясопептонный бульон (МПБ), глюкоза-сывороточный бульон и глюкоза-кровяной агар по общепринятым методикам. После изучения культурально-морфологических свойств из всех отдельных типичных колоний делали посевы на МПА и МПБ в пробирках и инкубировали при температуре 37–38 °С в течение 24 часов. Полученные таким образом чистые культуры бактерий проверяли на подвижность в препаратах раздавленной капли с помощью фазово-контрастной микроскопии в темном поле зрения. Дальнейшую идентификацию микроорганизмов по биохимическим свойствам осуществляли с помощью Определителя бактерий Берджи, а также Определителя зоопатогенных микроорганизмов. Дифференциальным при-

знаком для грамотрицательных бактерий считали положительный результат по исследованиям на наличие каталазы и отрицательный – в тесте на цитохромоксидазы, окисления и ферментации глюкозы (в среде Хью-Лейфсона), редуцирования нитратов, которые относили к семейству *Enterobacteriaceae*. Для дальнейшей идентификации представителей семейства *Enterobacteriaceae* к роду и виду использовали длинный пестрый ряд, а также индикаторные системы. Определение серовариантов выделенных из патологического материала культур сальмонелл осуществляли в реакции агглютинации (РА) на стекле с помощью набора сальмонеллезных О-комплексных сывороток и монорецепторных О- и Н-агглютинирующих сывороток биофабричного производства в соответствии с инструкцией. Определение серогруппы *E. coli* проводили с помощью набора агглютинирующих О-коли-сывороток. Для идентификации бактерий семейства *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*) культуру пересеивали с пробирки МПБ на среду Кинга и выращивали в термостате при температуре 42 °С. Для дифференциации бактерий рода *Staphylococcus* от рода *Streptococcus* определяли наличие каталазы, а от рода *Micrococcus* – использовали тест на окисление-ферментацию глюкозы (Среда Хью-Лейфсона с глюкозой). Для идентификации *Staphylococcus* проводили тесты на наличие коагулазы, окисления маннита, галактозы, мальтозы, лактозы, сахарозы; способность роста в присутствии 10 % NaCl. Для идентификации видов *Streptococcus* проводили тесты на способность роста в аэробных условиях на воздухе при температуре 10 °С и 45 °С, pH 9,6, в присутствии 6,5 % NaCl, 40 % желчи, гемолиза эритроцитов петуха, ферментации сахаров. В выделенных культурах кишечной палочки, стафилококков и стрептококков определяли вирулентность путем биологической пробы на белых мышах. Для этого каждой выделенной культурой заражали трех белых мышей весом 14–16 г внутрибрюшинно. Культуры считали энтеропатогенными в случае гибели одной или более

мышей в течение двух суток после заражения. За лабораторными животными наблюдали 5 суток, а затем подвергали бактериологическому исследованию [5].

С целью определения наличия возбудителей вирусных заболеваний в патологическом материале использовали общепринятые методы. Для определения наличия вирусов в патологическом материале заражали куриные эмбрионы (10–20 штук) 7-суточной инкубации в желточный мешок 20%-ной суспензией, наблюдали за состоянием и развитием эмбрионов, проводили микроскопию желточного мешка, а также проводили 2–3 «слепых» пассажа в культуре клеток *Vero*. Наличие вируса в патологическом материале определяли по ЦПД [6].

Детекцию РНК коронавируса КРС, ротавируса КРС и вируса диареи КРС, трансмиссивного гастроэнтерита (коронавирус) с помощью полимеразной цепной реакции проводили на базе лаборатории молекулярной эпизоотологии и диагностики ННЦ «ИЭКВМ» (г. Харьков). Изоляцию суммарной РНК и ее обратную транскрипцию проводили с помощью наборов для экстракции РНК и обратной транскрипции производства фирмы «АПЛИСЕНС» (г. Москва). Реакцию амплификации проводили с помощью базовых наборов производства фирмы «АПЛИСЕНС» и систем праймеров BVD V (вирус диареи КРС), Rota B (ротавирус КРС), Corona B (коронавирус КРС). Электрофоретический анализ проведен с помощью набора для электрофореза производства фирмы «АПЛИСЕНС». Концентрация агарозы в геле 1,5 %, напряжение 120 В. Серологические исследования сывороток крови проводили на базе вирусологического отдела ННЦ «ИЭКВМ».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В каждом из 4 хозяйств перед началом опыта проводили клиническое обследование животных: отбор патологического материала от погибшего и вынужденно убитого молодняка. Одновременно анализировали рацион, зоогигиенические и ветеринарные нормы содержания животных. При наблюдении за условиями содержания

молодняка сельскохозяйственных животных установлено, что ни в одном из обследованных хозяйств не соблюдаются ветеринарно-санитарные требования. Родильные отделения в хозяйствах отсутствуют. Телята рождаются непосредственно в коровниках и содержатся в отдельных клетках. Первая дача молозива и молока коровы-матери происходит искусственно с помощью сосковых поилок. С 10–15-суточного возраста телят переводят в телятник, где содержат без привязи. Ветеринарно-санитарное состояние помещений во всех хозяйствах неудовлетворительное. Это связано с тем, что животные разных половозрастных групп содержатся в одном помещении, где нарушен вентиляционный режим. Удаление навоза из помещений проводят один-два раза в сутки. Несколько лет в отдельных хозяйствах не проводится профилактическая дезинфекция, что является следствием экономических проблем в хозяйствах. Все это способствует накоплению и распространению в помещениях бактерий и вирусов, вызывающих желудочно-кишечную патологию. Следует также отметить, что в кормлении сухостойных коров отмечается несбалансированность рациона, выпойка телят первыми порциями молозива осуществляется с большим опозданием (от 6–10 часов), что приводит к ослаблению резистентности новорожденного молодняка. Согласно анализу ветеринарной документации и результатам лабораторных исследований, в опытных хозяйствах не установлено эмерджентных инфекций, а также массовых паразитарных заболеваний.

В хозяйствах проводят только плановые вакцинации против сибирской язвы, а также исследования на лейкоз, туберкулез, бруцеллез. Вышеизложенное свидетельствует о том, что в подопытных хозяйствах существуют благоприятные условия для развития, заселения и повышения вирулентности в желудочно-кишечном тракте молодняка патогенной микрофлоры, что приводит к развитию дисбактериозов и увеличению заболеваемости в первые дни жизни, снижению хозяйственной и пле-

менной ценности животных, а также к снижению экономической прибыли от ведения животноводства. Во время наших исследований установлено, что у телят на 2–10-е сутки жизни наблюдались массовые заболевания желудочно-кишечного тракта. При клиническом осмотре животных отмечали снижение или отсутствие аппетита, угнетенное состояние и общую слабость, больные животные предпочитали лежать, отсутствовала реакция на внешние раздражители. Кожа была сухой, эластичность и чувствительность ее низкая. Волосистой покров взъерошенный, сухой. Глаза впалые. Конечности, уши, носовое зеркало, губы холодные. Видимые слизистые оболочки бледные, с синюшным оттенком. Пульс слабый, от слабо наполненного до нитевидного. Тоны сердца ослаблены. Дыхание прерывистое, учащенное. Температура тела нормальная или в отдельных случаях несколько повышена. Живот подтянутый, при пальпации животное испытывает боль. Перистальтика усилена, при аускультации

прослушиваются бурные шумы. Акт дефекации непроизвольный. Кал жидкий, водянистый, серо-желтого цвета с примесью слизи и газов, в отдельных случаях крови, неприятного запаха. У больных телят быстро прогрессирует обезвоживание и метаболический ацидоз.

Наряду с клиническими, проводили и лабораторные исследования. Изучение состава микробных ассоциаций и взаимоотношений между отдельными сочленами ассоциаций бактерий и вирусов, вызывающих желудочно-кишечные заболевания у новорожденных телят в хозяйствах, где проводили отбор патологического материала от погибших и вынужденно убитых с диагностической целью животных для бактериологических и вирусологических исследований. Как свидетельствуют данные таблицы 1, из патологического материала молодняка КРС были изолированы 18 видов бактерий и 4 вида изолятов вирусов, которые вызывали желудочно-кишечные заболевания.

Таблица 1. – Результаты исследования патологического материала от молодняка КРС (n=221)

Микроорганизмы	Выделено культур, бактерий	
	абсолютное число	%
<i>E. coli</i>	217	30,3
<i>K. pneumoniae sp</i>	69	9,3
<i>Pr. vulgaris</i>	53	7,1
<i>Pr. mirabilis</i>	55	7,4
<i>Ps. aeruginosa</i>	55	7,4
<i>Str. uberis</i>	7	0,9
<i>Str. pyogenes</i>	16	2,2
<i>Str. aureus</i>	51	6,9
<i>St. saprophyticus</i>	10	1,3
<i>Str. pneumoniae</i>	7	0,9
<i>Str. agalactiae</i>	4	0,5
<i>Str. dysagalactiae</i>	3	0,4
<i>Y. enterocolitica</i>	12	1,6
<i>Sl. typhimurium</i>	24	3,2
<i>Sl. dublin</i>	18	2,4
<i>Sl. enteritidis</i>	12	1,6
<i>Sl. choleraesuis</i>	25	3,4
<i>Sl. typhisuis</i>	14	1,9
Изоляты		
Вирус диареи КРС	24	3,2
Ротавирус КРС	14	1,9
Коронавирус КРС	11	1,5
ТГЕС	15	2,0
Всего	716	96,2

Чаще всего в этиологии заболеваний желудочно-кишечного тракта молодняка участвовала *E. coli* в (30,3 %). Сальмонеллы сероваров *Sl. typhimurium*, *Sl. dublin*, *Sl. enteritidis* *Sl. choleraesuis* *Sl. typhisuis* выявлены в 9,3 % от общего количества выделенных культур. Что касается другой микрофлоры, то необходимо отметить, что стафилококки, стрептококки, иерсинии, клебсиелла и *Proteus* идентифицировали значительно реже. Из патологического материала были выделены изоляты вирусов у 8,6 %. Наши исследования свидетельствуют о том, что доминирующее место в этиологии заболеваний желудочно-кишечного тракта новорожденных телят занимают патогенные микроорганизмы.

В исследуемых хозяйствах за 2012–2019 годы нами был исследован патологический материал от 74 погибших или вынужденно убитых с диагностической целью голов молодняка крупного рогатого скота и 25 образцов фекалий от больных телят. При заболевании телят неонатального возраста отмечали поражения органов

желудочно-кишечного тракта. Чаще всего изолировали *E. coli* (31,68 %), *Salmonella spp.* (12,87 %), *Ps. aeruginosa* (12,38 %), *Pr. vulgaris* (8,42 %), *Pr. mirabilis* (6,93 %), *Srt. pyogenes* (7,43 %), *Str. aureus* и *K. pneumoniae spp.* (3,96 %), *Sl. pneumoniae* (3,47 %), *St. saprophyticus* (2,97 %), *Sl. uberis* (2,48 %). В меньшем количестве встречались *St. agalactiae* (1,98 %), *St. dysgalactiae* (1,49 %). Значение места локализации микроорганизмов в макроорганизме и патологическое действие на тот или иной орган позволяет сделать заключение об ассоциированных инфекциях и смешанных формах заболеваний, облегчает поиск лечения и профилактики болезней молодняка. По месту выделения микроорганизмы были распределены следующим образом (таблица 2).

Наибольшее количество культур было выделено из лимфоузлов (54 изолята), что составляет 26,73 %, по 39 культур – из селезенки и кишечника (19,31 %), 25 культур – из печени (12,38 %), а из почек – только 10 культур (4,95 %).

Таблица 2. – Бактерии, выделенные из патологического материала телят

Микроорганизмы	Внутренние органы						Фекалии	Всего	%
	печень	селезенка	сердце	лимфатические узлы	почки	кишечник			
<i>E. coli</i>	2	10	6	18	5	14	9	64	31,68
<i>Ps. aeruginosa</i>	1	3	1	8	1	7	4	25	12,38
<i>Pr. vulgaris</i>	6	5	1	3	-	2	-	17	8,42
<i>Pr. mirabilis</i>	2	6	-	3	1	2	-	14	6,93
<i>St. pyogenes</i>	3	3	1	2	-	4	2	15	7,43
<i>St. aureus</i>	1	1	-	3	-	2	1	8	3,96
<i>S. pneumoniae</i>	1	2	-	2	-	2	-	7	3,47
<i>S. saprophyticus</i>	1	1	-	3	-	1	-	6	2,97
<i>S. uberis</i>	-	1	-	2	-	1	1	5	2,48
<i>S. agalactiae</i>	-	-	-	2	-	1	1	4	1,98
<i>S. dysagalactiae</i>	-	1	-	2	-	-	-	3	1,49
<i>K. pneumoniae sp</i>	2	1	1	1	-	1	2	8	3,96
<i>Sl. enteritidis</i>	6	5	3	5	3	2	2	26	12,87
Всего	25	39	13	54	10	39	22	202	
%	12,37	19,31	6,44	26,73	4,95	19,31	10,89		100

Анализируя данные таблицы 2, видим, что в хозяйствах заболевания желудочно-кишечного тракта телят чаще всего вызывали бактерии из семейства *Enterobacteriaceae* (63,86 %), в том числе кишеч-

ную палочку выделяли в 64 случаях (31,68 %) от общего количества культур. Всего нами идентифицированы 11 серовариантов *E. coli* (таблица 3).

Таблица 3. – Серогруппы культур *E. coli*, изолированные от телят

Серогруппы	Выделено культур	
	абсолютное число	%
<i>O1</i>	4	6,25
<i>O8</i>	2	3,13
<i>O9</i>	12	18,75
<i>O15</i>	4	6,25
<i>O26</i>	15	23,44
<i>O33</i>	6	9,38
<i>O41</i>	5	7,81
<i>O78</i>	2	3,13
<i>O101</i>	9	14,06
<i>O111</i>	2	3,13
<i>O119</i>	3	4,69
Всего	64	100,0

Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее распространена в исследуемых хозяйствах культура *E. coli* серогрупп *O26* (23,44 %), *O9* (18,75 %), *O101* (14,06 %), *O33* (9,38 %), *O41* (7,81 %), *O15* и *O1* (6,25 %). Другие серогруппы эшерихий, в частности *O8*, *O78*, *O111*, *O119*, были изолированы в меньшем количестве и, по нашим данным, составляли 3,13 %.

От больных новорожденных телят в хозяйствах нами выделено и идентифицировано 26 культур сальмонелл. Было установлено, что чаще всего в этиологии желудочно-кишечных заболеваний телят участвуют сальмонеллы сероваров *S. typhimurium* (46,15 %), *S. dublin* (34,62 %), *S. enteritidis* (19,23 %) (таблица 4).

Таблица 4. – Виды сальмонелл, выделенные от телят (n=74)

Сальмонеллы	Выделено культур	
	абсолютное число	%
<i>S. typhimurium</i>	12	46,15
<i>S. dublin</i>	9	34,62
<i>S. enteritidis</i>	5	19,23
Всего	26	100

Проведенные нами экспериментальные исследования в хозяйствах показали, что желудочно-кишечные заболевания новорожденных телят вызываются полиэтиологическими факторами.

Параллельно с бактериологическими проводили вирусологические исследования патологического материала от молодняка крупного рогатого скота на наличие вирусной диареи КРС, коронавируса КРС, ротавируса КРС. Были получены следую-

щие результаты. При проведении серологических реакций осуществляли определение АТ к вирусной диарее КРС, коронавирусу КРС, ротавирусу КРС. Титр АТ в сыворотке крови телят в разных хозяйствах колебался и составлял 1:32–1:8 с постепенным снижением на 14-е сутки до 1:4. После заражения куриных эмбрионов патологическим материалом не наблюдали изменений в развитии: эмбрионы остались живы, патологических изменений эмбрио-

нов и желточного мешка не найдено; микроскопия желточного мешка отрицательная. После заражения культуры клеток и проведения «слепых» пассажей ЦПД не устанавливали. При проведении серологических исследований крови от молодняка крупного рогатого скота были получены следующие данные: титр АТ к возбудителю вирусной диареи крупного рогатого скота встречали в 25 % случаев, рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота – в 17 % и 11 % случаев соответ-

ственно из 70 исследованных образцов крови.

При изучении вирусной этиологии болезней желудочно-кишечного тракта нами были исследованы пробы патологического материала от погибших и убитых с диагностической целью телят с помощью ПЦР. Исследования проводились на наличие *Pestivirus* (вирусная диарея крупного рогатого скота), *Rotavirus* (ротавирус КРС), *Coronavirus* (коронавирус КРС). Результаты исследований приведены в таблице 5.

Таблица 5. – Выявление генома вирусов методом ПЦР от телят из опытных хозяйств (n=40)

Вирусы	Выявлено	
	абсолютное число	%
Вирус диареи КРС	24	49,0
Ротавирус КРС	14	28,6
Коронавирус КРС	11	22,4
Всего	49	100

Таким образом, в ходе исследования патологического материала методом ПЦР нами были идентифицированы вирусы *Pestivirus* в 49,0 % случаев, *Rotavirus* – в 28,6 %, *Coronavirus* – в 22,4 % случаях изучаемого материала.

Наличие серопозитивных животных в хозяйстве может свидетельствовать о циркуляции данных возбудителей среди поголовья. Это говорит о том, что вирусные факторы могут принимать участие в этиологии заболеваний желудочно-кишечного тракта телят в исследуемых хозяйствах.

Приведенные выше данные подтверждают, что желудочно-кишечные заболевания новорожденных телят в исследуемых хозяйствах вызываются бактериями и вирусами. Бактерии встречаются в монокультурах и в ассоциациях как между собой, так и с вирусами. При бактериальном исследовании в хозяйствах Днепропетровской области было выделено и идентифицировано 89 ассоциаций микроорганизмов. Выделенные ассоциации микроорганизмов при желудочно-кишечных заболеваниях телят составляли 44,94 % в различных вариациях, где, как правило, встречались два патогенных агента. Чаще всего встречались *E. coli* + *Pr. Vul-*

garis (10,11 %), *E. coli* + *S. pyogenes* (5,62 %), *Sal. typhimurium* + *Pr. mirabilis* и *E. coli* + *Pr. mirabilis* (4,49 %), *E. coli* + *Ps. Aeruginosa*, *E. coli* + *S. pneumoniae* (3,37 %), *Sal. typhimurium* + *Ps. aeruginosa*, *Sal. dublin* + *S. pyogenes*, *Sal. dublin* + *E. coli*, *S. saprophyticus* + *S. pneumoniae*, *E. coli* + *S. dysagalactiae* (2,25 %), в меньшем количестве встречались *Sal. enteritidis* + *K. pneumoniae spp.*, *E. coli* + *K. pneumoniae spp* (1,12 %).

Ассоциации микроорганизмов из трех или более сочленов встречались значительно реже, а именно в 21,35 % от общего количества: *Pr. vulgaris* + *Ps. Aeruginosa* + *E. coli*, *E. coli* + *Ps. aeruginosa* + *K. pneumoniae spp.*, *E. coli* + *Pr. mirabilis* + *Ps. aeruginosa* встречались в 3,37 % случаев, *E. coli* + *Pr. mirabilis* + *S. uberis*, *E. coli* + *S. pyogenes* + *Ps. aeruginosa*, *E. coli* + *S. uberis* + *S. pyogenes*, *S. saprophyticus* + *S. pneumoniae* + *Sal. Typhimurium* – в 2,25 %, *Staph. aureus* + *Sal. Enteritidis* + *K. pneumoniae spp.*, *Sal. dublin* + *Pr. vulgaris* + *Strept. agalactiae* – в 1,12 %.

Вместе с бактериями из патологического материала от телят в ассоциациях методом ПЦР были выделены энтеропатогенные вирусы. От общего количества идентифицированных ассоциаций от пав-

ших телят, больных желудочно-кишечными заболеваниями, доля ассоциаций бактерий и вирусов составляла 33,71 %. Чаще всего в 20,22 % идентифицировали ассоциации микроорганизмов с *Pestivirus* (вирус диареи КРС). Встречались также такие ассоциации, как *Pestivirus* + *E. coli* + *Staph. aureus* (3,37 %), *Pestivirus* + *E. coli*, *Pestivirus* + *E. coli* + *Pr. vulgaris*, *Pestivirus* + *Ps. aeruginosa* + *Staph. aureus*, *Pestivirus* + *Sal. Enteritidis* + *Ps. aeruginosa* (2,25 % случаев).

В 14,61 % случаев в хозяйствах идентифицировали *Rotavirus* КРС, в 2,25 % встречались *Rotavirus* КРС + *Sal. dublin* + *E. coli*, *Rotavirus* КРС + *E. coli* + *Ps. aeruginosa*, *Rotavirus* КРС + *Sal. Typhimurium* + *K. pneumoniae spp* и *Rotavirus* КРС + *E. coli* + *Staph. aureus* (1,12 %). *Coronavirus* КРС в ассоциациях встречался в 10,10 % случаев, а именно *Coronavirus* КРС + *E. coli* + *Ps. aeruginosa*, *Coronavirus* КРС + *E. coli* + *Pr. mirabilis* в 2,25 %, *Coro-*

navirus КРС + *Sal. dublin* + *Strept. agalactiae*, *Coronavirus* КРС + *S. Saprophyticus* + *Strept. agalactiae* в 1,12 %.

В 7,87 % случаев в идентифицированные ассоциации входили несколько вирусных агентов. Чаще всего встречались *Rotavirus* КРС + *Pestivirus* + *Pr. vulgaris*, *Rotavirus* КРС + *Pestivirus* + *E. coli*, *Rotavirus* КРС + *Pestivirus* + *Coronavirus* + *S. pyogenes* (2,25 %), *Rotavirus* КРС + *Pestivirus* + *Coronavirus* КРС + *Sal. typhimurium* (1,12 %). Патогенность выделенных культур бактерий исследовали в опытах на мышах. Изученные культуры показали ярко выраженные энтеропатогенные свойства.

Таким образом, при желудочно-кишечных заболеваниях телят в исследуемых хозяйствах идентифицировали ассоциации бактерий и вирусов в 91,6 % случаях. Ассоциации распределены следующим образом (рисунок 1).

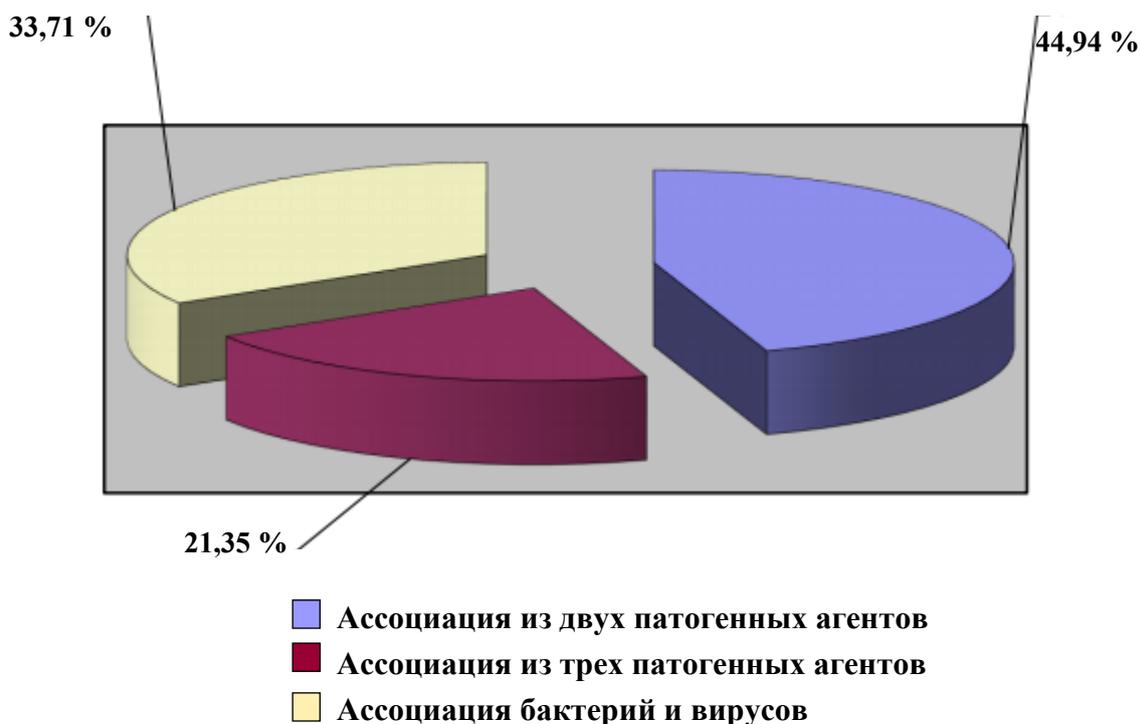


Рисунок. – Соотношение ассоциаций паразитирующих агентов у телят

Как видно из представленного рисунка, ассоциации, в которые входили два патогенных агента, выявлены в 44,94 %

случаев, три – встречались в 21,35 %, а с вирусами – в 33,71 % случаев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена эпизоотическая ситуация по желудочно-кишечным заболеваниям телят, вызванным бактериями и вирусами. Установлена этиологическая структура возбудителей и распространения бактериальных и бактериально-вирусных ассоциаций при энтеритах телят в исследуемых хозяйствах.

Полученные нами результаты доказывают, что ведущее место в этиологии заболеваний желудочно-кишечного тракта новорожденных животных занимают ассоциации бактерий и вирусов. От телят с синдромом диареи выделено 18 видов бактерий и идентифицировано 4 вида вирусов,

вызвавших заболевание. Наибольшую долю в этиологии заболеваний желудочно-кишечного тракта молодняка занимали такие бактерии, как *E. coli*, сальмонеллы, стафилококки, стрептококки, иерсинии, клебсиеллы, протей же идентифицировали значительно реже. Также выделяли и некоторые виды вирусов рода *Rotavirus*, *Coronavirus*, *Enterovirus*, *Reovirus*. Ассоциации микроорганизмов при желудочно-кишечных заболеваниях телят с двумя патогенными агентами составляли 44,94 %, из трех или более сочленов – 21,35 %; ассоциации, в которые входили вирусные агенты, составляли 33,71 % в различных вариациях.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities* / V. Bunesova [et al.] // *Benef Microbes*. – 2014. – Vol. 5. – № 4. – P. 377–388.
2. Eriksson, E. *Verotoxinogenic Escherichia coli O157:H7 in Swedish Cattle and Pigs : Doctoral Thesis* / E. Eriksson. – Uppsala, 2010. – 92 p.
3. *Identification of species belonging to the Bifidobacterium genus by PCR-RFLP analysis of a hsp60 gene fragment* BMC Microbiology / L. Baffoni [et al.] // *Mattarelli, B. Biavati*. – 2013. – Vol. 13. – 149 p.
4. *Influence of probiotic drugs BPS-44 and BPS-L on the acid-base balance in the calf blood* / V. O. Aheiev [et al.] // *Mikrobiol Z.* – 2010. – Vol. 72. – № 1. – P. 24–28.
5. *Методические рекомендации по диагностике, профилактике и лечению желудочно-кишечных болезней новорожденных телят* / А. В. Иванов [и др.]. – Казань, 2011. – 39 с.
6. Сюрин, В. Н. *Ветеринарная вирусология* / В. Н. Сюрин, Р. В. Белоусова, Н. В. Фомина. – М.: Агропромиздат, 1991. – 431 с.

Средство диагностическое**«БЕЛОМАСТИН М»**

- аналог Керба теста (Kerba TEST) и Калифорнийского мастит-теста (СМТ)
- предназначено для выявления воспалительных процессов в вымени у коров при начальных, скрытых и хронических формах мастита, определения сортности молока и контроля результатов лечения больных маститами животных



• высокая диагностическая эффективность (от 250 тыс. до 1 500 тыс. и выше соматических клеток в 1 см³ молока)

- простота и надежность диагностики
- доступная цена

WWW.BIEVM.BY



УДК 619:615.371:636.22/.28

Згировская А.А., кандидат биологических наук
Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент
Герасименко В.И., ведущий технолог
Зуйкевич Т.А., старший научный сотрудник

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

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЯЕМЫХ ИНАКТИВИРОВАННЫХ И ЖИВЫХ ВАКЦИН И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПУТЕЙ ЕЕ ПОВЫШЕНИЯ

Резюме

В статье представлены результаты исследований иммуногенной активности вакцин производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» в сравнении с зарубежными аналогами, а также данные по повышению эффективности отечественных вакцин.

Summary

The article presents the results of studies of the immunogenic activity of vaccines produced by RUE «Institute of Experimental Veterinary Medicine named after S.N. Vyshellessky» in comparison with foreign analogues, as well as data on increasing the effectiveness of domestic vaccines.

Поступила в редакцию 29.10.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

Эффективность иммунопрофилактики многих инфекционных болезней животных доказана многолетней мировой практикой. Сегодня представляется бесспорным тот факт, что вакцинопрофилактика является наиболее мощным методом борьбы с инфекционной патологией. Идеальная вакцина должна соответствовать двум основным требованиям: она должна быть безопасной и высокоэффективной. Кратность введения вакцины должна быть минимальной, при этом вакцина должна вызывать длительный и стойкий иммунный ответ [2, 3, 5, 6].

В настоящее время в животноводческих хозяйствах сложилась ситуация, при которой на фоне неблагоприятных факторов окружающей среды, нарушения условий содержания и кормления животных, первичных и вторичных иммунодефицитов молодняка эффективность проводимых вакцинаций находится на уровне 50–70 % [8].

Несмотря на большие успехи в области совершенствования существующих вакцин и разработки новых препаратов, дли-

тельность иммунитета, возникающего после введения большинства вакцин, мала даже при условии многократного введения одной и той же вакцины. Для некоторых вакцин она составляет всего от 6 месяцев до 1 года.

Кроме того, при многократном введении вакцин у животных возникает стресс, который неблагоприятно сказывается на состоянии здоровья, часто возникают воспалительные процессы, повышение температуры. Побочное действие вакцинации можно уменьшить, если увеличить сроки иммуногенности вакцин, уменьшить объем вводимой вакцины [2, 3, 6].

Для определения путей повышения иммуногенности вакцин, выпускаемых институтом РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», нам необходимо было установить их эффективность в сравнении с зарубежными аналогами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Испытания эффективности живых и инактивированных вирусных вакцин про-

водились по показателю иммуногенной активности на поголовье крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Борисовского района Минской области, в которых регистрировались инфекционные пневмоэнтериты молодняка крупного рогатого скота.

Для проведения исследований использовали 2 вакцины производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»:

- живая трехвалентная вирус-вакцина против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и парагриппа-3 крупного рогатого скота;

- вирус-вакцина поливалентная инактивированная против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота- и корона-вирусной инфекции крупного рогатого скота «Тетравак».

Изучение иммуногенной активности вакцин производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» проводили в сравнении с зарубежными аналогами. В качестве производственных аналогов живой трехвалентной вирус-вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и парагриппа-3 крупного рогатого скота (опытная группа № 1) использовали вакцину:

- «Бови-шилд Голд FP5 L5» («Pfizer Animal Health», США) – опытная группа № 2;

- «Кэтлмастер Голд FP5 L5» («Pfizer Animal Health», США) – опытная группа № 3;

- вакцину против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита (Ставропольская биофабрика, РФ) – опытная группа № 4.

В качестве аналогов биопрепарата «Вирус-вакцина поливалентная инактивированная против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота- и корона-вирусной инфекции крупного рогатого скота “Тетравак”» (опытная группа № 1) использовали вакцину:

- «Скоугард 4КС» («Pfizer Animal Health», США) – опытная группа № 2;

- «Ротавек-корона» («Интервет Интернешнл Б.В.», Нидерланды) – опытная группа № 3;

- «Хипрабровис-4» («Лабораториос Хипра С.А.», Испания) – опытная группа № 4;

- «Комбовак» (Нарвак, РФ) – опытная группа № 5.

Все вакцины применяли согласно утвержденным инструкциям по их применению.

Для испытаний нами были сформированы группы животных по 10 голов в каждой, у которых были отобраны пробы крови до введения вакцины и через 21 день после вакцинации для получения сыворотки и проверки наличия антител к вирусам инфекционного ринотрахеита (ИРТ), вирусной диареи (ВД), парагриппа-3 (ПГ-3), рота- (РВ) и коронавирусам (КВ).

Сыворотку крови готовили по общепринятой методике: собранную кровь термостатировали в течение 1 часа при температуре плюс 37 °С. Пипеткой Пастера отделяли сгусток от стенок пробирки с тем, чтобы облегчить его последующую ретракцию. Пробирки с кровью выдерживали в холодильнике при температуре плюс 4 °С в течение 10 часов, после чего сыворотку и эритроциты декантировали, эритроциты осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 20 минут. Полученную сыворотку использовали для выявления антител к вирусам инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, рота- и коронавирусам в реакции нейтрализации.

Для постановки реакции нейтрализации сыворотки крови инактивировали при температуре плюс 56 °С в течение 30 минут. Готовили двукратные разведения сывороток с 1:2 до 1:64. Приготовленные разведения сывороток соединяли с соответствующим вирусом в дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 см³, смесь инкубировали в течение 1 часа при температуре плюс 37 °С, после чего переносили в планшеты с выращенным монослоем клеток MDBK или СПЭВ. Учет реакции проводили путем микроскопирования монослоя спустя 2 суток после постановки реакции нейтрализации. Для постановки реакции нейтрализации использовали объединенные пробы сывороток от жи-

вотных опытных и контрольных групп.

Титр антител к вирусам инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, ротавируса, парагриппа-3 крупного рогатого скота вычисляли по общепринятой методике Рида и Менча и выражали в логарифмах с основанием 2 (\log_2).

Для определения влияния рН на репродукцию вируса по окончании культивирования клеток Таурус-2 меняли ростовую среду на поддерживающую со значениями рН 6,3–6,5; 6,9–7,1; 7,2–7,4; 7,9–8,1. Затем отключали термостат и выдерживали культуры клеток в течение 18–20 часов. Перед заражением клеток сливали поддерживающую среду и вносили вирус в дозе 0,1–0,5 ТЦД₅₀ на клетку. После часового контакта заливали поддерживающую среду со стандартным значением рН 7,2–7,4. Результаты

учитывали визуально по степени поражения монослоя, а также в ИФА и титровании на культуре клеток.

Очистку накопленного вирусосодержащего материала от клеточного детрита осуществляли низкоскоростным центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 минут. Предварительно вирусосодержащий материал подвергали процедуре замораживания-оттаивания для полноты выхода вируса из клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты испытаний эффективности вакцин производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» в сравнении с зарубежными аналогами представлены в таблицах 1–3.

Таблица 1. – Динамика титров поствакцинальных антител у телят 1–3-месячного возраста после применения живой трехвалентной вирус-вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и парагриппа-3 крупного рогатого скота в сравнении с зарубежными аналогами

Сроки взятия крови	Группа животных	Титр антител, \log_2		
		ИРТ	ВД	ПГ-3
До введения	опытная группа № 1	2,0	2,0	1,0
	опытная группа № 2	1,0	1,0	2,0
	опытная группа № 3	1,0	1,0	2,0
	опытная группа № 4	1,0	-	1,0
	контрольная группа	2,0	2,0	2,0
Через 21 день после первичной иммунизации	опытная группа № 1	4,0	5,0	4,0
	опытная группа № 2	5,0	6,0	6,0
	опытная группа № 3	6,0	5,0	6,0
	опытная группа № 4	4,0	-	3,0

Как видно из таблицы 1, применение живой трехвалентной вирус-вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и парагриппа-3 крупного рогатого скота приводило к образованию антител в сыворотке крови 1–3-месячных телят (титр антител составлял 4,0–5,0 \log_2). Этот титр антител является достаточным, чтобы защитить животных от вышеперечисленных инфекций. Однако следует заметить, что титр противовирусных антител, образованных при иммунизации отечественной

вакциной (группа № 1), на 1,0–2,0 \log_2 уступает титрам антител в сыворотке крови животных, вакцинированных зарубежными аналогами, в частности вакцинам «Бови-шилд Голд FP5 L5», «Кэтлмастер Голд FP5 L5».

Исключение составляет вакцина против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита производства Ставропольской биофабрики, Российская Федерация. Уровень антител к ИРТ, образованных при иммунизации вакциной производства Ставро-

польской биофабрики, составлял $4 \log_2$, что совпадает с уровнем антител у телят, вакцинированных живой трехвалентной вирус-вакцины против инфекционного ринотрахе-

ита, вирусной диареи и парагриппа-3 крупного рогатого скота (опытная группа № 1), и на $1 \log_2$ ниже в отношении ВД.

Таблица 2. – Динамика титров поствакцинальных антител у сухостойных коров за 1,5–2 месяца до отела после применения биопрепарата «Вирус-вакцина поливалентная инактивированная против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота- и коронавируса инфекции крупного рогатого скота “Тетравак”» в сравнении с зарубежными аналогами

Сроки взятия крови	Группа животных	Титр антител, \log_2			
		ИРТ	ВД	РВ	КВ
До введения	опытная группа № 1	1,0	2,0	2,0	1,0
	опытная группа № 2	-	-	1,0	2,0
	опытная группа № 3	-	-	2,0	1,0
	опытная группа № 4	1,0	1,0	-	-
	опытная группа № 5	1,0	1,0	2,0	1,0
	контрольная группа	2,0	1,0	1,0	2,0
Через 21 день после первичной иммунизации	опытная группа № 1	4,0	5,0	5,0	4,0
	опытная группа № 2	-	-	5,0	7,0
	опытная группа № 3	-	-	6,0	6,0
	опытная группа № 4	5,0	6,0	-	-
	опытная группа № 5	3,0	4,0	5,0	3,0

Данные таблицы 2 свидетельствуют о выраженном приросте титров специфических антител после применения биопрепарата «Вирус-вакцина поливалентная инактивированная против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота- и коронавируса инфекции крупного рогатого скота “Тетравак”». При этом в сравнении с зарубежными аналогами (за исключением вакцины «Комбовак») изучаемая вакцина уступала по уровню антител в сыворотке крови на $1,0-3,0 \log_2$.

Как видно из результатов проведенных исследований, живая трехвалентная вирус-вакцина против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и парагриппа-3 крупного рогатого скота «Тетравак» уступает по эффективности некоторым зарубежным аналогам, однако ее применение приводит к формированию напряженного иммунитета, достаточного, чтобы предотвратить развитие заболевания у животных. Несмотря на это, вопрос о повышении иммуногенности отечественных вакцин является актуальным [4].

Следующий этап работы заключался в подборе линий перевиваемых культур клеток, в которых накопление вирусного материала будет максимальным, и в подборе параметров культивирования. На данном этапе культивирование вирусов проводили стационарным способом в матрасах.

При культивировании вируса диареи крупного рогатого скота важным моментом является сыворотка, которую используют как компонент ростовой среды. Чаще всего используют сыворотку крупного рогатого скота, а такая сыворотка, как правило, содержит антитела ко многим кишечным вирусам, в том числе и к вирусной диарее, что существенно снижает накопление вируса. Поэтому перед использованием сыворотки крупного рогатого скота необходимо проверять ее на наличие антител к вирусной диарее или использовать фетальную сыворотку, свободную от антител. Из литературных источников известно, что сыворотка северных оленей также свободна от антител к вирусной диарее [7].

Кроме того, при хранении следует обращать внимание на то, что многократное замораживание и оттаивание вирусного антигена снижает его вирулентность и иммуногенность. Оттаявшую суспензию повторно замораживали-оттаивали и после оттаивания отбирали пробы для определения инфекционной активности вируса, которую определяли методом титрования на

96-луночных планшетах с выращенным монослоем клеток, в которых проводили накопление вируса. Для следующего пассажа в качестве матровой раскладки использовали пробы с наибольшим титром.

Результаты изучения чувствительности перевиваемых культур клеток к вирусу диареи штамма «КМИЭВ-7» представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Чувствительность перевиваемых культур клеток к вирусу диареи крупного рогатого скота штамма «КМИЭВ-7»

Культура клеток	№ пассажа	Время культивирования, ч	Титр, lg ТЦД _{50/мл}
МДВК	4	96	4,5–5,5
Таурус-2	5	96	6,8–7,0
ПС	5	96–120	6,6–6,7

Как видно из данных таблицы 3, наиболее технологичными и продуктивными оказались перевиваемые культуры клеток Таурус-2 и ПС. В этих клетках к 5-му пассажу за 96–120 часов вирус накапливался на уровне 6,5–7,0 lg ТЦД_{50/мл}. Культура клеток МДВК оказалась менее чувствительной. Титр вируса в этой культуре составлял 4,5–5,5 lg ТЦД_{50/мл}.

Изготовление вакцин требует большого объема вирусного сырья, и вопрос повышения урожайности вируса всегда остается актуальным. Кроме того, важной

остается задача повышения чувствительности клеток к вирусу, что позволяет устранить вероятность его модификации, так как в клетках с низкой чувствительностью только небольшая часть вирусной популяции способна репродуцироваться при условиях, отличающихся от оптимальных. Нами было установлено, что рН на репродукцию вируса диареи оказывает огромное влияние.

Результаты влияния рН среды на репродукцию вируса диареи крупного рогатого скота представлены в таблице 4.

Таблица 4. – Влияние рН среды на репродукцию вируса диареи крупного рогатого скота в культуре клеток Таурус-2

рН поддерживающей среды	Методы определения	Титр вируса				
		пассаж				
		1	2	3	5	7
6,3–6,5	lg ТЦД _{50/мл}	4,1	6,0	7,3	7,9	8,1
	ИФА (log ₂)	4,8	6,6	7,8	8,6	8,9
6,9–7,1	lg ТЦД _{50/мл}	4,0	5,0	6,3	7,0	7,1
	ИФА (log ₂)	4,1	6,0	6,8	7,4	7,3
7,2–7,4	lg ТЦД _{50/мл}	3,8	4,5	6,5	6,8	6,6
	ИФА (log ₂)	4,3	5,3	6,9	7,1	7,0
7,9–8,1	lg ТЦД _{50/мл}	2,5	2,5	3,8	4,6	4,7
	ИФА (log ₂)	2,0	3,3	4,8	5,3	5,3

Так, нами установлено, что экспозиция клеток в течение 18–20 часов при кислотном значении рН (6,3–6,5) среды до инфицирования их вирусом сопровождается,

начиная со 2-го пассажа, возрастанием инфекционной и антигенной активности вируса до 6,0 lg ТЦД_{50/мл} и 6,6 log₂ в ИФА соответственно. С увеличением количе-

ства пассажей до 7 титр вируса увеличивается до 8,1 lg ТЦД_{50/мл} и 8,9 log₂ в ИФА. При этом сокращается время культивирования до 72 часов. Эти показатели выше результатов, полученных при нейтральном значении pH, на 1,5 log₂.

Таким образом, подготовительный этап перед заражением клеток вирусом с использованием слабокислой среды повышал чувствительность клеток к инфициро-

ванию и влиял на уровень накопления возбудителя.

Ротавирус крупного рогатого скота (штамм «КМИЭВ-3») культивировали в культурах клеток СПЭВ, Таурус-2, Марс-145, Vero, MDBK.

Результаты изучения чувствительности перевиваемых культур клеток к ротавирусу крупного рогатого скота представлены в таблице 5.

Таблица 5. – Результаты изучения чувствительности перевиваемых клеток к штамму «КМИЭВ-3» ротавируса

Культура клеток	Время репродукции, ч	Инфекционная активность, lg ТЦД _{50/мл}		Титр в ИФА (после обработки трипсином), log ₂
		до обработки трипсином	после обработки трипсином	
СПЭВ	24–30	5,5–6,0	7,0–7,5	7,0–7,5
Таурус-2	24	4,5–5,0	6,5–7,0	6,5–7,0
Марс-145	24	4,5–5,0	6,0–6,5	6,0–6,5
Vero	48	3,5–4,0	5,5–6,0	6,0–6,5
MDBK	24	5,5–6,0	6,0–6,5	6,0–6,5

Как видно из данных, представленных в таблице 6, наиболее чувствительной биологической моделью для накопления ротавируса является перевиваемая культура клеток СПЭВ. Инфекционная активность вируса составила 7,0–7,5 lg ТЦД_{50/мл} после обработки его трипсином. Из наших исследований видно, насколько важно правильно подобрать параметры культивирования вируса. Титр необработанного вируса составил 5,5–6,0 lg ТЦД_{50/мл}, что на 1,5 lg ниже по сравнению с обработанным вирусом.

Аналогичные исследования по подбору оптимальной биологической системы для накопления вируса и подбору параметров культивирования были проведены для коронавируса, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3 и миксомы кроликов.

Было установлено, что наиболее чувствительной культурой клеток для культивирования коронавируса, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3 является MDBK.

Очистка при получении инактивированных (убитых) вакцин является важным этапом, так как убитый вирус не репродуцируется в организме, и для получения до-

статочно интенсивного иммунного ответа необходимо вводить при вакцинации значительное количество вирусосодержащего материала. Суспензия вируса, используемая для изготовления вакцин, обычно содержит значительные количества компонентов клеток, которые оказывают дополнительную нагрузку на иммунную систему организма, поэтому вирусные суспензии должны быть очищены от балластных агентов (обычно используют низкоскоростное центрифугирование).

Одной из проблем получения инактивированных вакцин является изыскание безупречного способа инактивации вирусов, обеспечивающего необратимое повреждение его репликативного механизма при полном сохранении исходной антигенной структуры.

Для получения инактивированных вакцин в качестве инактиванта широко используют формалин, гидроксиламин, бета-пропиолактон, теотропин, аминоэтилэтиленимин (АЭЭИ). Все перечисленные инактиванты имеют как свои достоинства, так и недостатки.

Все реагенты, которые используют для инактивации вирусов, должны активно

реагировать с компонентами нуклеиновых кислот, т.е. являться сильными мутагенами. Поэтому избыток инактиванта по окончании реакции должен быть полностью удален или переведен в неактивную форму.

Установлено, что наиболее подходящими инактивантами являются 0,2%-ный теотропин и 0,1%-ный аминоэтилэтиленимин (АЭЭИ).

В повышении иммуногенности инаktivированных вакцин важная роль принадлежит адьювантам. Несмотря на значительные успехи в создании инаktivированных вакцин, многие из них пока не обеспечивают такой напряженной и длительной защиты, как живые. Но против некоторых болезней созданы достаточно эффективные инаktivированные вирусные вакцины, являющиеся на сегодня единственно приемлемыми препаратами для специфической профилактики [1].

Иммуногенность инаktivированной вакцины в значительной степени зависит от наличия и вида адьюванта. Были созданы образцы поливалентной инаktivированной вакцины, содержащей вирусы ринотрахеита, вирусной диареи, рота- и коронавируса, с использованием адьювантов нового поколения Montanide ISA 61 VG,

Montanide ISA 201 VG, Montanide ISA 50 V2. В качестве контроля сконструировали образцы вакцины с применением Montanide ISA 15 VG, Montanide ISA 206 VG, которые использовались ранее для изготовления эмульгированных вакцин.

При изготовлении вакцины, а именно при подборе соотношения вирусного компонента и эмульгатора, мы придерживались рекомендаций производителя. Так, при изготовлении вакцины с Montanide ISA 61 VG и Montanide ISA 50 V2 адьюванты добавляли в процентном соотношении 60 и 50 по весу соответственно. Соотношение Montanide ISA 201 VG и Montanide ISA 206 VG составляло 50 % по объему. Montanide ISA 15 VG добавлялся в количестве 15 %, а вирусный компонент составлял 85 %.

Вязкость является важнейшей физической константой, характеризующей свойства адьювантов. Чем ниже вязкость адьюванта, тем легче ввести его животному, тем меньшую травму оно получит, а следовательно, и меньший стресс. Как правило, адьюванты с меньшей вязкостью менее реактогенны.

Результаты определения вязкости приготовленных эмульсий представлены в таблице 6.

Таблица 6. – Определение вязкости поливалентной вакцины против ринотрахеита, вирусной диареи, рота- и коронавируса, приготовленной с использованием различных адьювантов

Показатель	Montanide ISA 201 VG	Montanide ISA 206 VG	Montanide ISA 15 VG	Montanide ISA 61 VG	Montanide ISA 50 V2
Вязкость, мПа·с	40 при 25 °С	120 при 25 °С	20 при 25 °С	40 при 25 °С	200 при 25 °С

Как видно из таблицы 6, наименьшей вязкостью обладают адьюванты Montanide ISA 201 VG, Montanide ISA 61 VG и Montanide ISA 15 VG по сравнению с ранее используемыми эмульгаторами. Эксперимент проводился при комнатной температуре 25 °С. Температура имеет большое значение, так как ее понижение приводит к увеличению вязкости.

Для того чтобы определить, какой эмульгатор следует использовать в дальнейшем в конструировании поливалентной вакцины, проведены исследования по оп-

ределению реактогенности изготовленных образцов.

Реактогенность полученных эмульсий проверяли на кроликах и морских свинках.

При исследовании места введения образцов вакцины установлено, что введение препарата, содержащего Montanide ISA 61 VG, Montanide ISA 201 VG и Montanide ISA 15 VG, не вызывало никаких побочных явлений. В то же время введение вакцины с Montanide ISA 50 V2 и Montanide ISA 206 VG вызывало небольшую отечность в месте введения.

Нами были проведены исследования сывороток крови на наличие антител к вирусам ринотрахеита, вирусной диареи, рота- и коронавирусам. Антитела к вирусам инфекционного ринотрахеита, вирус-

ной диареи, рота- и коронавирусам определяли в реакции нейтрализации.

Результаты определения вируснейтрализующих антител в сыворотках крови кроликов представлены в таблице 7.

Таблица 7. – Вируснейтрализующие антитела в сыворотке крови кроликов, иммунизированных образцами вакцины, содержащей различные адьюванты

Образцы вакцины	Средний титр вируснейтрализующих антител к вирусам, \log_2			
	ИРТ	ВД	ротавирусу	коронавирусу
Montanide ISA 61 VG	2,5	1,9	2,1	2,0
Montanide ISA 201 VG	2,4	2,2	2,3	2,1
Montanide ISA 15 VG	2,75	2,3	2,5	2,1
Montanide ISA 206 VG	1,55	1,7	1,95	1,8
Montanide ISA 50 V2	1,45	1,7	1,9	1,97

Как видно из таблицы 7, титр вируснейтрализующих антител невысокий, но это закономерно, так как иммунизировали кроликов однократно. Однако прослеживается определенная тенденция. Титр антител выше в случаях применения вакцины с Montanide ISA 61 VG, Montanide ISA 201 VG и Montanide ISA 15 VG и составляет от 1,9 до 2,75 \log_2 , в то время как применение вакцины с Montanide ISA 206 VG и Montanide ISA 50 V2 приводило к формированию антител в титрах от 1,45 до 1,97 \log_2 .

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что применение живой трехвалентной вирус-вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и парагриппа-3 крупного рогатого скота приводило к образованию антител в сыворотке крови 1–3-месячных телят в титрах 4,0–5,0 \log_2 . Однако следует заметить, что титр противовирусных антител, образованных при иммунизации отечественной вакциной, на 1,0–2,0 \log_2 уступает титрам антител в сыворотке крови животных, вакцинированных зарубежными аналогами.

2. Титр антител у животных, вакцинированных вирус-вакциной поливалентной инактивированной против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота- и коронавирусной инфекции крупного рогатого скота «Тетравак», на 1,0–3,0 \log_2 ни-

же по сравнению с зарубежными аналогами (за исключением вакцины «Комбовак»).

3. Установлено, что наиболее чувствительной культурой клеток для культивирования коронавируса, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи является MDBK.

4. Установлено, что наименьшей вязкостью обладают адьюванты Montanide ISA 201 VG, Montanide ISA 61 VG и Montanide ISA 15 VG по сравнению с ранее используемыми эмульгаторами Montanide ISA 206 VG и Montanide ISA 50 V2.

5. При исследовании места введения образцов вакцины установлено, что препарат, содержащий Montanide ISA 61 VG, Montanide ISA 201 VG и Montanide ISA 15 VG, не вызывал никаких побочных явлений, в то время как введение вакцины с Montanide ISA 50 V2 и Montanide ISA 206 VG вызывало небольшую отечность в месте введения.

6. Титр антител выше в случаях применения вакцины с Montanide ISA 61 VG, Montanide ISA 201 VG и Montanide ISA 15 VG и составляет от 1,9 до 2,75 \log_2 . В то же время применение вакцины с Montanide ISA 206 VG и Montanide ISA 50 V2 приводило к формированию антител в титрах от 1,45 до 1,97 \log_2 .

ЛИТЕРАТУРА

1. Адъюванты в современной вакцинологии / Е. Б. Исаенко [и др.] // Труды института Мечникова. – № 4. – 2013.
2. Вирусные и ассоциативные вирусно-бактериальные респираторные болезни крупного рогатого скота (особенности эпизоотологии, патогенеза, клинического проявления, патолого-анатомических изменений) : метод. рекомендации / А. Г. Глотов [и др.]; РАСХН., Сиб. отд-ние, ГНУ ИЭВ-СиДВ. – Новосибирск, 2004. – 33 с.
3. Иммуный ответ у коров при иммунизации против инфекционного ринотрахеита в зависимости от серологического статуса животных в стадах / П. А. Красочко [и др.] // Ветеринарная медицина. – Вып. 102. – 2016. – С. 290–294.
4. Кот, Н. И. Иммунопрофилактика заболеваний, вызванных вирусами инфекционного ринотрахеита, диареи и парагриппа-3 крупного рогатого скота : автореф. дисс. ... канд. ветеринар. наук / Н. И. Кот. – Минск, 2003. – 13 с.
5. Кропотов, В. С. Средства и методы повышения иммуногенности вакцины против болезни Тешена : автореф. дисс. ... канд. биол. наук / В. С. Кропотов. – Покров, 2001. – 24 с.
6. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота / А. Г. Глотов [и др.] // Ветеринария. – 2002. – № 3. – С. 17–21.
7. Стратегия борьбы с вирусной диареей – болезнью слизистых крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Российской Федерации / М. И. Гулюкин, [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2013. – № 6. – С. 13–18.
8. Эффективность применения комбинированных вакцин серии Комбовак / А. Е. Хитрова [и др.] // Ветеринария. – 2006. – № 9. – С. 17–20.

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

«БЕЛВИРОПАСТ»



WWW.BIEVM.BY



- * Состоит из штаммов вирусов инфекционного ринотрахеита, диареи, парагриппа-3, штаммов бактерий *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* тип А и *Pasteurella multocida* тип А, эмульгированных в масляном адъюванте.
- * Вызывает выработку специфических антител против возбудителей инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, бактерий *Mannheimia haemolytica* тип А и *Pasteurella multocida* тип А у иммунизированных животных, стимулирует неспецифическую резистентность организма, активизирует фагоцитарную активность клеток нейтрофильно-макрофагального ряда и бактерицидную активность крови.
- * Иммунитет у вакцинированных животных формируется к 21-му дню после вакцинации.
- * Применяют для профилактической иммунизации КРС против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и пастереллеза в угрожаемых и неблагополучных хозяйствах. Прививают только клинически здоровых животных.

УДК 619:615.371:619:616.98:579.843.94

Насонов И.В., доктор ветеринарных наук, доцент**Кныш Н.В.**, кандидат ветеринарных наук**Зинина Н.В.**, кандидат биологических наук**Гуринович О.Л.**, магистр биологических наук**Захарик Н.В.**, кандидат ветеринарных наук*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск*

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ ВАКЦИН ПРОТИВ ГЕМОФИЛЕЗА ПТИЦ В УСЛОВИЯХ ПРОИЗВОДСТВА

Резюме

В статье приведены данные по сравнительной оценке иммуногенности вакцины против гемофилеза птиц «Про-Вак Кориза-3» (Южная Корея) и вакцины против инфекционного ринита птиц «Вольвак® АС Плюс» (Германия) в условиях производства. Результаты исследований показали, что данные вакцины безвредны и ареактогенны и способны предохранять цыплят от заболевания в условиях промышленного производства.

Summary

The article presents data on a comparative assessment of the immunogenicity of «Pro-Vac Coryza-3» vaccines against avian hemophilia (South Korea) and «Volvak® AC Plus» (Germany) against infectious rhinitis in birds under production conditions. The results showed that these vaccines are harmless and reactogenic and is able to protect chickens from disease in the conditions of industrial production.

Поступила в редакцию 20.08.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

Промышленное птицеводство является наиболее специализированной и технически оснащенной отраслью, производящей значительные объемы продукции в относительно короткие сроки [7].

На сегодняшний день респираторные заболевания занимают ведущее место в структуре инфекционных патологий птиц. Этиологическими агентами данных заболеваний могут выступать как вирусы (нюкалсская болезнь, грипп птиц, инфекционный бронхит кур, инфекционный ларинготрахеит, метапневмовирусная инфекция), так и бактерии (респираторный микоплазмоз, бордетеллиоз, орнитобактериоз и др.). Также к респираторным болезням относится гемофилез птиц, вызываемый бактериями вида *Avibacterium paragallinarum*, ранее известными как *Haemophilus paragallinarum* [9, 12, 13].

Гемофилез птиц (инфекционный ринит) – острое энзоотическое высококонта-

гиозное заболевание верхних дыхательных путей домашней птицы, в первую очередь цыплят и кур, характеризующееся катаральным воспалением слизистых оболочек носовой полости, конъюнктивы и воздухоносных пазух, а также подкожным отеком головы и в редких случаях – пневмонией. Распространение данного заболевания происходит горизонтальным путем. Существует мнение, что инфекционный ринит не является системной инфекцией и не способен вызвать высокую смертность восприимчивой птицы, однако при острых вспышках отход поголовья может достигать 10 %. Экономический ущерб наносится также отставанием в росте молодняка и снижением яйценоскости кур до 40 %, особенно на пике продуктивности. Вспышки гемофилеза фиксируют в зимне-весенний и осенне-зимний периоды. По антигенным свойствам штаммы *Avibacterium paragallinarum* классифицируют как серотипы А, В и С. Данные серотипы не обладают пере-

крестной защитой при иммунизации птицы. В настоящее время для типирования возбудителя инфекционного ринита кур используют серологические и молекулярно-генетические методы [2, 3, 4, 6, 10].

Противоэпизоотические мероприятия в борьбе с гемофилезом птиц должны иметь комплексный подход и предусматривать не только выполнение ветеринарно-санитарных правил, использование эффективных терапевтических препаратов, но и применение средств специфической профилактики (вакцинопрофилактики).

До середины 90-х годов XX века большинство коммерческих вакцин содержали только штаммы *Avibacterium paragallinarum* серотипов А и С, что негативно отражалось на их протективных свойствах в связи с активной циркуляцией патогенного возбудителя серотипа В [1, 3, 5, 6, 11].

Ввиду отсутствия отечественной вакцины для специфической профилактики гемофилеза птиц используют зарубежные инактивированные вакцины. Двукратная вакцинация ремонтного молодняка птиц в комплексе с лечебно-профилактическими обработками птицы антибактериальными препаратами и улучшением условий содержания и кормления птиц обеспечивает эффективную профилактику заболевания [8].

Цель работы – сравнительный анализ иммуногенной активности вакцины против гемофилеза птиц «Про-Вак Кориза-3» (PRO-VAC™ CORYZA-3) производства «Комифарм Интернешнл Ко ЛТД» (Южная Корея) и вакцины против инфекционного ринита птиц «Вольвак® АС Плюс» (Volvac® АС Plus) производства «Берингер Ингельхайм Ветмедика ГмбХ» (Германия), содержащих не менее чем $10^{8,0}$ ЭИД₅₀ инактивированных бактерий из каждого серотипа (А, В, С) штаммов *Avibacterium paragallinarum*.

Вакцина против гемофилеза птиц «Про-Вак Кориза-3» содержит инактивированный бактериальный антиген *Avibacterium paragallinarum* серотип А (штамм 0083), инактивированный бактериальный антиген *Avibacterium paragallinarum* серотип В (штамм 0222), инактивированный бактериальный антиген *Avibacterium para-*

gallinarum серотип С (штамм Modesto), тиомерсал, гидроксид алюминия гель.

Вакцину вводят курам с соблюдением общепринятых правил асептики и антисептики однократно внутримышечно в область бедра в дозировке 0,5 мл в возрасте до 40 дней и 1 мл – в возрасте старше 40 дней. В птицеводческих хозяйствах, где ранее выявлялись случаи заболевания гемофилезом, проводят двукратную вакцинацию: первый раз – в возрасте 3–10 недель, второй раз – за 3–4 недели до начала яйцекладки. Вакцина вызывает формирование иммунного ответа у цыплят и кур к возбудителю гемофилеза птиц через 21 сутки после однократного применения продолжительностью более 15 недель.

Вакцина против инфекционного ринита птиц «Вольвак® АС Плюс» изготовлена из культуры штаммов *Avibacterium paragallinarum* серотипов А, В, С, инактивированных формалином (0,432 мг), с добавлением в качестве адъюванта минерального масла (234,402 мг), пропиленгликоля (4,144 мг), ПАВ – Спан 80 (22,72 мг) и Твин 80 (8,262 мг) и консерванта тиомерсала (0,05 мг).

Вакцину вводят птице подкожно в область средней трети шеи в объеме 0,5 мл двукратно: первый раз – в возрасте 3–10 недель, второй раз – за 3–4 недели до начала яйцекладки. Вакцина вызывает формирование иммунного ответа у птицы к возбудителям инфекционного ринита через 3 недели после двукратного применения продолжительностью не менее 27 недель.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В отдел болезней птиц, пчел и физико-химических исследований РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» были проведены испытания вакцины против гемофилеза птиц «Про-Вак Кориза-3» и вакцины против инфекционного ринита птиц «Вольвак® АС Плюс» для сравнительной оценки иммуногенности в условиях производства. Производственные испытания вакцин проводили в ОАО «1-я Минская птицефабрика», руководствуясь согласо-

ванными и утвержденными в установленном порядке программами испытаний и инструкциями по применению вакцин.

Для проведения исследований было использовано 49780 птиц 126–130-дневного возраста кросса Хайсекс коричневый, подобранных по принципу аналогов и разделенных на 2 группы.

Технологические параметры выращивания и ветеринарно-санитарные обработки кур во всех подопытных группах были одинаковыми.

Молодняк кур 1-й (опытной) группы в количестве 20000 особей иммунизировали против гемофилеза птиц вакциной «Про-Вак Кориза-3» (PRO-VACTM CORYZA-3) (дата изготовления 17.10.2019 г., годен до 16.10.2021 г., партия № 59CORYV03). Вакцину вводили согласно инструкции по ее применению подкожно в область бедра в дозе 0,5 мл. Перед применением вакцины ждали, пока ее температура не станет комнатной. Во время проведения вакцинации флаконы с вакциной периодически встряхивали для восстановления однородности суспензии. Птиц 2-й (контрольной) группы в количестве 29780 особей иммунизировали против гемофилеза птиц аналогичной инактивированной вакциной «Вольвак[®] АС Плюс» (Volvac[®] AC Plus) (Германия) (дата изготовления 13.08.2018 г., годен до 08.2021 г., партия № 1808106А). Вакцину вводили согласно инструкции по ее применению однократно подкожно в область средней трети шеи в дозе 0,5 мл. Перед применением вакцину выдерживали при комнатной температуре и непосредственно перед введением тщательно встряхивали. Во время проведения иммунизации флаконы с вакциной периодически встряхивали для восстановления однородности суспензии.

За птицей обеих групп велось ежедневное наблюдение с учетом клинических отклонений и падежа. Содержание специфических антител против гемофилеза определяли у птиц 1-й и 2-й групп до (фон) и через 21 день после вакцинации (по 20 проб из каждой группы).

Уровень специфических антител в сыворотке крови птиц против гемофилеза

птиц (инфекционного ринита птиц) определяли в РТГА с использованием инактивированных антигенов *Avibacterium paragallinarum* серотипов А, В и С. РТГА ставили по традиционной методике микрометодом. Проведение испытания включало следующие этапы: приготовление взвеси эритроцитов кур, определение геагглютинирующего титра антител в РГА и рабочей дозы антигена, постановка реакции.

В фосфатно-буферном растворе с рН 7,2, содержащем 0,1 % бычьего сывороточного альбумина, готовили двукратные разведения сывороток в объеме 50 мкл. К каждому разведению сыворотки добавляли по 50 мкл рабочей дозы антигена. Смесь встряхивали и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего в каждую лунку добавляли по 50 мкл 1%-ной суспензии куриных эритроцитов. Смесь повторно встряхивали и оставляли при комнатной температуре на 30–60 мин, после чего проводили учет результатов реакции. При наличии специфических антител в сыворотке наступала задержка агглютинации эритроцитов. За титр сыворотки принимали предельное разведение, вызывающее полную задержку геагглютинации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

При иммунизации молодняка кур против гемофилеза птиц вакцинами «Про-Вак Кориза-3» (PRO-VACTM CORYZA-3) производства «Комифарм Интернешнл Ко ЛТД» (Южная Корея) и «Вольвак[®] АС Плюс» (Volvac[®] AC Plus) производства «Берингер Ингельхайм Ветмедика ГмбХ» (Германия), в ткани на месте введения биопрепаратов наблюдаются сходные морфологические изменения: болезненность и уплотнение в месте инъекции, которые самопроизвольно исчезали.

В течение эксперимента у всех вакцинированных птиц 1 и 2 групп клинических признаков заболевания гемофилезом выявлено не было. Результаты изучения иммуногенной активности вакцин «Про-Вак Кориза-3» и «Вольвак[®] АС Плюс» представлены в таблице.

Таблица. – Содержание поствакцинальных антител в сыворотке крови птиц против гемофилеза птиц

Группы птиц	Титр антител к гемофилезу (в РТГА)		
	Серотип А	Серотип В	Серотип С
	фон (до вакцинации)		
	0	0	0
	на 21 день после вакцинации		
Опытная группа	4,0±0,2	3,8±0,15	3,4±0,1
Контрольная группа	3,6±0,1	3,8±0,2	3,6±0,3

Контроль напряженности поствакцинального гуморального иммунитета показал, что инактивированные вакцины против гемофилеза птиц «Про-Вак Кориза-3» (PRO-VAC™ CORYZA-3) и «Вольвак® АС Плюс» (Volvac® AC Plus) обладали примерно одинаковыми иммуногенными свойствами.

Таким образом, испытания показали, что вакцины против гемофилеза птиц «Про-Вак Кориза-3» (PRO-VAC™ CORYZA-3) и «Вольвак® АС Плюс» (Volvac® AC Plus) способны предохранять цыплят от заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вакцина против гемофилеза птиц «Про-Вак Кориза-3» (PRO-VAC™ CORYZA-3) производства «Комифарм Интернешнл Ко ЛТД» (Южная Корея) и вакцина против инфекционного ринита птиц «Вольвак® АС Плюс» (Volvac® AC Plus) производства «Берингер Ингельхайм Ветмедика ГмбХ» (Германия) безвредны, ареактогенны и способны предохранять цыплят от заболевания в условиях промышленного производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вакцинопрофилактика, одно из ключевых звеньев в профилактике гемофилеза птиц / Н. Л. Крохин [и др.] // *Ветеринария и кормление*. – 2016. – № 4. – С. 33–34.
2. Гемофилез птиц / Т. Н. Рождественская [и др.] // *Ветеринария медицина*. – 2018. – № 7. – С. 50–53.
3. Евграфова, В. А. Вирулентность изолятов возбудителя инфекционного ринита кур / В. А. Евграфова, А. В. Потехин // *Ветеринария сегодня*. – 2017. – № 4 (23). – С. 28–32.
4. Мамин, Т. Б. Диагностика и вакцинопрофилактика инфекционного ринита птиц. Анализ данных по распространению заболевания на территории Российской Федерации / Т. Б. Мамин, А. В. Чернышов // *БИО*. – 2013. – № 5 (152). – С. 24–28.
5. Полуночника, Т. В. Лечение гемофилеза у кур родительского стада / Т. В. Полуночника // *БИО*. – 2015. – № 5 (176). – С. 28–32.
6. Потехин, А. В. Гемагглютинирующие и антигенные свойства изолятов *Avibacterium paragallinarum*, выделенных на территории Российской Федерации и Республики Беларусь / А. В. Потехин, В. А. Евграфова, Д. Б. Андрейчук // *Ветеринария сегодня*. – 2018. – № 4 (27). – С. 31–38.
7. Прудников, А. В. Иммуногенез у цыплят при одновременной вакцинации против болезни Марека, инфекционного бронхита и ньюкаслской болезни с применением иммуномодуляторов : автореф. дисс ... канд. ветеринар. наук : 16.00.03 / А. В. Прудников. – Минск, 2006. – 20 с.
8. Профилактика и диагностика гемофилеза птиц / Т. Н. Рождественская [и др.] // *Ветеринария и кормление*. – 2017. – № 6. – С. 20–21.
9. Blackall, P. J. Vaccines against infectious coryza / P. J. Blackall // *World's Poult Sci J*. – 1995. – № 51. – P. 17–26.
10. Charoenvisal, N. Efficacy of four commercial infectious coryza vaccines on prevention of *Avibacterium paragallinarum* serovar A, B, and C infection in Thailand / N. Charoenvisal, P. Chansiripornchai, N. Chansiripornchai // *Pak. Vet. J*. – 2018. – № 37 (3). – P. 287–292.
11. Manuela, C. Characterization of an Outbreak of Infectious Coryza (*Avibacterium paragallinarum*) in Commercial Chickens in Central California / C. Manuela, B. Patrick, K. Aatif and other // *Avian Diseases*. – 2019. – № 63 (3). – P. 486–494.
12. Patil, V. V. Isolation, characterization and serological study of *Avibacterium paragallinarum* field isolates from Indian poultry / V. V. Patil, D. N. Mishra, D. V. Mane // *J. Anim. Poult. Sci*. – 2016. – № 5 (1). – P. 13–20.
13. Sarika, N. A report of natural concurrent infection with *Avibacterium paragallinarum* and *Mycoplasma gallisepticum* in chicken / N. Sarika, C. Devigasri // *The Pharma Innovation Journal*. – 2019. – № 8 (1). – P. 16–18.

УДК 619:616-085.37:636. 52/.58

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Насонов И.В., доктор ветеринарных наук, доцент¹
Зуйкевич Т.А., кандидат сельскохозяйственных наук¹
Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор²
Журавлева Е.С., кандидат ветеринарных наук¹
Кныш Н.В., кандидат ветеринарных наук¹
Зинина Н.В., кандидат биологических наук¹
Згировская А.А., кандидат биологических наук¹
Яромчик Я.П., кандидат ветеринарных наук, доцент²
Бучукури Д.В., кандидат ветеринарных наук¹
Якубовский С.М., научный сотрудник¹
Осипенко А.Е., младший научный сотрудник¹

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

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ АДЬЮВАНТОВ И ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ ДЛЯ ГИПЕРИММУНИЗАЦИИ КУР-НЕСУШЕК

Резюме

В статье представлены данные по подбору адъювантов и иммуностимуляторов для повышения выработки трансовариальных иммуноглобулинов, отработана оптимальная схема гипериммунизации кур-несушек. Установлено, что наиболее оптимальным адъювантом для гипериммунизации кур-несушек является Montanide IMS 1313 VG, использование которого приводит к выработке специфических антител в титре $5,67 \log_2$. Применение липополисахарида *Bacillus subtilis* в качестве иммуностимулятора приводит к повышению титра противовирусных антител на $0,17-0,83 \log_2$. Оптимальной схемой гипериммунизации кур-несушек является введение антигенов в виде монокомпонентов в дозе $0,5 \text{ см}^3$ внутримышечно в область грудных мышц четырехкратно с интервалом 14 суток, что способствует повышению уровня специфических антител на $1,0-1,67 \log_2$.

Summary

The article presents data on the selection of adjuvants and immunostimulants was carried out to increase the production of transovarian immunoglobulins, the optimal scheme of hyperimmunization of laying hens was worked out. It was found that the most optimal adjuvant for hyperimmunization of laying hens is Montanide IMS 1313 VG, the use of which leads to the development of specific antibodies in titer of $5,67 \log_2$. The use of *Bacillus subtilis* lipopolysaccharide as an immunostimulant leads to an increase in antiviral antibody titer at $0,17-0,83 \log_2$. The optimal scheme for hyperimmunization of laying hens is use of antigens in the form of monocomponents at a dose of $0,5 \text{ cm}^3$ intramuscularly into the pectoral muscle region four times with an interval of 10–14 days, which increases the level of specific antibodies at $1,0-1,67 \log_2$.

Поступила в редакцию 27.10.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

При современном выполнении мер профилактики ветеринарные врачи сельскохозяйственных организаций сталкиваются со случаями низкой эффективности проводимых ветеринарно-санитарных мероприятий. Использование антибиотиков, сульфаниламидов и других противомик-

робных средств не всегда дает положительный эффект лечения и профилактики, так как отчетливо наблюдается тенденция выраженной лекарственной устойчивости полевых штаммов бактерий. При этом, несмотря на выполняемые меры по срокам ожидания после применения химиотерапевтических препаратов, проблема нали-

чия остаточных количеств антимикробных средств в получаемой животноводческой продукции остается весьма актуальной.

На этом фоне у животных, особенно у молодняка, в массовых масштабах проявляются вирусные пневмоэнтериты, вызванные вирусами диареи, инфекционного ринотрахеита, рота-, коронавирусами с последующим наслоением условно-патогенной микрофлоры, что приводит к снижению сохранности поголовья, прироста живой массы и эффективности проводимых в хозяйстве ветеринарных мероприятий.

На сегодняшний день нет универсальных средств, обладающих широким спектром противoinфекционного действия и высокой эффективностью для лечения молодняка крупного рогатого скота и профилактики у них желудочно-кишечных инфекций, вызванных вирусами диареи, инфекционного ринотрахеита, рота- и коронавирусами.

Перспективной в данном направлении является разработка препаратов на основе специфических иммуноглобулинов, способных образовывать комплексы антиген-антитело с наиболее распространенными возбудителями энтеритов с последующей их нейтрализацией и выведением из организма [1].

Одними из таких иммуноглобулинов являются иммуноглобулины, выделяемые из желтка вакцинированных кур – IgY (yolk immunoglobulin). Данные антитела можно получать в большом количестве неинвазивным способом, что делает кур «поставщиком» недорогих специфических антител. Антитела могут быть введены перорально в различных формах, включая яичный порошок, полученный в распылительной сушилке, водорастворимую фракцию желтков или очищенные IgY [2, 3, 7, 8, 9].

В практическом аспекте такие свойства IgY, как его высокая концентрация в желтке, неспособность связывать белки А и G, активировать систему комплемента и интерферировать с IgG млекопитающих привели к разработке так называемой

IgY-технологии – альтернативе традиционному методу получения поликлональных антител на животных [4, 5, 6, 10].

Использование IgY для пассивной иммунизации имеет отличительные преимущества по сравнению с IgG млекопитающих:

- возможность получения большого количества антител (от одной курицы за месяц можно получить в 15–17 раз больше иммуноглобулинов, чем от одного кролика). По разным данным, желток куриного яйца содержит IgY в высокой концентрации (8–20 мг/мл). Это обусловлено легким переходом сывороточных антител в белок яйца, находящегося в яичнике, далее происходит активный перенос и аккумуляция IgY в желточном мешке;

- IgY-антитела обладают в 5 раз большим сродством к конкретному антигену и реагируют быстрее, чем IgG млекопитающих;

- выделение IgY происходит через бескровный физиологический процесс (кладка яиц), тогда как для извлечения IgG необходимо кровопускание, из-за чего животное испытывает боль;

- IgY не взаимодействуют ни с компонентами комплемента, ни с ревматоидным фактором, ни с Fc-рецепторами клеток млекопитающих. Кроме того, расходы на содержание птицы значительно ниже, чем на содержание крупных млекопитающих (лошадей, ослов, мулов, коров), часто используемых для пассивной иммунизации.

Указанные преимущества IgY-технологий создают необходимость более широкого применения птичьих антител в научных исследованиях, диагностике и иммунотерапии инфекционных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных [1].

Целью работы является подбор эффективных адъювантов и иммуностимуляторов для получения трансвариальных иммуноглобулинов при гипериммунизации кур-несушек.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась на базе отдела вирусных инфекций и отдела болезней птиц, пчел и физико-химических исследований РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», виария института.

Для проведения исследований выполнен подбор адъювантов нового поколения Montanide ISA 61 VG, Montanide IMS 1313 VG, Montanide GEL 01, которые способствуют формированию длительного иммунитета.

Кроме адъювантов, оценивали влияние иммуностимулятора (липополисахарид *Bacillus subtilis*) в концентрации 30 мкг/кг веса на выработку специфических противовирусных антител.

В качестве антигенной части для смешивания с адъювантами и иммуностимулятором использовали антигены вируса диареи (ВД), инфекционного ринотрахеита (ИРТ), рота- (РВ) и коронавируса (КВ) крупного рогатого скота, инактивированные теотропином в 0,2%-ной концентрации в течение 48 ч. Антигены вводили курам-несушкам в дозе 0,5 см³ внутримышечно в область грудных мышц четырехкратно с интервалом 14 суток. Смешивание антигенов с адъювантом Montanide ISA 61 VG проводилось соответственно в соотношении по массе 50:50, с Montanide GEL 01 – в соотношении 80:20, с Montanide IMS 1313 VG – в соотношении 50:50.

Для проведения экспериментов было сформировано 9 групп кур-несушек (8 опытных и одна контрольная) по 3 головы в каждой, которых иммунизировали по следующей схеме: 1-я группа – антиген ВД с Montanide ISA 61 VG; 2-я группа – антиген ВД с Montanide ISA 61 VG и липополисахаридом (ЛПС); 3-я – антиген ВД с Montanide GEL 01; 4-я – антиген ВД с Montanide GEL 01 и ЛПС; 5-я – антиген ВД с Montanide IMS 1313 VG; 6-я – антиген ВД с Montanide IMS 1313 VG и ЛПС; 7-я – антиген ВД+ИРТ+КВ+РВ с Montanide ISA 61 VG; 8-я – антиген ВД+ИРТ+КВ+РВ с Montanide ISA 61 VG и ЛПС; контрольная группа получала физиологический раствор

в дозе 0,5 см³ внутримышечно в область грудных мышц четырехкратно с интервалом 14 суток.

Через 14 суток после последнего введения у кур были отобраны пробы крови из подкрыльцовой вены и снесенные яйца с целью определения наличия антител к применяемым вирусным антигенам в реакции нейтрализации.

Отработан способ получения желточных иммуноглобулинов из яиц. Для этой цели куриные яйца промывали водой и обрабатывали изопропиловым спиртом. Яичную скорлупу осторожно, не повреждая желточный мешок, вскрывали, желток отделяли от белка и помещали на фильтровальную бумагу. Перекачивая желток на бумаге, насколько возможно, удаляли остаток белка. Затем оболочку желтка прокалывали ланцетом или кончиком пипетки и желток помещали в пробирки на 50 см³. К желтку добавляли органическую смесь, состоящую из хлороформа, этанола, 2-пропанола, ФСБ и этилацетата (в % (v/v) соотношении 21,6:6,5:36:18:18 соответственно) в количестве, равном 2 объемам желтка. Содержимое пробирки интенсивно перемешивали и пробирки в горизонтальном положении помещали на качалку при комнатной температуре на 20 мин. Затем пробирки центрифугировали при 2500 об/мин в течение 20 мин. После центрифугирования содержимое пробирки разделялось на 3 фазы. Нижняя фаза представляет собой белый хлопьевидный осадок альбуминов и липопротеинов. Средняя фаза желтого цвета содержит липиды и фосфолипиды. Верхняя прозрачная фаза представляет фракцию искомых иммуноглобулинов. Верхнюю фазу отбирали шприцем, переносили в чистые пробирки на 50 см³, объем регистрировали и добавляли 2 объема ФСБ. Далее в пробирки вносили 12 % (w/v) сухого измельченного ПЭГ-6000 и интенсивно перемешивали до полного растворения ПЭГ. Через 20 мин преципитирующие иммуноглобулины осаждали центрифугированием при 2500 об/мин в течение 20 мин. Супернатант декантировали. Осадок рас-

творяли в ФСБ в объеме, равном первоначальному объему желтка.

Концентрацию белка во фракции иммуноглобулинов определяли путем измерения оптической плотности растворов при 280 нм, используя 1%-ный раствор БСА в качестве стандарта.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При проведении исследований по подбору адъювантов и иммуностимуляторов для гипериммунизации кур-несушек были получены результаты, представленные в таблице.

Таблица. – Определение оптимальных адъювантов и иммуностимуляторов для гипериммунизации кур-несушек

Группа кур-несушек	Антиген	Титр антител в РН, log ₂
Опытная группа № 1	ВД + ISA 61 VG	4,33±0,33
Опытная группа № 2	ВД + ISA 61 VG + ЛПС	5,0±0
Опытная группа № 3	ВД + IMS 1313 VG	5,67±0,33
Опытная группа № 4	ВД + IMS 1313 VG + ЛПС	6,0±0
Опытная группа № 5	ВД + GEL 01	4,67±0,33
Опытная группа № 6	ВД + GEL 01 + ЛПС	5,5±0,5
Опытная группа № 7	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG (антитела к ИРТ)	4,33±0,33
	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG (антитела к ВД)	4,0±0
	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG (антитела к РВ)	4,0±0,58
	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG (антитела к КВ)	4,67±0,33
Опытная группа № 8	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG + ЛПС (антитела к ИРТ)	4,5±0,5
	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG + ЛПС (антитела к ВД)	4,0±0
	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG + ЛПС (антитела к РВ)	4,0±0
	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG + ЛПС (антитела к КВ)	4,5±0,5
Контрольная группа	-	0

В результате проведенных исследований по подбору адъювантов и иммуностимуляторов для гипериммунизации кур-несушек установлено, что наиболее оптимальным адъювантом является Montanide IMS 1313 VG (опытная группа № 2), применение которого приводило к выработке специфических антител в организме птицы в титре 5,67 log₂, что на 1,0–1,67 log₂ выше в сравнении с адъювантами Montanide GEL 01 и Montanide ISA 61 VG.

Применение в качестве иммуностимулятора бактериального липополисахарида, выделенного из *Bacillus subtilis*, приво-

дило к повышению титра противовирусных антител на 0,17–0,83 log₂.

Разработан и применен простой и высокопроизводительный метод выделения желточных иммуноглобулинов, не требующий дорогостоящего оборудования. В основу разработанного метода положен принцип жидко-жидкостного фазного разделения липидной и белковой фракций яичных желтков с использованием смеси органических растворителей.

Выход иммуноглобулинов составил 80–100 мг с одного яйца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Наиболее оптимальным адъювантом для гипериммунизации кур-несушек является Montanide IMS 1313 VG, применение которого приводило к выработке специфических антител в организме птицы в титре 5,67 log₂.

2. Применение в качестве иммуностимулятора бактериального липополисахарида, выделенного из *Bacillus subtilis*, приводило к повышению титра противовирусных антител на 0,17–0,83 log₂.

3. Оптимальной схемой гиперимму-

низации кур-несушек является схема, включающая введение антигенов вирусов в виде монокомпонентов в дозе 0,5 см³ внутримышечно в область грудных мышц четырехкратно с интервалом 14 суток, что способствует повышению уровня специфических антител на 1,0–1,67 log₂.

4. Отработанный метод выделения трансвариальных иммуноглобулинов из яйца кур-несушек способствует получению очищенной иммуноглобулиновой фракции в количестве 80–100 мг иммуноглобулинов с одного яйца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каплин, В. С. IgY-технологии в медицине. Желточные антитела птиц в иммуноterapiи / В. С. Каплин, О. Н. Каплина // *Международные обзоры: клиническая практика и здоровье*. – 2016. – № 4. – С. 59–75.
2. Akita, E. M. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain / E. M. Akita, S. Nakai // *Journal of immunological methods*. – 1993. – Vol. 160. – № 2. – P. 207–214.
3. De Meulenaer, B. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: a review / B. De Meulenaer, A. Huyghebaert // *Food and Agricultural Immunology*. – 2001. – Vol. 13. – № 4. – P. 275–288.
4. Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha / P. Klimentzou [et al.] // *Peptides*. – 2006. – Vol. 27. – № 1. – P. 183–193.
5. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period / D. Pauly [et al.] // *Poultry Science*. – 2009. – Vol. 88. – № 2. – P. 281–290.
6. Polson, A. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens / A. Polson, M. B. von Wechmar, M. H. V. Van Regenmortel // *Immunological communications*. – 1980. – Vol. 9. – № 5. – P. 475–493.
7. *Chicken egg yolk antibodies, production and application: IgY-Technology* / R. Schade [et al.] (ed.). – Springer Science & Business Media, 2000.
8. *Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine* / R. Schade [et al.] // *Alternatives to laboratory animals*. – 2005. – Vol. 33. – № 2. – P. 129–154.
9. The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE / A. I. Taylor [et al.] // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48. – № 3. – P. 558–562.
10. Gene gun-supported DNA immunisation of chicken for straightforward production of poxvirus-specific IgY antibodies / P. T. Witkowski [et al.] // *Journal of immunological methods*. – 2009. – Vol. 341. – № 1–2. – P. 146–153.

УДК 611.813.3-018.822

Анишкявичюс М., аспирант

Малашко В.В., доктор ветеринарных наук, профессор

УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно

**ВЛИЯНИЕ МЕЖПОЗВОНОЧНЫХ ГРЫЖ НА СТРУКТУРУ
НЕЙРОНОВ СПИННОМОЗГОВЫХ ГАНГЛИЕВ СОБАК****Резюме**

Изучены структурные изменения в спинномозговых ганглиях собак при межпозвоночной грыже. Наблюдается редукция капилляров, деструкция эндоплазматической сети, аппарата Гольджи, снижение активности АХЭ, разрушение ядрышка. По структурным характеристикам выделено три типа глиоцитов в спинномозговых ганглиях.

Summary

Changes in spinal ganglia in canine intervertebral hernia have been studied. There is a reduction of capillaries, destruction of the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus, a decrease in AChE activity, and destruction of the nucleolus that can be observed. Three types of glial cells in the spinal ganglia were identified according to their structural characteristics.

Поступила в редакцию 02.10.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

Межпозвоночные диски являются своего рода гибкими амортизационными подушками, которые убирают излишки механического напряжения и отвечают за сгибание шеи, выгибание спины. Диски, в отличие от позвонков, гибкие и мягкие, но с возрастом они теряют часть своих свойств. В итоге может возникать смещение межпозвоночных дисков или их вещество может попадать в полость позвоночного канала, что приводит к компрессии спинного мозга. Межпозвоночная грыжа может возникнуть у любого животного, но чаще у собак пород такса, ши-тцу, французский бульдог, корги, бигль, спаниель.

К группе риска возникновения межпозвоночных грыж относятся собаки возраста от трех до семи лет. Согласно классификации А.И. Осна [2, 3] различают 4 стадии формирования грыж межпозвоночных дисков: 1) протрузия – выпячивание в позвоночный канал элементов фиброзного кольца межпозвоночного диска без нарушения его целостности; 2) пролапс – выпячивание элементов поврежденного пульпозного ядра через разрывы фиброзного коль-

ца под заднюю продольную связку с компрессией содержимого позвоночного канала; 3) экструзия – смещение поврежденного пульпозного ядра в позвоночный канал с разрывом задней продольной связки и компрессией нервно-сосудистых образований спинного мозга; 4) секвестрация – разрыв фиброзного кольца межпозвоночного диска, выход элементов пульпозного ядра в позвоночный канал без сохранения их связи с внутридискковой частью и изолированное их перемещение по каналу. Дегенеративно-дистрофические изменения позвоночника, осложненные корешковым синдромом на фоне грыж межпозвоночных дисков, составляют 71–80 % всех заболеваний периферической нервной системы.

Значительные нарушения взаимоотношений между телами позвонков, дисками и межпозвоночными суставами приводят к уменьшению размеров межпозвоночного отверстия с последующими структурными и функциональными нарушениями заложенных там нервных и сосудистых образований [4, 5, 6, 7]. Самым распространенным местом образования грыжи типа I у крупных пород собак является

пространство между L1 и L2. Грыжи дисков каудальнее межпозвоночного пространства L3-4 встречаются реже. Грыжи вызывают компрессионную миелопатию, поражающую двигательные нейроны пояснично-крестцового утолщения, формирующие пояснично-крестцовое сплетение [13]. Частота синдрома восходящего/нисходящего ишемического некроза спинного мозга у собак и острым поражением межпозвоночного диска в грудино-поясничном отделе и полной потерей чувствительности может достигать 10 %.

У собак часто диагностируется дегенеративный пояснично-крестцовый стеноз. Патология представляет собой синдром статической или динамической компрессии корешков спинного мозга в результате дегенеративно-дистрофических изменений межпозвоночного диска, суставных фасеток, аномалии развития позвонков, связочного аппарата на уровне сегмента L7-S1. Это заболевание является многофакторным у собак, как правило, крупных пород, особенно у немецких овчарок [1, 8, 14, 15].

Степень неврологических расстройств зависит от способности животного к самостоятельному передвижению, состояния рефлексов, наличия или отсутствия болевой реакции. По состоянию рефлексов можно выделить снижение рефлекторной активности, гиперрефлексию или же нормальное состояние. Исходя из этого, можно определить предполагаемый уровень поражения спинного мозга: I стадия – боль в спинной области без пареза; II стадия – парапарез с сохраненной подвижностью (слабая, средняя, сильная степень); III стадия – парапарез без подвижности; VI стадия – параплегия; Va стадия – параплегия с потерей поверхностной болевой чувствительности; Vб стадия – параплегия с потерей глубокой болевой чувствительности; Vв стадия – параплегия с признаками прогрессирующей миеломалации [12, 16].

В ветеринарной вертебрологии, несмотря на совершенствование методических и операционных подходов, остаются неизученными процессы, происходящие в организме животных при различной лока-

лизации межпозвоночных грыж в позвоночном столбе. Отсутствуют комплексные исследования по морфологическим изменениям в периферической нервной системе, гематологическим, биохимическим и иммунологическим процессам при межпозвоночных грыжах до операции и в послеоперационный период. Практически не освещен в научной литературе сравнительный анализ реакции организма домашних животных в зависимости от степени поражений спинного мозга и спинномозговых нервов [9, 10, 11].

Цель исследований – определить структурно-функциональные изменения в спинномозговых ганглиях собак при грыжах межпозвоночных дисков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Послеоперационные биоптаты спинномозговых ганглиев собак фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине. Время фиксации составляло 2–3 часа. Гистохимическую реакцию на щелочную фосфатазу (ЩФ, КФ 3.1.1.1) определяли по методу Г. Гомори. В качестве субстрата применяли β -глицерофосфат натрия. Срок инкубации для ЩФ составлял 1–1,5 часа. Для оценки специфичности гистохимической реакции ставили контроль без β -глицерофосфата в инкубационной среде. Кровеносные сосуды также выявляли с помощью гистохимической реакции на ЩФ по методу Гомори, т.к. фермент локализуется в эндотелии кровеносных сосудов.

Холинэргические структуры изучали путем выявления ацетилхолинэстеразы (АХЭ, КФ 3.1.1.7) с помощью тиохинового метода М.Д. Карновского – Л.А. Рутс в модификации А. Эль-Бадави и Е. Шенка. Оптимальное время инкубации гистосрезов составляло 1,5 часа. В результате реакции в местах локализации специфического и неспецифического фермента выпадал осадок сульфида меди от желтого до коричневого цвета. Для идентификации специфической (истинной) и неспецифической (ложной) холинэстераз использовали два субстрата: ацетил- и бутирилтиохо-

линийодид. Количественную оценку активности АХЭ проводили с помощью сканирующего микроскопа – фотометра MPV-2 фирмы «Leitz» (Германия) в монохроматическом свете с длиной волны 480 нм при измерительном окуляре 6,3, объективе 25, размере зонда на плоскости препарата 4×4 мм в 100–150 точках микрообъекта, взятых произвольно, а также с помощью компьютерной системы «Биоскан».

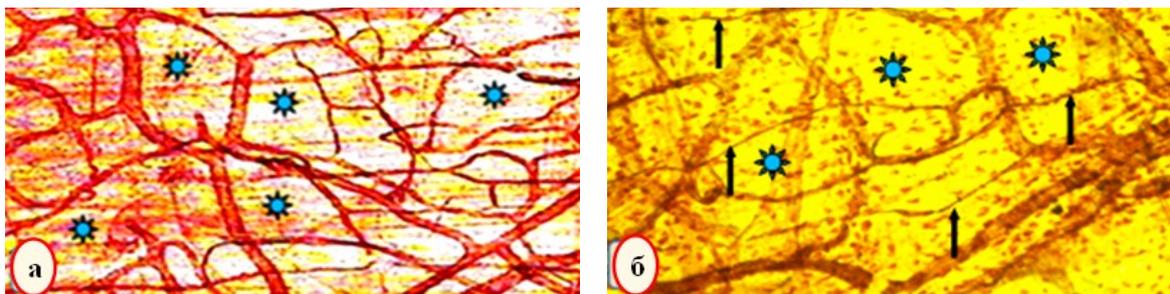
Для электронно-микроскопического исследования биоматериал (спинномозговые ганглии) фиксировали методом погружения в охлажденный 2,5%-ный раствор глутарового альдегида, приготовленный на фосфатном буфере (рН 7,3) в течение 1,5 часов. В последующем ткани помещали в 1%-ный раствор четырехоксида осмия на 2 часа при температуре +4 °С.

После завершения альдегид-осмиевой фиксации биоматериал дегидрировали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в аралдит. Срезы готовили на ультратоме марки LKB (Швеция), контрастировали цитратом свинца по E.S. Reynolds [1963] и просматривали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100CX фирмы «JEOL» (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время сформирована концепция метаболического контроля кислородного обеспечения нормального функционирования организма. В связи с этим совместный эффект вовлечения капилля-

ров в процесс ауторегуляции кровотока обеспечивает надежность защиты от тканевой гипоксии спинномозговые ганглии при межпозвоночных грыжах. Если у интактных животных капилляры располагались от тел нейронов в среднем в радиусе 10–15 мкм, то при патологии это расстояние увеличивалось до 20–25 мкм. Развивающаяся тканевая гипоксия приводит к существенным изменениям состояния нейронов, в частности к инициации апоптоза, явлениям хроматолиза, разрушению ядерного аппарата. Первыми на редукцию кровообращения реагируют мелкие и средние нейроны, которые находятся в худших условиях васкуляризации по сравнению с крупными нейронами. В связи с этим изменяются морфометрические параметры сосудов, как показал индекс Керногана (отношение площади сосуда к площади его просвета). Индекс Керногана у интактных животных колебался в пределах от $3,77 \pm 0,07$ до $4,72 \pm 0,09$, при межпозвоночной грыже – $1,86 \pm 0,06$ – $2,92 \pm 0,08$. Эти показатели свидетельствуют о спазме сосудов, когда диаметр микроциркуляторного русла уменьшается на 38,1–50,70 % ($P < 0,05$). В результате редукции капиллярного русла, а в ряде случаев разрыва микрососудов образуются большие аваскулярные территории (рисунок 1). Наблюдается переполнение веноулярного русла, нарушается сетевидная конфигурация капиллярной сети. Бессосудистые территории занимают площадь от $94,20 \pm 1,50$ мкм³ до $122,90 \pm 1,78$ мкм³.



а, б – редукция капиллярной сети, разрушение сетевидной структуры, большие бессосудистые пространства (значки) в грудном спинномозговом ганглии при межпозвоночной грыже

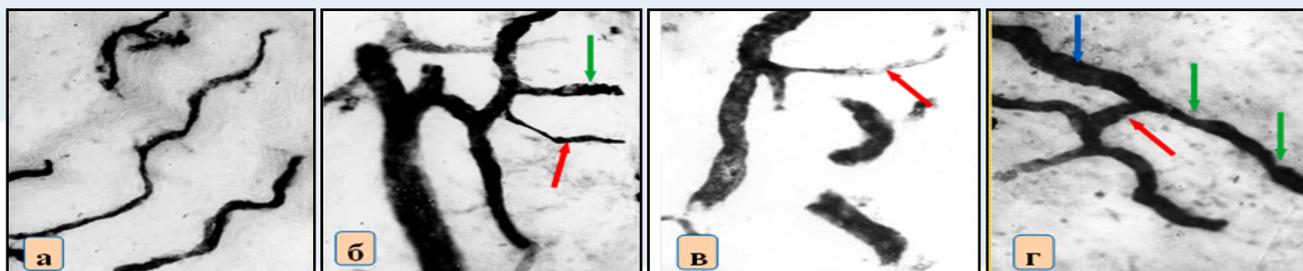
Рисунок 1. – Микроциркуляторное русло в грудном спинномозговом ганглии при межпозвоночной грыже. Метод М. Бильшовского – Гросс в модификации В.В. Малашко. Микрофото. Биоскан. Ув.: а, б ×280

В последнее время широко применяются цитохимические методы исследования для расшифровки процессов метаболизма, функционирования биосинтетических путей, мобилизации и передачи энергии, транспорта многих веществ из клетки в клетку. Щелочная фосфатаза считается одним из наиболее распространенных ферментов, играющих важную роль в переносе ионов через клеточные мембраны, в образовании фибриллярных белков, обеспечивает образование неорганического фосфата.

Было проведено дифференцированное определение активности щелочной фосфатазы в трех отделах позвоночного столба собак при межпозвоночной грыже.

В шейном отделе максимальная энзиматическая активность доходила до $2,34 \pm 0,05$ отн. ед. оп. пл., минимальная – до $1,65 \pm 0,03$ отн. ед. оп. пл., в грудном отделе активность фермента колебалась в пределах $1,14 \pm 0,04$ – $0,96 \pm 0,03$ отн. ед. оп. пл. и в поясничном отделе – $1,31 \pm 0,05$ – $0,67 \pm 0,02$ отн. ед. оп. пл.

Повышение активности щелочной фосфатазы у животных при межпозвоночной грыже по сравнению с интактными собаками свидетельствует в пользу активации лизосом, что служит одной из возможных причин повреждения митохондрий нейронов. Формируются разнообразные морфологические модуляции микрососудов спинномозговых ганглиев (рисунок 2).



а – формирование змеевидных сосудов в спинномозговых ганглиях грудного отдела при грыже; **б** – разная морфологическая структура сосудов, отходящих от одного крупного ствола: сосуд, имеющий гармошковидные складки (зеленая стрелка) и сосуд с резким спазмом (красная стрелка) при грыже в спинномозговых ганглиях поясничного отдела; **в** – высокая активность фермента в месте бифуркации и резкие структурно-гистохимические перестройки в отходящей ветви (красная стрелка) в спинномозговых ганглиях грудного отдела при грыже; **г** – высокая активность фермента в артериоло-венулярном анастомозе (красная стрелка), формирование в венуле аневризм (синяя стрелка) и спазмированных участков (зеленые стрелки) при грыже в спинномозговых ганглиях шейного отдела

Рисунок 2. – Морфология микроциркуляторного русла и активность щелочной фосфатазы в спинномозговых ганглиях при межпозвоночной грыже. Метод Гомори. Микрофото. Биоскан. Ув.: а $\times 140$, б, в, г $\times 280$

В связи со спазмом сосуды приобретают змеевидные контуры (рисунок 2 а).

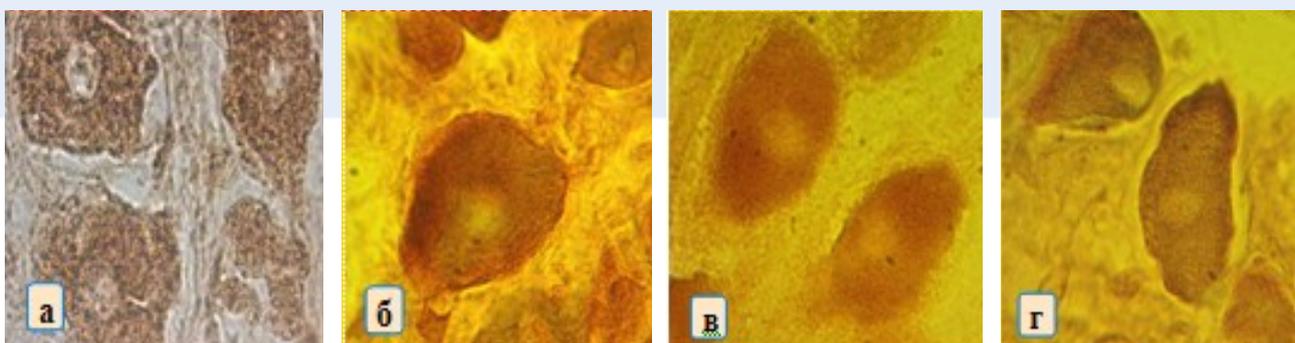
Иногда от одного и того же сосуда отходят две ветви, по структуре не похожие друг на друга. Одна имеет на всем протяжении практически одинаковый диаметр, другая же, наоборот, имеет резкие перепады в размерах (рисунок 2 б). Высокая активность щелочной фосфатазы отмечается в месте бифуркации сосудов, но одни из

ветвей резко контрастирует на фоне других сосудов. В таких структурах происходит резкий спад активности фермента и наступает фрагментация стенок микрососуда (рисунок 2 в). В то же время стенка венулы может формировать расширения, вызванные застойным процессом, которые спровоцированы спазмами в нескольких участках сосуда (рисунок 2 г).

На ультраструктурном уровне ис-

следованы изменения в ядерном аппарате нейронов спинномозговых ганглиев при межпозвоночных грыжах у собак. В ядрышках нейронов диагностировали следующие изменения: 1) сегрегация ядрышка, выражающаяся в обособлении гранулярной и фибриллярной зон; 2) дегрануляция – исчезновение из ядрышка гранулярного компонента, по сути дела, это конечная степень сегрегации; 3) фрагментация – распад всей структуры ядрышка на отдельные плотные агрегаты; 4) гипертрофия ядрышка; 5) формирование микросферулы – это электронно-плотные структуры, появляющиеся в результате процессов, приводящих к частичному или полному торможению синтеза РНК.

Изучение активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в спинномозговых ганглиях при межпозвоночных грыжах базировалась на том, что роль энзима не ограничивается участием в синаптической передаче нервных импульсов. Он также выполняет немедиаторную функцию, участвует в регуляции внутриклеточного обмена, воздействует на проницаемость мембран, регулирует ионные сдвиги, в частности ионов натрия и калия. В среднем при межпозвоночной грыже нейронов с высокой активностью АХЭ была в пределах 27,97 %, (в норме 40,80 %), со средней степенью активности – 37,50 % (в норме 32,40 %) и с низкой активностью – 25,33 % (в норме 21,20 %) (рисунок 3).



а, б – активность АХЭ и структура осадка в нейронах грудных спинномозговых ганглиев у интактных животных; **в, г** – активность АХЭ и структура осадка в грудных спинномозговых ганглиях при межпозвоночной грыже

Рисунок 3. – Активность АХЭ и структура продукта реакции в грудных спинномозговых ганглиях. Метод М. Д. Карновского – Л. А. Рутс в модификации А. Эль-Бадави и Е. Шенка. Микротофо. Биоскан. Ув.: а, б, в, г ×280

Ультраструктурные изменения митохондрий в нейронах сопровождались резким набуханием с деструкцией крист. В митохондриях крупных размеров (более 10 мкм) появляются облаковидные участки уплотнения, миелиноподобные концентрические мембранные пластины чаще концентрируются вокруг митохондрий. Митохондрии с уплотненным матриксом, разрушенными кристами свидетельствуют о снижении энергообеспечения нейрона. Отдельно был произведен анализ митохон-

дрий, у которых наблюдалась различная степень деструкции крист как основного энергетического компонента органеллы. В шейных спинномозговых ганглиях нейронов подобной категории насчитывалось 27,60 %, в нейронах грудного отдела – 14,80 % и в нейронах спинномозговых ганглиев поясничного отдела – 6,20 %. В таблице представлены наиболее часто встречающиеся ультраструктурные нарушения митохондрий нейронов спинномозговых ганглиев при межпозвоночной грыже.

Таблица. – Изменения ультраструктур митохондрий нейронов спинномозговых ганглиев при межпозвоночной грыже (% к общему числу митохондрий)

Ультраструктурные изменения митохондрий	Локализация межпозвоночной грыжи		
	шейный отдел	грудной отдел	поясничный отдел
Неизмененные митохондрии	46,14	52,38	53,55
Умеренно набухшие	26,57	24,87	23,51
Резко набухшие и с деструкцией крист	13,27	11,03	11,58
Начальные этапы деструкции и миелинизации мембран	9,55	8,34	7,42
Миелиноподобные и остаточные тельца	4,47	3,38	3,94

Из анализа данных таблицы видно, что в шейных спинномозговых ганглиях меньше всего было неизмененных митохондрий – 46,14 %, в грудных и поясничных узлах – 52,38 % и 53,55 % соответственно. Число умеренно набухших митохондрий в вышеперечисленных ганглиях составляло 26,57 %, 24,87 % и 23,51 % соответственно. При патологии в нейронах спинномозговых ганглиев реакция аппарата Гольджи сопровождалась набуханием цистерн, в ряде случаев – уменьшением количества простых и окаймленных (клатриновых) пузырьков. В крупных нейронах выявлялась гиперплазия аппарата Гольджи за счет удлинения его профилей, обусловленная неспецифической реакцией за счет изменения перекисного окисления липидов мембран, и миелиноподобные тельца.

В условиях патологического процесса гранулярная эндоплазматическая сеть была сформирована из разрозненных единичных коротких канальцев и часто без рибосом. В 45–65 % случаев наблюдается уменьшение протяженности, дегрануляция и вакуолизация гранулярной эндоплазматической сети. В цитоплазме нейронов, чаще в перинуклеарной зоне, встречаются бесструктурные участки, образованные, вероятно, в результате лизиса дегранулированных мембран. Отмечается фрагментация каналов эндоплазматической сети, центральная полость которой местами имеет варикозности различной величины, отдельные его фрагменты имеют вид вакуолей. Между каналами сети наблюдается невысокая плотность как свободных, так и связанных в розетки рибосом. Во всех слу-

чаях основным патологическим признаком является вакуолизация гранулярной эндоплазматической сети с возникновением в ней очагов деструкции.

Зафиксировано увеличение содержания аутофагических вакуолей в нейронах. Возможно, это проявление реконструктивной функции лизосом, которая реализуется в экстремальных условиях при дефиците энергетических субстратов и пластического материала в клетке. В дальнейшем продукты лизосомального гидролиза могут быть использованы в процессе глюконеогенеза как дополнительный источник энергии. Такой путь получения энергии характерен для процессов «срочной адаптации» в условиях развития патологического процесса.

Впервые удалось выделить три типа глиоцитов в зависимости от ультраструктуры и локализации в спинномозговом ганглии. I тип глиоцитов имеет округлое или продолговато-овальное ядро диаметром 3,5–10 мкм. Гетерохроматин в больших количествах концентрируется в кариоплазме или же около кариолеммы. Цитоплазма светлая, содержит мало оргanelл, большинство из них находится недалеко от ядра. Назначение этих глиоцитов заключается в том, что они окутывают аксон и формируют капсулу вокруг нейронов. У данного типа клеток сильно развит отростковый аппарат. Они также изолируют аксоны от интерстиция. II тип глиоцитов имеет существенные отличия от глиоцитов I типа по форме, структуре ядра и цитоплазмы. Ядро неравномерно, кариолемма образует глубокие инвагина-

ции, диаметр ядра составляет 5–8 мкм. Ядро делится глубокими ячеистыми перетяжками. Хроматин распределен дисперсно и рыхло, скопления его у кариолеммы незначительные. Узкий ободок цитоплазмы занимают многочисленные органеллы. Этот тип глиоцитов преимущественно образует капсулу вокруг нейронов. III тип глиоцитов имеет лопастную форму ядра, а инвагинации, в отличие от II типа, более многочисленные, но неглубокие. Распределение хроматина рыхлое, скопления на кариолемме незначительные. По структуре хроматина напоминают ядро нейрона, хотя гетерохроматина на ядерной оболочке несколько больше, чем у нейрона. Цитоплазма имеет небольшой участок, но образует очень мощные пальцевидные выросты (отростки). Данный тип глиоцитов локализуется в области перикарионов в центральных участках нейропиля.

Проведен анализ содержания трех типов глиоцитов в спинномозговых ганглиях у интактных собак и при межпозвоночной грыже. Глиоцитов I типа у животных с межпозвоночной грыжей было 26,17 %, а у интактных животных – 41,74 %, глиоцитов II типа содержалось 18,90 % и

30,26 % соответственно. Более высокий процент при межпозвоночной грыже приходится на клетки III типа, которых было 54,93 % против 28,0 % без повреждения межпозвоночного диска. Именно этот тип глиоцитов формирует капсулу вокруг дегенеративно-дистрофических нейронов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При межпозвоночных грыжах у собак в спинномозговых ганглиях диаметр микроциркуляторного русла уменьшается на 38,1–50,70 %, происходит редукция капилляров, бессосудистые территории занимают площадь в пределах $94,20 \pm 1,50$ – $122,90 \pm 1,78$ мкм³. Активность АХЭ в нейронах снижается на 25,33–37,50 %, количество измененных митохондрий достигает 23,51–26,57 % по отношению к интактным животным. Гранулярная эндоплазматическая сеть нейронов при межпозвоночной грыже сформирована из разрозненных единичных коротких канальцев, в 45–65 % случаев наблюдается уменьшение протяженности, дегрануляция и вакуолизация сети. Ядрышки нейронов подвергаются сегрегации, дегрануляции, фрагментации и гипертрофии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глуценко, А. В. Эндоскопические методы лечения грыж межпозвоночных дисков на пояснично-крестцовом уровне / А. В. Глуценко, В. И. Матвеев, В. М. Ланецкая // III съезд нейрохирургов России : тез. докл. – СПб., 2002. – С. 608.
2. Осна, А. И. Диагностическая пункция и дерезепция диска / А. И. Осна // Основные принципы и задачи пункционного лечения остеохондроза позвоночника : сб. науч. тр. – Л., 1975. – С. 12–19.
3. Осна, А. И. Остеохондроз позвоночника / А. И. Осна. – Новокузнецк : Здоровье, 1973. – 117 с.
4. Павлова, В. Н. Некоторые морфофункциональные аспекты современной артрологии / В. Н. Павлова // Архив анатомии, гистологии, эмбриологии. – 1989. – Т. 97, № 7. – С. 5–11.
5. Павлова, В. Н. Проблемы и перспективы современной хондрологии / В. Н. Павлова, Г. Г. Павлов // Ревматология. – 1984. – Ч. 1, № 3. – С. 4–10.
6. Павлова, В. Н. Хрящ / В. Н. Павлова, Т. Н. Копьева, Л. И. Слуцкий. – М. : Медицина, 1988. – 184 с.
7. Толпекин, Е. Л. Отдаленные результаты микродискэктомии при грыжах поясничных межпозвоночных дисков / Е. Л. Толпекин, Ф. В. Олешкевич // Нейрохирургия. – 2006. – № 3. – С. 33–39.
8. Цивьян, Я. Л. Патология дегенерирующего межпозвоночного диска / Я. Л. Цивьян, А. А. Бурхун. – Новосибирск : Наука, 1988. – 215 с.
9. Cerillo, A. Paravertebral retropleuric microsurgery approach to the treatment of thoracic disc herniation. Personal experience and consideration of unsatisfactory results / A. Cerillo, B. Carangelo, M. C. Bruno // J. Neurosurg. Sci. – 2002. – Vol. 46. – P. 135–142.
10. Chambers, T. J. The pathology of the osteoclast / T. J. Chambers // J. Clin. Pathol. – 1985. – Vol. 38. – P. 241–252.
11. Chi, J. H. The Mini-Open transpedicular thoracic discectomy: surgical technique and assessment / J. H. Chi, S. S. Dhall, A. S. Kanter // Neurosurg Focus. – 2008. – Vol. 25, № 2. – P. 15–19.

12. Corpins, E. M. *Thoracic disc herniation and acute myelopathy: clinical presentation, neuroimaging findings, surgical considerations, and outcome* / E. M. Corpins, M. L. Janssen // *J. Neurosurg. Spine.* – 2011. – Vol. 14, № 4. – P. 520–528.
13. Cudia, S. P. *Thoracolumbar intervertebral disk disease in large, nonchondrodystrophic dogs* / S. P. Cuida, J. M. Duval // *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* – 1997. – Vol. 33, № 5. – P. 456–460.
14. Meij, B. P. *Degenerative lumbosacral stenosis in dogs* / B. P. Meij, N. Bergknut // *Vet. Clin. North Am Small Anim. Pract.* – 2010. – Vol. 40, № 5. – P. 983–1009.
15. Pacisewski, T. *The surgical and medical perioperative complications of anterior spinal fusion surgery in the thoracic and lumbar spine in adults: A review of 1223 procedures* / T. Pacisewski, R. B. Winter // *Spine.* – 1995. – Vol. 20. – P. 1592–1599.
16. Perez-Cruet, M. J. *Thoracic microendoscopic discectomy* / M. J. Perez-Cruet, B. S. Kim, F. Sandhu // *J. Neurosurg. Spine.* – 2004. – Vol. 1, № 1. – P. 58–63.

УДК 616.83-006:616.831-005.98-076.4

Латвис В., аспирант

Малашко В.В., доктор ветеринарных наук, профессор

УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА СОБАК ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ

Резюме

При опухолях головного мозга собак патологические процессы в нервных структурах сопровождаются деструкцией дендритов, снижением количества синаптических везикул в аксонных терминалах при астроцитоме на 29,06 % и олигодендроглиоме – на 28,13 %. На основании ультраструктурных характеристик синаптических элементов определено два типа изменений синаптического аппарата в нейронах коры головного мозга.

Summary

In canine brain tumors pathological processes in nervous structures are accompanied by the destruction of dendrites and activation of pinocytosis process in neuroglial cells. The number of synaptic vesicles in axonal terminals in astrocytoma has been found to be reduced by 29,06 percent, in oligodendroglioma – by 28,13 compared with the physiological norm. On the basis of ultrastructural characteristics, two types of changes in the synaptic apparatus in cerebral cortex neurons have been identified.

Поступила в редакцию 22.09.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема взаимосвязи структуры и функции нейрона является одной из важнейших в современной нейробиологии. Наиболее существенное теоретическое и прикладное значение имеет вопрос функциональных перестроек в структуре ЦНС при различных патологических состояниях [3, 7, 8, 13]. В связи с этим онкологические заболевания представляют актуальную медицинскую и ветеринарную проблему в нейрохирургии, онкологии и диагностике. Опухоли головного мозга, в частности у че-

ловека, составляют 85–90 % всех опухолей ЦНС и характеризуются широким спектром генетических нарушений, которые проявляются утратой или приобретением генетического материала с последующим туморогенезом. В процессе прогрессирования опухоли активируются различные сигнальные пути. Прежде всего это каскады, связанные с рецепторами фактора роста (эпидермального – EGF, тромбоцитарного – PDGF, сосудистого – VEGF и др.). Они вызывают многочисленные эффекты, направленные на усиление пролиферации,

инвазии и неоангиогенеза [2].

Опухоли головного мозга могут быть первичными, возникающими из клеток головного мозга и его оболочек, или вторичными, возникающими в другом месте и распространяющимися на мозг. Общая классификация опухолей головного мозга разделяет все виды опухолей на две большие группы: 1) субтенториальные – расположены в нижней части мозга (астроцитомы мозжечка); 2) супратенториальные – расположенные над мозжечковым наметом в верхних частях головного мозга [12].

Наиболее характерными гистопатологическими признаками, например, глиобластомы являются клеточный атипизм, фигуры митоза, фокусы некрозов с периферическими псевдополосадными структурами, пролиферация эндотелия кровеносных сосудов, что отличает их от низкодифференцированных астроцитарных опухолей. Глиобластома трудно отличима от анапластической (злокачественной) астроцитомы. Злокачественные глиомы часто демонстрируют внутриопухолевую гетерогенность или потерю характерных гистологических признаков.

Остановившись кратко на цитологической диагностике отдельных опухолей ЦНС, следует обратить внимание на астроглиальные опухоли. При фибриллярной астроцитоме в мазках видны вытянутые клетки опухоли с овально-круглыми ядрами, нежным хроматином и длинными тонкими четкими биополярными, реже мультиполярными отростками. В мазках пилоцитарной астроцитомы ядра имеют более грубый хроматин, четкие толстые отростки, длина которых достигает 100 мкм, толщина – 3–5 мкм. Для глиобластомы важным признаком является резко выраженный ядерный и клеточный полиморфизм [5, 10].

Мазки типичных менингиом, как правило, многоклеточные, представлены крупными скоплениями, более мелкими группами синтициального вида и одиночно расположенными клетками. Форма клеток может варьировать от полигональной и

эпителиоидной до веретенообразной, в ней могут быть видны ШИК-положительные включения и липиды [4].

Исходя из цитологического анализа, Ю.К. Батороев и др. [1] выделяют следующие подходы при цитологической диагностике опухолей ЦНС. Общие диагностические признаки, которые можно обнаружить при цитологической диагностике опухолей ЦНС, авторы разделили на клеточные и структурные. Фенотипы клеток нейроглии (астроциты различного типа и олигодендроциты) имеют определённые характерные клеточные признаки. Это клетки фибриллярной, протоплазматической и тучноклеточной астроцитомы. Ядра ганглиозных клеток, внутриядерные цитоплазматические включения в некоторых типах менингиом являются характерными особенностями клеток определенных видов опухолей [11, 13].

К структурным признакам Ю.К. Батороев и др. [1] относят: 1) розетки (нейробластома, медуллобластома); 2) папиллы (эпендиома, менингиома); 3) концентрические менинготелиоматозные тельца; 4) псаммомы; 5) нормальные и пролиферирующие сосуды; 6) топография клеток опухоли вокруг межклеточного матрикса шаровидной формы в миксопапиллярной эпендимоме.

До настоящего времени отсутствуют систематизированные количественные данные об изменении гомеостатических и морфологических параметров тканевых компонентов головного мозга домашних животных при поражении менингиомами, олигодендроглиомами, глиомами, периневромами, шванномами и другими злокачественными образованиями [14, 16, 18].

Прогресс в иммунологии, генетике, молекулярной биологии раскрыл многие механизмы, связанные с возникновением и развитием онкологического процесса. Появились новые подходы в диагностике, терапии, хирургические приемы в борьбе с опухолевыми образованиями в ЦНС и периферической нервной системе у домашних животных. Тем не менее, и сегодня не существует четких критериев и объясне-

ний в особенностях течения онкологической болезни у животных при поражении определенных функциональных зон головного мозга [15, 17, 19, 20].

Цель исследования – выявить структурно-функциональные изменения при онкологии головного мозга собак.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для постановки диагноза и классификации опухолей головного мозга у собак использовали предварительно адаптированную нейронную программу для аппарата МРТ GoogLeNet (перенос обучения) для послойного анализа при формировании рисунка. Опухоли головного мозга были разделены на три категории: астроцитарные, внутрижелудочковые и менингиомы согласно установленным МРТ признакам различных опухолей и данным ВОЗ «Классификация опухолей ЦНС, 2016», а также проведению гистологических исследований.

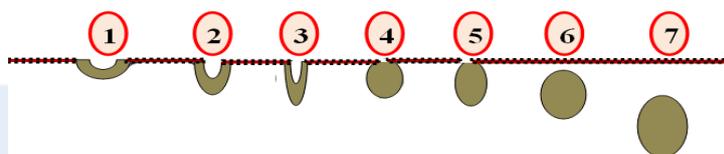
Для электронно-микроскопического исследования биоматериал (фрагменты размером 1,5–2,5 мм коры головного мозга собак, пораженного астроцитомой, олигодендроглиомой и менингиомой) фиксировали методом погружения в охлажденный 2,5%-ный раствор глутарового альдегида, приготовленного на фосфатном буфере (рН 7,3) в течение 2–3 часов. В последующем ткани помещали в 1%-ный раствор четырехоксида осмия на 2 часа при температуре +4 °С. После завершения альдегид-осмиевой фиксации биоматериал дегидрировали в спиртах возрастающей концентрации (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) и заключали в аралдит. Срезы готовили на ультратоме марки LKB (Швеция), контрастировали цитратом свинца по E.S. Reynolds (1963) и

просматривали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100СХ фирмы «JEOL» (Япония). Общее количество просмотренных нейронов (n=120) принимали за 100 % и определяли долю клеток с измененной ультраструктурой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании морфологических проявлений адаптивных изменений в нервной системе делается упор на изучение структуры синаптического аппарата, вовлеченного в обеспечение новых функциональных свойств. При электронно-микроскопическом анализе удалось выявить некоторые новые детали строения в синаптических соединениях нейронов коры головного мозга собак при онкологии. Формировались мультифокальные синапсы, когда одна аксонная терминаль контактировала с несколькими дендритами. Этот процесс можно условно назвать «дендритной интервенцией».

Впервые обращено внимание, что при опухолях головного мозга в нервных структурах активизируется микропиноцитоз, очевидно, являясь показателем временного повышенного метаболизма при патологических состояниях нейрона. На рисунке 1 показано формирование пиноцитозных везикул. На аксонной терминали булавовидной формы видны все стадии пиноцитозного образования везикул – от намечающегося выпячивания наружной мембраны вплоть до отшнуровки вновь образованного пузырька. Нередко пиноцитозные пузырьки бывают окаймлены по внешнему контуру электронно-плотными точечными частицами (это так называемые «coated vesicles» – опушенные, или окаймленные везикулы).

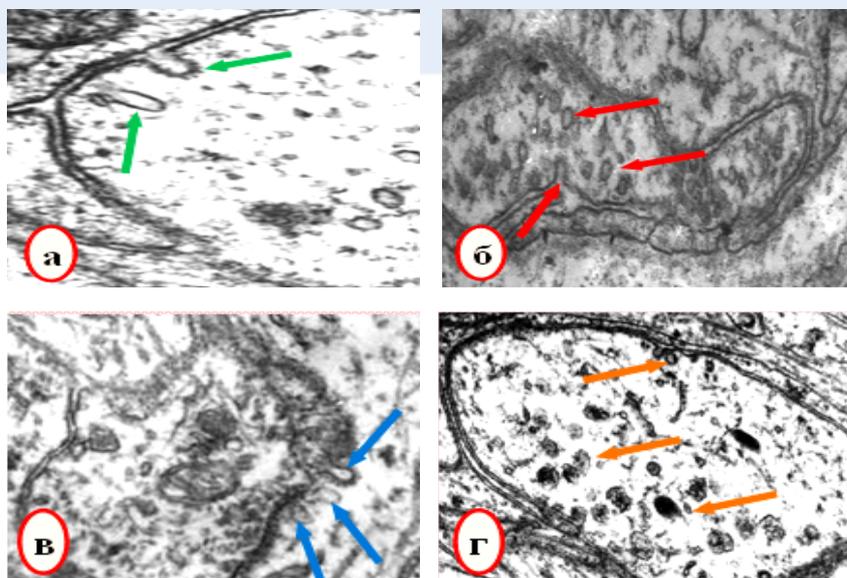


1–4 – намечающиеся выпячивания наружной мембраны;
5–7 – отшнуровки образованного пузырька

**Рисунок 1. – Последовательные этапы формирования пиноцитозных пузырьков.
Схема (по В.В. Малашко и др., 2020)**

Синаптические окончания способны осуществлять транспортировки через мембрану высокомолекулярных соединений с помощью пиноцитоза (рисунок 1). Особенно это проявляется при экстремальных ситуациях. Для простых углеводов и низкомолекулярных веществ мембрана синаптической бляшки проницаема, а высокомолекулярные соединения (белковые молекулы, нуклеопротеиды и др.) попадают в синаптическое окончание посредством тока аксоплазмы. Мы обнаружили, что при онкологии головного мозга активизируется пиноцитоз. Данный механизм направлен на поддержание функционирования межнейрональных контактов (рисунок 2). На данных электронограммах можно видеть все стадии пиноцитозного образования ве-

зикул. Вновь образованные везикулы несколько больше классических синаптических пузырьков, чаще их размер составляет 50–80 нм, пиноцитозных – 100–150 нм. Крупные везикулы обычно локализуются по периферии синаптического окончания, вдали от активных зон. Процессы микропиноцитоза часто наблюдаются в тех местах, где имеется плотный контакт с отростками глиоцитов. Мембрана образованного пузырька может растворяться, и его содержимое используется как пластический материал для строительства новых мембран (рисунок 2 г). Таким же образом происходит восполнение белкового дефицита синаптического окончания для построения различных ферментов, медиаторов, участвующих в синаптической передаче.



а – стадии формирования пиноцитозных везикул (стрелки); **б** – выпячивание мембраны (стрелка) и поступление в аксоплазму везикул (стрелки); **в** – везикулы на разных стадиях формирования, расположенные вдоль мембраны (стрелки); **г** – вновь сформированные везикулы в синаптической бляшке, везикулы на разных стадиях зрелости (стрелки)

Рисунок 2. – Последовательные этапы формирования пиноцитозных пузырьков в синаптических структурах при опухолях. Электронограммы. Ув.: а, б, в, г ×15000

При патологии, когда появляются нетипичные или измененные макромолекулы, микропиноцитоз играет существенную роль в результате изменения состояния плазмолеммы. Микровезикулы, выполняя транспортную функцию, в то же время являются полифункциональными органел-

лами, содержащими ряд ферментов, в том числе АТФ-азу, что указывает на их важную метаболическую активность. В экстремальных условиях (онкология головного мозга) в дендритах активно прогрессирует эндоцитоз. Лишенные микротрубочек дендриты захватывают фрагменты синаптичес-

ких бляшек, везикулы и другие структуры близлежащих зон. По сути дела, дендриты выполняют фагоцитарную роль при захвате синаптических бляшек. Следовательно, в условиях развития онкологического процесса для дендритов наиболее характерны изменения, которые проявляются вакуолизацией, набуханием, появлением миелоноподобных структур, нарушением ориентации микротрубочек и нейрофиламентов.

Деструкция микротрубочек приводит к включению интерстициального пространства для поддержания функциональной и трофической деятельности целевых тканей. При физиологической норме микротрубочки в дендритах различного диаметра равномерно заполняют дендритное пространство, в крупных и средних по размеру дендритах локализуются электронно-плотные митохондрии, их количество составляет от 2 до 5-6 органелл в поле зрения.

При опухолевом процессе нарушалось правильное пространственное распределение микротрубочек и появлялись различной формы и размеров вакуоли. Во многих случаях дендритические микротрубочки полностью исчезали. У некоторых дендритов, лишенных микротрубочек, бы-

ла отмечена интересная особенность: в них наблюдался активный процесс эндоцитоза, выражающийся в «заглатывании» фрагментов прилежащих к ним структур.

В крупных дендритах сохранились лишь единичные микротрубочки, чаще расположенные около оболочки отростков, отсюда дендроплазма содержит хлопьевидный материал. В мелких дендритах единичные микротрубочки рассредоточены по всей территории отростка. Происходит лизис мембран, и формируются плотные контакты между отростками. Оболочки дендритов покрыты хлопьевидным материалом. Просветленная дендроплазма, возможно, свидетельствует о гидропических изменениях, в частности при нарушении водно-электролитного баланса. Произведен подсчет плотности микротрубочек на единицу (1 мкм^2) площади поперечного сечения дендрита (таблица 1). Следует отметить, что дендритические микротрубочки, являющиеся строго унифицированными органеллами, присущи всем дендритам без исключения. Не исключено, что правильно пространственно организованные микротрубочки могут иметь отношение к проведению нервного возбуждения.

Таблица 1. – Плотность расположения микротрубочек в дендритах коры головного мозга собак

Вид опухоли	Концентрация микротрубочек на 1 мкм^2	
	норма	опухоль
Астроцитомы	127,64±6,72	93,05±2,18*
Олигодендроглиома	118,81±4,86	94,31±2,27*
Менингиома	114,95±3,38	107,19±2,63 ^{н/д}

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

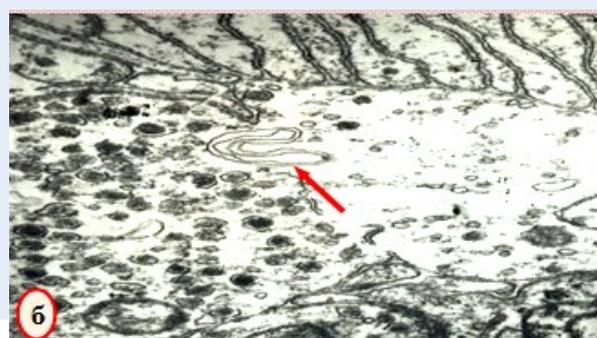
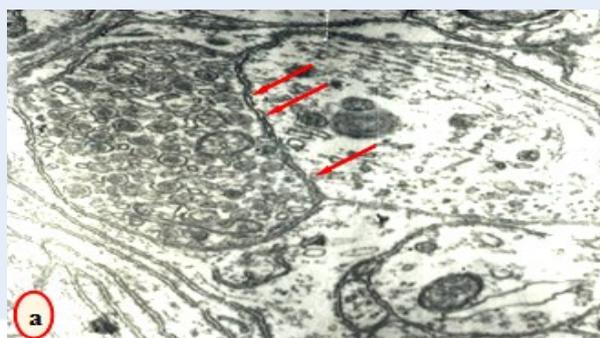
Анализ данных таблицы 1 показывает, что при астроцитоме плотность микротрубочек на 1 мкм^2 снижается на 27,10 % ($P < 0,01$), при олигодендроглиоме – на 20,62 % ($P < 0,01$), в то время как при менингиоме этот показатель недостоверен. Следует подчеркнуть, что микротрубочки наряду с микрофиламентами играют важную роль в регуляции пролиферации клеток, прежде всего влияя на подвижность

поверхностных рецепторов, а также отдельных внутриклеточных структур, включая эндоцитозные везикулы и др. В патологически измененных дендритах встречаются многочисленные мультивезикулярные тельца, таких структур на 23,17–28,38 % больше по сравнению с неизменными дендритами. Они представляют собой округлые формирования около 450–600 нм, всегда окружены элементарной

мембраной и содержат различной величины и формы пузырьки. Глубокие патологические изменения при глиоме, олигодендроглиоме происходят в синаптическом аппарате. В аксонной терминали концентрируется большое количество различной формы, электронной плотности и структуры везикул, часть которых полностью разрушена. Они локализируются по всей площади аксона (рисунок 3).

Вместе с тем, несмотря на большое число синаптических везикул, активной зо-

ны не формируется. В области двух контактирующих участков наблюдается фрагментация пре- и постсинаптической мембраны, которая напоминает цепочку. Аксонная терминаль становится электронно-плотной структурой, и, наоборот, дендрит электронно-светлый из-за деструкции органелл. В результате вышеуказанного патологического процесса аксонная терминаль дегенерирует по «светлому типу» (рисунок 3 б).



а – деформация синаптических везикул, участки разрушения мембраны, большая часть электронно-плотные и плеоморфные, фрагментация пре- и постсинаптической мембраны и формирование перфораций, (стрелки); **б** – дегенерация аксонной терминали по «светлому типу», превращение пре- и постсинаптической мембраны в полусферическую структуру (стрелка), лизис гранулярных и агранулярных синаптических везикул.

Разрушение мембран на границе бывших контактов

Рисунок 3. – Ультраструктура синапсов коры головного при опухолевом процессе. Электронограмма. Ув.: а, б ×20000

Это связано с тем, что большая часть структур лизировалась без их слияния и без нарушения целостности поверхностных мембран. В то же время пре- и постсинаптическая мембрана превращалась в деформированную своеобразную мембранную структуру. Наблюдается отек пресинаптического окончания, увеличение размеров. При «светлом типе» дегенерации происходит разборка элементов цитоскелета. Механизмом запуска повреждения может служить повышенная концентрация ионов кальция в цитоплазме при стойкой деполяризации наружной мембраны. Проведены количественные стереологические расчеты элементов синапсов коры головного мозга у интактных животных и при опухолях

(таблица 2). Из таблицы 2 видно, что ряд стереологических показателей имеет достоверные отличия от интактных животных. Наблюдается снижение числа синаптических везикул при астроцитоме на 29,06 % ($P < 0,01$), при олигодендроглиоме – на 28,13 % ($P < 0,01$). Не установлено достоверных отличий среди контроля и опухолей по числу активных зон синапсов. Снижение длины активных зон констатировано при астроцитоме, где данный показатель уменьшается на 27,54 % ($P < 0,01$).

Констатировано, что при астроцитоме длина контакта с телом нейрона уменьшается на 20,05 % ($P < 0,1$), при олигодендроглиоме – на 16,25 % ($P < 0,01$) и при менингиоме – на 17,66 % ($P < 0,01$).

Таблица 2. – Количественные данные элементов синапсов коры головного мозга собак

Показатель	Интактные животные	Вид опухоли		
		астроцитомы	олигодендроглиомы	менингиомы
Число везикул в синапсе, шт.	47,35±2,74	33,59±3,47*	34,03±3,72*	44,52±2,14 ^{н/д}
Число активных зон синапса	0,64±0,04	0,51±0,05 ^{н/д}	0,52±0,03 ^{н/д}	0,61±0,02 ^{н/д}
Длина активных зон синапса, нм	185,45±13,28	134,37±11,03*	147,87±10,87 ^{н/д}	174,33±14,49 ^{н/д}
Площадь синапса, мкм ²	2,78±0,45	2,14±0,37 ^{н/д}	2,51±0,42 ^{н/д}	2,64±0,48 ^{н/д}
Фактор формы синапса	0,92±0,03	0,95±0,03	0,94±0,04	0,91±0,04
Длина контакта синапса с телом нейрона, нм	2314,16±89,35	1851,22±63,54*	1938,06±61,19*	1905,43±58,38*

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

Увеличение фактора формы, означающее вытягивание структурных элементов синапса, приводит к увеличению расстояния между мембранами и свидетельствует о снижении функциональной активности. Синаптическая щель в месте синаптического комплекса несколько шире, чем обычное межклеточное пространство, и заполнено осмиофильным материалом. Проведенные стереологические расчеты показали, что ширина синаптической щели у интактных животных была в пределах 20,52±0,44–21,76±0,67 нм, при опухолях синаптическая щель меняла свои параметры за счет ее расширения. При астроцитоме размер синаптической щели превышал контрольные показатели на 45,36 % (P<0,01), при олигодендроглиоме и менингиоме – на 11,16 % (P<0,05) и 9,42 % (P<0,05) соответственно.

Таким образом, выделено два типа изменений синапсов в коре головного мозга собак при опухолях. I тип изменений сопровождается тем, что пресинаптические окончания содержат немногочисленные сравнительно крупные круглые светлые (агранулярные) и единичные вытянутые синаптические везикулы, образующие ассиметричные синапсы. II тип перестроек характеризуется тем, что пресинаптические

окончания заполнены мелкими круглыми светлыми и единичными гранулярными синаптическими пузырьками. Пресинаптические окончания формируют симметричные синапсы. Весьма чувствительны к онкологическому воздействию компоненты аксо-дендритических синапсов, т.е. те структурные части аксо-дендритических синапсов, которые несут рецептивную функцию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного электронно-микроскопического мониторинга установлено, что при поражении опухолями головного мозга в нервных структурах активизируется пиноцитоз на границе нейрон-глия. Патологические изменения дендритов нейронов сопровождаются вакуолизацией, набуханием, появлением миелиноподобных структур, нарушением ориентации микротрубочек и нейрофиламентов. При астроцитоме плотность микротрубочек на 1 мкм² площади дендритов снижается на 27,10 %, олигодендроглиоме – на 20,62 %, уменьшение числа синаптических везикул в аксонных терминалях при астроцитоме – на 29,06 %, олигодендроглиоме – на 28,13 % по отношению к физиологической норме. На основании

ультраструктурного анализа установлено два типа изменений синапсов в коре головного мозга собак при опухолях: при I типе пресинаптические окончания содержат немногочисленные крупные круглые светлые

(агранулярные) везикулы, образующие ассиметричные синапсы, при II типе пресинаптические окончания заполнены мелкими круглыми светлыми и единичными гранулярными синаптическими пузырьками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Батороев, Ю. К. *Возможности цитологической диагностики опухолей центральной нервной системы* / Ю. К. Батороев, В. В. Дворниченко // *Архив патологии*. – 2008. – Т. 70, № 4. – С. 26–30.
2. Борисов, К. Е. *Генные нарушения и молекулярно-генетические подтипы злокачественных глиом* / К. Е. Борисов, Д. Д. Сакаева // *Архив патологии*. – 2013. – Т. 75, № 3. – С. 52–61.
3. Гейнисман, Ю. Я. *Зависимость между характером синтетических влияний и направленность сдвигов содержания РНК в мотонейронах спинного мозга крысы* / Ю. Я. Гейнисман // *Нейрофизиология*. – 1972. – Т. 4, № 4. – С. 418–422.
4. Дралюк, М. Г. *Клинико-цитологическая диагностика в хирургии опухолей головного мозга: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 16.00.03* / М. Г. Дралюк : Ленингр. мед. ин-т. – Л., 1980. – 22 с.
5. Ермакова, К. В. *Морфологические критерии прогнозирования рецидивирования глиальных опухолей после фотодинамической терапии* / К. В. Ермакова, Е. А. Коган, С. А. Демура // *Российский биотерапевтический журн.* – 2007. – № 1. – С. 17.
6. Лобанова, Н. В. *Клинические, иммуногистохимические молекулярно-генетические факторы прогноза у больных глиобластомой* / Н. В. Лобанова, Л. В. Шишкина, М. В. Рыжова // *Архив патологии*. – 2016. – Т. 78, № 4. – С. 10–19.
7. Меркулова, О. С. *Реакция нейронов на длительную стимуляцию. Морфофизиологическое исследование* / О. С. Меркулова, Ю. А. Даринский. – Л. : Наука, 1982. – С. 3–6.
8. Чуппина, Л. М. *Созревание нейрональных элементов коры больших полушарий и коры мозжечка в отсутствие афферентного притока* / Л. М. Чуппина // *Роль сенсорного притока в созревании функций мозга: материалы междунар. симпозиума*. – М. : Наука, 1987. – С. 111–115.
9. Carmona, R. *Neuronal density in the different zones of the rabbit dLGN* / R. Carmona, R. Calvente // *Acta stereol.* – 1986. – Vol. 6, Suppl., № 3/1. – P. 515–530.
10. Cragg, B. G. *Plasticity of synapses* / B. G. Cragg // *The structure and function of nervous tissue*. – N. Y.; L. Acad. press, 1972. – Vol. 4. – P. 1–60.
11. Cuenod, M. *Enlarged synaptic vesicles in optic nerve terminals induced by intraocular injection of colchicine* / M. Cuenod, C. Sandri, K. Akert // *Brain Res.* – 1972. – Vol. 39. – P. 285–296.
12. Lutterbach, J. *Gliosarcomas: a clinical study* / J. Lutterbach, R. Guttenberger, R. Pagenstecher // *Radiother. and Oncol.* – 2001. – Vol. 6. – P. 57–64.
13. Vannucci, S. J. *Hypoxia-ischemia in the immature brain* / S. J. Vannucci, H. Hatberg // *J. Exp. Biol.* – 2004. – Vol. 207, № 18. – P. 3149–3154.
14. Varowsky, P. J. *Neuronal activity and energy metabolism* / P. J. Varowsky, D. H. Indvar // *Fed. Proc.* – 1981. – Vol. 40. – P. 2353–2362.
15. Vogt, M. *The concentration of sympathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after the administration of drugs* / M. Vogt // *J. physiol. (Gr. Brit.)*. – 2004. – Vol. 123. – P. 451–481.
16. Voshioka, H. *Dendritic development of cortical neurons of mice subjected to total asphyxia* / H. Voshioka, A. Ochi, S. Lino // *Acta neuropathol.* – 1986. – Vol. 70, № 4. – P. 185–189.
17. Wallace, M. N. *Glycogen phosphorylase as a histochemical marker of functional activity in the mouse brain* / M. N. Wallace // *J. Physiol (Gr. Brit.)*. – 1982. – Vol. 328. – P. 46–47.
18. Welsh, F. A. *Patterns of microcirculatory failure during incomplete cerebral ischemia* / F. A. Welsh, M. J. O'Connor // *Adv. Neural.* – 1978. – Vol. 20. – P. 133–139.
19. Wiggins, R. C. *Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems* / R. C. Wiggins, G. Fuller, S. I. Enna // *Life Sci.* – 1984. – Vol. 35, № 21. – P. 2085–2094.
20. Williams, R. W. *The control neuron number* / R. W. Williams, K. Herrup // *Anm. Rev. Neurosci.* – 1988. – Vol. 11. – P. 423–453.

УДК 619:616-085.37:636.52/.58

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Насонов И.В., доктор ветеринарных наук, доцент¹
Зуйкевич Т.А., кандидат сельскохозяйственных наук¹
Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор²
Журавлева Е.С., кандидат ветеринарных наук¹
Кныш Н.В., кандидат ветеринарных наук¹
Зинина Н.В., кандидат биологических наук¹
Яромчик Я.П., кандидат ветеринарных наук, доцент²
Бучукури Д.В., кандидат ветеринарных наук¹
Якубовский С.М., научный сотрудник¹
Осипенко А.Е., младший научный сотрудник¹

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

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА АНТИГЕНОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЖЕЛТОЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ ГИПЕРИММУНИЗАЦИИ КУР-НЕСУШЕК

Резюме

В статье приведены данные по разработке метода получения трансовариальных иммуноглобулинов, одним из этапов которой являлось определение оптимального состава и соотношения антигенов вирусов и бактерий для гипериммунизации кур-несушек. В результате проведенных исследований установлено, что в современных условиях ведения животноводства при инфекционных энтеритах телят наиболее распространенными возбудителями являются вирусы диареи, инфекционного ринотрахеита, рота- и коронавируса, а также бактерии *Escherichia coli*, производственные штаммы которых были использованы для иммунизации кур-несушек в виде монокомпонентов. Гипериммунизация птицы по разработанной схеме приводила к выработке специфических антител в титрах 5,0–8,0 log₂, что на 2,0–5,0 log₂ выше в сравнении с сочетанным введением антигенов.

Summary

The article provides data on the development of a method for obtaining transovarian immunoglobulins, one of the stages of which was to determine the optimal composition and ratio of antigens of viruses and bacteria for hyperimmunization of laying hens. As a result of the studies, it was found that in modern conditions of livestock farming with, the most common pathogens of infectious enteritis of calves are bovine viral diarrhea virus, bovine herpesvirus-1, rotavirus and coronavirus, as well as *Escherichia coli* bacteria, the production strains of which were used to immunize laying hens in the form of monocomponents. Hyperimmunization of poultry according to the developed scheme leads to the development of specific antibodies in titers – 5,0–8,0 log₂, which is 2,0–5,0 log₂ higher in comparison with the combined administration of antigens.

Поступила в редакцию 27.10.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях ведения животноводства у молодняка крупного рогатого скота в массовых масштабах проявляются желудочно-кишечные инфекции, вызванные вирусами диареи, инфекционного ринотрахеита, рота- и коронавирусами с последующим наслоением условно-

патогенной микрофлоры, которые сопровождаются большими потерями в виде низкого уровня сохранности поголовья и прироста живой массы, а также значительного снижения эффективности проводимых в хозяйстве вакцинаций [1, 2].

В связи с этим сегодня, когда устойчивость микроорганизмов к антибио-

тикам постоянно повышается, всё большее значение приобретает пассивная иммунизация, особенно при лечении и профилактике кишечных заболеваний, и этому направлению дает новый импульс возможность получения большого количества дешевых куриных антител [3, 6].

Наиболее изученным классом иммуноглобулинов у млекопитающих является иммуноглобулин класса G (IgG). Его молекулярная структура и функции хорошо изучены. В середине XX века птичьи иммуноглобулины также обозначались как IgG, но в настоящее время известно, что они отличаются от IgG млекопитающих по структуре и функциям. Поэтому было принято решение называть их IgY (от слова «yolk» – желток). Сывороточные иммуноглобулины птиц полностью идентичны желточным. Концентрация IgY в желтке сравнима с концентрацией IgY в сыворотке и составляет 6–13 мг/мл. Большое количество IgY, которое можно получить неинвазивным способом, делает кур идеальным поставщиком специфических антител. Из-за значительной филогенетической дистанции, отделяющей птиц от млекопитающих, иммунологические свойства IgY сильно отличаются от IgG. Так, IgY не взаимодействуют с компонентами комплемента млекопитающих, ревматоидным фактором и Fc-рецепторами млекопитающих, следовательно, IgY-антитела не взаимодействуют с эффекторами иммунной системы млекопитающих и не вызывают системных осложнений при лечении [3].

Благодаря высокой иммунореактивности птиц по отношению к чужеродным белкам инфекционного происхождения (бактериальным, вирусным, паразитарным), а также к растительным токсинам и искусственным, генно-инженерным антигенам аффинность IgY-антитела выше аффинности антител млекопитающих [8].

Кроме того, расходы на содержание птицы значительно ниже, чем на содержание крупных млекопитающих, часто используемых для пассивной иммунизации [4, 5].

Несистемное (местное) введение ан-

тител, специфичных для возбудителей, является привлекательным подходом для установления защитного иммунитета, особенно в отношении желудочно-кишечного тракта. Яйца являются нормальным компонентом питания, нет практически никакого риска от перорального применения IgY [7].

Использование IgY для пассивной иммунизации в кишечнике может быть определяющим фактором профилактики некоторых кишечных заболеваний, вызванных *Salmonella*, *E. coli* или ротавирусами. Эти антитела обеспечивают почти мгновенную защиту после перорального приема, тогда как активная иммунизация или вакцинация полагается на иммунную систему хозяина, чтобы генерировать иммунный ответ, который, как правило, развивается через несколько дней или недель. Пероральное введение IgY-антител предотвращает антимикробный зонтик, подавляя пролиферацию патогенов и предотвращая повреждение слизистой оболочки, при этом птичьи иммуноглобулины не являются источником воспалительных реакций в желудочно-кишечном тракте [3]. Агглютинирующие или токсиннейтрализующие эффекты IgY делают микроорганизмы неспособными к колонизации поверхности слизистой оболочки или выполнению токсигенных либо других функций, необходимых для проявления их вирулентности [6].

Исходя из вышесказанного, целью данной работы являлось определение оптимального состава антигенов вирусов и бактерий для получения желточных иммуноглобулинов при гипериммунизации кур-несушек.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась на базе отдела вирусных инфекций и отдела болезней птиц, пчел и физико-химических исследований РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», вивария института.

С целью определения этиологической роли возбудителей желудочно-кишечных инфекций у новорожденных телят в животноводческих хозяйствах республи-

ки, неблагополучных по вирусно-бактериальным пневмоэнтеритам, произведен отбор проб патологического материала (фекалии больных телят, содержимое кишечника, клетки эпителия слизистой оболочки тонкого отдела кишечника от павших или вынужденно убитых телят), а также пробы крови больных и переболевших телят, пробы крови и молозива коров-матерей для выявления противовирусных антител.

В работе использованы общепринятые бактериологические методы исследований для определения микрофлоры желудочно-кишечного тракта у телят с клинической картиной заболевания. С этой целью отбор патологического материала проводили от телят, не подвергавшихся антибиотикотерапии.

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

В дальнейшем полученный материал высевали на обычные и специальные плотные и жидкие питательные среды: мясопептонный агар и бульон, среду Китта-Тароцци, среды Эндо, Плоскирева, Левина, висмут-сульфитный агар, глюкозо-кровяной агар, мясо-пептонный агар с 8–10 % поваренной соли, МПБ с 1 % глюкозы и 10 % сыворотки крови лошади. Идентификацию выделенных культур проводили на основании морфологических, культуральных, биохимических и серологических свойств.

Этот же материал проверяли в полимеразной цепной реакции (ПЦР) на наличие антигенов вирусов инфекционного ринотрахеита (ИРТ), вирусной диареи (ВД), рота-, коронавируса, парагриппа-3 (ПГ-3) согласно наставлению по применению тест-систем.

Из проб крови телят готовили сыворотки стандартным методом: собранную кровь термостатировали в течение 1 ч при 37 °С. Пипеткой Пастера отделяли сгусток

от стенок пробирки с тем, чтобы облегчить его последующую ретракцию, пробирки с кровью выдерживали в холодильнике при плюс 4 °С в течение 10 ч, после чего форменные элементы крови осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 20 мин.

В сыворотках крови определяли титры антител к ИРТ, ПГ-3, рота- и коронавирусам, ВД в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с использованием эритроцитарных диагностикумов.

Определение оптимального состава антигенов вирусов и бактерий для гипериммунизации кур-несушек проведено на основании исследований по установлению этиологической структуры вирусов и бактерий-возбудителей инфекционных энтеритов молодняка крупного рогатого скота.

Исходя из полученных данных, для гипериммунизации кур-несушек были отобраны следующие штаммы, депонированные в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»:

- штамм ВД крупного рогатого скота «КМИЭВ-V120» – РНК-содержащий, представлен однокитевой РНК. Использован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром 6,5 lg ТЦД₅₀/мл. Вирус поддерживали в серийных пассажах и титровали на перевиваемой культуре клеток почки эмбриона крупного рогатого скота MDBK;

- штамм коронавируса крупного рогатого скота «КМИЭВ-V122» – РНК-содержащий, содержит положительно заряженную, одноцепочечную, несегментированную полиаденилированную РНК. Использован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром 5,25 lg ТЦД₅₀/мл. Вирус поддерживали в серийных пассажах и титровали на культуре клеток MDBK;

- штамм вируса ИРТ крупного рогатого скота «КМИЭВ-V123» – ДНК-геномный, содержит непрерывную линейную двуспиральную ДНК. Использован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром 6,75 lg ТЦД₅₀/мл. Вирус поддер-

живали в серийных пассажах и титровали на культуре клеток MDBK;

- штамм ротавируса крупного рогатого скота «КМИЭВ-V116» – РНК-содержащий, диаметр вириона 70–75 нм, нуклеиновая кислота представлена 11 сегментами двунитевой РНК. Использован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Вирус поддерживали в серийных пассажах и титровали на культуре клеток СПЭВ;

- штаммы бактерий *Escherichia coli* с адгезивными антигенами K88 (F4), K99 (F5), A20 (F17). Концентрация бактериаль-

ных клеток – $500 \text{ млн}/\text{см}^3$. Среда культивирования – бульон Хоттингера.

Для определения оптимального соотношения антигенов вирусов и бактерий при гипериммунизации птицы подобраны группы по 3 головы кур-несушек в возрасте 147 суток.

Кур иммунизировали внутримышечно в большую грудную мышцу вирусосодержащим материалом и бактериальной суспензией четырехкратно с интервалом 14 суток согласно схеме, представленной в таблице 1.

Таблица 1. – Схема гипериммунизации кур-несушек для определения оптимального соотношения антигенов вирусов и бактерий

Группа животных	Антигены	Доза на одно введение, см ³
Опытная группа № 1	ИРТ	0,5
Опытная группа № 2	ВД	0,5
Опытная группа № 3	ротавирус	0,5
Опытная группа № 4	коронавирус	0,5
Опытная группа № 5	<i>E. coli</i>	0,5
Опытная группа № 6	ИРТ+ВД	1,0
Опытная группа № 7	ИРТ+ВД+рота	1,5
Опытная группа № 8	ИРТ+ВД+рота+корона	2,0
Опытная группа № 9	ИРТ+ВД+рота+корона+ <i>E. coli</i>	2,5
Контрольная группа	физ. раствор	0,5

Через 14 суток после последней иммунизации отбирали пробы крови из подкрыльцовой вены иммунизированных кур-несушек с целью получения сыворотки и проверки ее на наличие антител к вирусам в РНГА и бактериям в реакции агглютинации (РА).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Нами было обследовано 12 животноводческих хозяйств, в которых реги-

стрировались инфекционные пневмоэнтериты. Проведены серологические исследования 110 проб биологического материала (сывороток крови) от переболевших пневмоэнтеритами телят 1–3-месячного возраста на наличие антител к вирусам ПГ-3, ИРТ, ВД, рота- и коронавирусам в РНГА (таблица 2). Положительными в РНГА считали пробы с титром не менее $4,0 \log_2$.

Таблица 2. – Распространение вирусов-возбудителей инфекционных пневмоэнтеритов молодняка крупного рогатого скота

Возбудитель	Исследовано проб	Положительно реагировало	%
ПГ-3	110	56	50,9
ИРТ	110	69	62,7
ВД	110	87	79,1
Ротавирус	110	75	68,2
Коронавирус	110	63	57,3

Как показывают данные таблицы 2, отмечается широкая циркуляция вирусозбудителей пневмоэнтеритов среди молодняка крупного рогатого скота в хозяйствах республики независимо от клинического состояния животных. Уровень антителоносительства к вышеуказанным вирусам у телят 1–3-месячного возраста колеблется в диапазоне значений от 50,9 до 79,1 %. Средний титр специфических антител составлял при этом 4,85 log₂.

Для установления этиологической структуры бактерий-возбудителей инфекционных энтеритов молодняка крупного рогатого скота отобрано 100 проб патматериала от павших и вынужденно убитых по причине вирусно-бактериальных энтеритов телят, из которых выделено 85 культур микроорганизмов.

В результате проведенных исследований при патологии желудочно-кишечно-

го тракта телят из патматериала выделены следующие бактерии: *Escherichia coli* (48,8 %), *Proteus mirabilis* (18,4 %), *Klebsiella pneumoniae* (15,2 %), *Salmonella spp.* (9,9 %), *Pseudomonas aeruginosa* (2,3 %), *Citrobacter freundii* (2,1 %), *Enterobacter aerogenes* (2,1 %) и др. Выделенные изоляты *E. coli*, *Pr. mirabilis*, и *Kl. pneumoniae* были патогенными для белых мышей.

На основании результатов исследований установлено, что в этиологической структуре желудочно-кишечных болезней телят основное место занимают вирусы ИРТ, ВД, рота- и коронавирусы, бактерии *E. coli*, клебсиеллы, протей и др.

Результаты опытов по определению оптимального соотношения антигенов вирусов и бактерий для гипериммунизации кур-несушек представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Определение оптимального соотношения антигенов вирусов и бактерий для гипериммунизации кур-несушек

Группа животных	Антиген	Титры антител в РНГА и РА, log ₂
Опытная группа № 1	ИРТ	5,0
Опытная группа № 2	ВД	5,0
Опытная группа № 3	ротавирус	6,0
Опытная группа № 4	коронавирус	5,0
Опытная группа № 5	<i>E. coli</i>	8,0
Опытная группа № 6	ИРТ	4,0
	ВД	5,0
Опытная группа № 7	ИРТ	4,0
	ВД	5,0
	ротавирус	4,0
Опытная группа № 8	ИРТ	4,0
	ВД	4,0
	ротавирус	5,0
	коронавирус	3,0
Опытная группа № 9	ИРТ	4,0
	ВД	3,0
	ротавирус	4,0
	коронавирус	3,0
	<i>E. coli</i>	5,0
Контрольная группа	ИРТ	0
	ВД	0
	ротавирус	0
	коронавирус	0
	<i>E. coli</i>	2,0

В результате проведенных исследований установлено, что оптимальной является схема иммунизации кур-несушек с использованием монокомпонентов вирусов и бактерий, применение которой приводило к выработке специфических антител в организме птицы в титрах 5,0–8,0 log₂, что на 2,0–5,0 log₂ выше в сравнении с сочетанным введением антигенов.

Такие результаты обусловлены тем, что многокомпонентные смеси, по-видимому, оказывают чрезмерную иммунологическую нагрузку на организм птицы, что приводит к снижению уровня гуморального ответа на каждый антиген в отдельности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В современных условиях ведения животноводства по данным серологических исследований степень распространения вирусов-возбудителей инфекционных пневмоэнтеритов молодняка крупного рогатого скота составляет: ПГ-3 – 50,9 %, ИРТ – 62,7 %, ВД – 79,1 %, ротавируса – 68,2 %, коронавируса – 57,3 %. Средний

титр специфических антител при этом – 4,85 log₂.

В процессе проведения бактериологических исследований патматериала при патологии желудочно-кишечного тракта выделены *Escherichia coli* (48,8 %), *Proteus mirabilis* (18,4 %), *Klebsiella pneumoniae* (15,2 %), *Salmonella spp.* (9,9 %), *Pseudomonas aeruginosa* (2,3 %), *Citrobacter freundii* (2,1 %), *Enterobacter aerogenes* (2,1 %) и др.

2. Оптимальной является иммунизация кур-несушек с использованием монокомпонентов вирусов (ИРТ, ВД, рота- и коронавируса) и бактерий (*E. coli*), которая приводит к выработке специфических антител в организме птицы в титрах 5,0–8,0 log₂, что на 2,0–5,0 log₂ выше в сравнении с сочетанным введением антигенов. Применение монокомпонентов вирусов и бактерий для гипериммунизации кур позволит в дальнейшем конструировать препараты на основе трансвариальных иммуноглобулинов к вирусам и бактериям, циркулирующим в каждом конкретном хозяйстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анализ заболеваемости молодняка КРС респираторными инфекциями / В. А. Мищенко [и др.] // *Ветеринария Кубани*. – 2008. – № 6. – С. 2–4.
2. Диагностика пневмоэнтеритов молодняка крупного рогатого скота в Республике Беларусь / А. Н. Притыченко [и др.] // *Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак почета» государственная академия ветеринарной медицины»*. – 2012. – Т. 48, № 1. – С. 54–59.
3. Каплин, В. С. IgY-технологии в медицине. Желточные антитела птиц в иммунотерапии / В. С. Каплин, О. Н. Каплина // *Международные обзоры: клиническая практика и здоровье*. – 2016. – № 4. – С. 59–75.
4. *Руководство по вакцинному и сывороточному делу*. – М., 1978. – 440 с.
5. *Руководство по профилактике в практическом здравоохранении* / под ред. И. С. Глазунова, Р. Г. Оганова [и др.] – М., 2000. – 217 с.
6. Mine, Y. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review / Y. Mine, J. Kovacs-Nolan // *Journal of medicinal food*. – 2002. – Vol. 5. – № 3. – P. 159–169.
7. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients / E. Nilsson [et al.] // *Pediatric pulmonology*. – 2008. – Vol. 43. – № 9. – P. 892–899.
7. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy / E. Spillner [et al.] // *Biologicals*. – 2012. – Vol. 40. – № 5. – P. 313–322.

УДК 619:615.284

Мяццова Т.Я., кандидат ветеринарных наук, доцент

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

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОГО АНТГЕЛЬМИНТИКА «ТРИКЛАМИЗОЛ» НА НЕКОТОРЫЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОРГАНИЗМА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Резюме

Комплексный препарат «Трикламизол» в терапевтической дозе и превышающей ее в 3 и 5 раз не оказывает отрицательного влияния на гематологические и некоторые биохимические (динамика общего белка и альбуминов, содержание макро- и микроэлементов в сыворотке крови) показатели организма кроликов. Активность аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, амилазы, креатининкиназы в сыворотке крови была в пределах физиологической нормы. Активность гамма-глутамилтрансферазы повышалась в зависимости от дозы препарата на 76,63 % и 76,17 % ($P < 0,05$) при дозах 300 мг/кг и 500 мг/кг массы тела на 10-й день после применения соответственно. На 29-й день активность глутамилтрансферазы была на уровне контрольных животных. У животных, получавших терапевтическую дозу, прирост массы тела составил 25,0 %, с увеличением дозы препарата в 3 и 5 раз – 19,56 % и 17,24 % соответственно против 21,42 % в контрольной группе.

Summary

The complex preparation «Triclamizol» in a therapeutic dose and exceeding it by 3 and 5 times does not have a negative effect on the hematological and some biochemical (dynamics of total protein and albumins, the content of macro- and microelements in blood serum) indicators of the body of rabbits. The activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, amylase, and creatinine kinase in blood serum was within the physiological norm. The activity of gamma-glutamyltransferase increased depending on the dose of the drug by 76,63 % and 76,17 % ($P < 0,05$) at doses of 300 mg/kg and 500 mg/kg of body weight on the 10th day after administration, respectively. On day 29, glutamyltransferase activity was at the level of control animals. In animals receiving the therapeutic dose, the body weight gain was 25,0 %, with a 3- and 5-fold increase in the dose of the drug by 19,56 % and 17,24 %, respectively, against 21,42 % in the control group.

Поступила в редакцию 05.10.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на проведение противогельминтных мероприятий, эпизоотическая ситуация по гельминтозам крупного рогатого скота требует проведения регулярных дегельминтизаций животных [5]. Большинство антгельминтиков оказывают негативное влияние на иммунобиологические процессы в организме животных, сопровождающееся снижением иммунобиологической резистентности, в т.ч. угнетением клеточного и гуморального иммунитета. Восстановление иммунобиологических показателей до физиологических значений происходит в течение более длительного периода времени по сравнению с поликомпонентными препаратами [1, 4, 6].

Разработанный препарат «Трикламизол» согласно ГОСТ 12.1.007-76 относится к веществам малоопасным, т.е. к 4-му классу опасности. Среднесмертельная доза препарата при внутрижелудочном введении для белых мышей составляет 6000 мг/кг. При даче с кормом максимально введенная доза составила 14000 мг/кг [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение влияния комплексного препарата на организм животных проводили согласно «Методическим указаниям по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии» [2].

Исследования проводили на кроли-

ках живым весом 2,9–3,1 кг. Было сформировано 4 группы кроликов – 3 опытные и 1 контрольная по три головы в каждой. Кроликам 1-й группы применили с кормами препарат в дозе 100 мг/кг, 2-й группы – в дозе 300 мг/кг и 3-й группы – в дозе 500 мг/кг внутрь один раз в день в течение трех дней подряд. Исследование крови проводили до начала применения препарата и через 10, 17, 24 и 29 дней после скармливания трикламизола. Определяли содержание гемоглобина, гематокрита и форменных элементов крови с выведением лейкоцитарной формулы по общепринятым методам и гематологическом анализаторе «Mythic 18».

Изучение влияния трикламизола в вышеуказанных дозах на биохимические показатели кроликов проводили путем исследования в те же сроки сывороток крови

на содержание общего белка, активность ферментов, содержание микро- и макроэлементов, глюкозы с использованием наборов «Cormey» на биохимическом анализаторе «Avtolyser».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение влияния на организм кроликов ветеринарного препарата «Трикламизол» в терапевтической дозе и в 3 и 5 раз превышающей ее показало, что в динамике гематологических показателей – уровня гемоглобина, количества эритроцитов и др. – у кроликов всех опытных групп достоверных изменений по отношению к аналогичным показателям животных контрольной группы не прослеживалось (таблица 1).

Таблица 1. – Динамика гематологических показателей кроликов при применении препарата «Трикламизол»

Дни исследований	Доза препарата, мг/кг			Контроль
	100	300	500	
1	2	3	4	5
Эритроциты, N (норма)= $4,5-7,5 \times 10^{12}/л$				
До применения	4,12±0,14	4,97±0,38	5,53±0,42	5,40±0,34
Через 10 дней	4,76±0,06	4,27±0,13	4,23±0,48	5,09±0,22
Через 17 дней	4,67±0,19	4,91±0,07	4,77±0,18	5,26±0,15
Через 24 дня	4,62±0,19	4,51±0,10	5,19±0,09	5,00±0,17
Через 29 дней	4,55±0,08	4,35±0,10	4,98±0,20	5,31±0,21
Гемоглобин, N=100,5–120 ммоль/л				
До применения	111,15±0,26	113,42±0,43	103,66±0,12	112,33±0,71
Через 10 дней	101,42±0,35	108,02±0,50	101,20±0,87	103,83±0,23
Через 17 дней	106,65±0,23	108,33±0,17	109,66±0,07	107,70±0,63
Через 24 дня	106,55±0,13	101,66±0,46	101,66±0,24	104,60±0,32
Через 29 дней	106,78±0,41	103,45±0,24	102,54±0,14	103,25±0,63
Гематокрит ht, N=0,35–0,45 L/L				
До применения	0,294±0,01	0,291±0,01	0,270±0,01	0,289±0,01
Через 10 дней	0,245±0,01	0,253±0,02	0,254±0,02	0,277±0,02
Через 17 дней	0,272±0,01	0,278±0,03	0,279±0,03	0,276±0,01
Через 24 дня	0,269±0,01	0,259±0,003	0,260±0,03	0,267±0,01
Через 29 дней	0,271±0,01	0,268±0,02	0,268±0,03	0,261±0,02
Среднеклеточная концентрация гемоглобина, N=29–37 g/L				
До применения	382±5,47	387±4,35	373,33±7,19	374,5±1,87
Через 10 дней	378±0,68	371±3,87	378,33±7,87	383,33±3,76
Через 17 дней	374,33±4,10	393±2,45	375,66±3,42	370,67±1,36
Через 24 дня	372±8,56	398,5±5,78	378±1,71	382,33±6,16
Через 29 дней	375±5,24	388±3,48	375±5,35	385±4,44

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
Тромбоциты, N=290–650×10 ⁹ /л				
До применения	324,33±44,93	321,66±28,76	374,33±84,93	475±16,25
Через 10 дней	350,66±58,73	379,66±58,21	250,66±78,76	414,33±37,67
Через 17 дней	319,33±71,34	318,03±68,49	349,33±99,34	363,67±18,15
Через 24 дня	377,66±25,06	358,33±10,27	370,66±15,06	325,33±13,69
Через 29 дней	375,01±9,87	347,58±35,87	375,01±10,87	350,44±21,54
Лимфоциты, N=1,96–9,47×10 ⁹				
До применения	5,96±0,12	4,53±0,22	5,066±0,3	5,1±0,06
Через 10 дней	4,1±0,25	4,76±0,45	4,133±0,54	4,75±0,07
Через 17 дней	4,6±0,12	4,5±0,61	5,033±0,71	5,85±0,05
Через 24 дня	5,3±0,45	4,36±0,51	4,1±0,65	4,9±0,05
Через 29 дней	5,3±0,25	4,58±0,35	5,02±0,25	4,88±0,10
Гранулоциты, N=30–80 %				
До применения	24,03±3,25	23,6±1,05	29,16±1,45	29,85±2,15
Через 10 дней	17,46±3,45	22,93±1,45	27,46±0,98	24,45±1,05
Через 17 дней	19,73±0,87	22,2±0,45	35,96±1,05	30,85±4,75
Через 24 дня	39,06±5,45	23,7±5,75	32,12±1,05	31,55±3,55
Через 29 дней	39,75±9,25	23,0±3,4	29,78±1,45	29,48±1,35

Содержание лейкоцитов в крови и их качественный состав не имел статистически достоверных изменений (таблица 2).

Таблица 2. – Влияние препарата «Трикламизол» на количественный и качественный состав клеток белой крови

Доза, мг/кг, и кратность применения препарата	Дни исследования	Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	Лейкоцитарная формула, %					
			Базофилы	Эозинофилы	Палочко-ядерные нейтрофилы	Сегментоядерные нейтрофилы	Лимфоциты	Моноциты
1	2	3	4	5	6	7	8	9
	норма	6,5–9,5	0–4	0–2	2–3	20–80	25–85	2–10
100, 3 дня	до применения	6,33±1,13	0	0	0	28,32±5,34	70,33±6,5	1,00±0,34
	через 10 дней	6,13±1,43	0	1,33±0,68	0,66±0,68	31,66±3,76	64,33±5,13	2±0,68
	через 17 дней	6,40±1,06	0	0,66±0,68	0	30,00±5,16	65,66±3,42	2,66±0,68
	через 24 дня	6,26±0,23	0	1,66±0,34	0	32,33±2,05	62,66±2,39	1,66±0,34
	через 29 дней	6,36±0,23	0	1,45±0,34	1±0,1	33,25±4,23	63,14±3,47	1,16±0,34

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
300, 3 дня	до применения	6,00±1,19	0	2±0	0	26,33±1,36	70,67±1,71	0,67±0,34
	через 10 дней	7,16±0,71	0	1,66±0,68	0,66±0,34	35,33±2,39	59,66±2,39	1,67±0,34
	через 17 дней	6,90±1,06	0	1,33±0,34	0	32,00±3,42	65,0±4,10	1,66±0,34
	через 24 дня	7,26±0,54	0	2±0	1,33±0,34	30,33±2,05	65,33±2,05	1,0±0
	через 29 дней	7,05±0,77	0	0	6±1,15	33,66±0,88	59,00±3,06	1,33±0,33
500, 3 дня	до применения	7,13±0,35		1±0	0	36,67±0,88	62,00±1,15	1,5±0,35
	через 10 дней	7,40±0,45	0	2±0	2±0	36,00±6,51	61,67±7,36	1,5±0,35
	через 17 дней	7,60±0,35	0	0	1,67±0,88	36,00±1,00	60,67±2,73	1,67±0,33
	через 24 дня	7,83±0,77	0	1,33±0,33	4±0	37,67±5,84	58,12±7,09	1,67±0,67
	через 29 дней	7,33±,56	0	1,5±0,35	0	30,67±2,6	68,00±2,08	1,00±0
Контроль	до применения	8,05±0,62	0	0	0	30,00±2,17	68,00±4,79	1,5±0,34
	через 10 дней	7,95±1,19	0	1±0,68	0	35,00±0,68	62,00±0,68	2,0±0
	через 17 дней	8,6±2,08	0	1±0	0,33±0,34	29,00±4,45	68,00±4,79	1,66±0,34
	через 24 дня	7,4±0,30	0	0	0	32,66±3,08	65,33±2,73	1±0
	через 29 дней	7,88±0,35	0	1,33±0,33	0,67±0,88	32,00±1,53	64,33±1,45	1,67±0,33

Из анализа качественных и количественных показателей лейкоцитов и их качественного соотношения в крови (таблица 2) следует, что достоверных изменений в клетках белой крови в течение всего периода наблюдений не происходило, и их колебания были в пределах физиологической нормы.

В таблице 3 представлены результаты исследований по изучению активности ферментов сыворотки крови, свидетельствующие о воздействии препарата «Трикламизол» на организм кроликов, в частности на печень.

В течение всего периода наблюдений в динамике активности аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, амилазы, креатининкиназы в сыворотке крови отмечались недостоверные колебания в пределах физиологической нормы. В динамике активности гамма-глутамилтранс-

феразы изменения были отмечены в зависимости от дозы препарата. Так, препарат в дозе 100 мг/кг не оказывает влияния на изменение активности фермента, тогда как при дозах 300 и 500 мг/кг наблюдается увеличение активности на 10-й день после применения препарата на 76,63 % и 76,17 % ($P<0,05$) соответственно. На высоком уровне активности глутамилтрансфераза сохранялась и на 24-й день в сыворотке кроликов, получавших препарат в дозе 500 мг/кг один раз в день в течение 3 дней подряд. На 29-й день активность глутамилтрансферазы была на уровне контрольных животных. Повышение уровня активности данного фермента, по-видимому, связана с некоторым отрицательным воздействием на печень, т.к. гамма-глутамилтрансфераза – это фермент, который служит неспецифическим биомаркером патологии печени. Его концентрация в крови повышается при

хронических гепатитах.

Изучение креатинина в сыворотке крови показало, что его активность была на уровне контрольных животных, что свидетельствует об отсутствии отрицательного действия трикламизола на функциональную деятельность почек.

Трехкратное применение препарата «Трикламизол» в терапевтической и трех- и пятикратной терапевтической дозах не оказывает влияния на работу поджелудочной железы, так как содержание амилазы в сыворотке крови изменялось незначительно.

Таблица 3. – Динамика активности ферментов сыворотки крови кроликов при применении препарата «Трикламизол»

Показатель	Доза, мг/кг	Дни исследований				
		до применения	через 10 дней	через 17 дней	через 24 дня	через 29 дней
Аланинаминотрансфераза, у/л	100	69,4±10,91	51,83±17,28	41,10±7,49	53,60±19,74	64,25±11,12
	300	46,90±21,77	41,56 ±14,65	62,13±10,07	59,35±8,92	66,90±9,48
	500	42,13±3,26	43,95±11,62	48,2±6,76	50,10±6,90	52,50±4,25
	контроль	49,93±18,41	39,35±14,44	39,83±13,12	43,95±28,83	45,00±4,25
Аспаргатаминотрансфераза, у/л	100	38,00±8,15	42,16±10,41	33,90±3,78	39,4±6,42	42,95±5,35
	300	30,63±6,06	39,30±9,48	59,06±7,46	32,90±3,37	42,75±5,24
	500	38,50±6,28	37,55±3,12	37,37±2,13	48,4±11,17	37,70±8,56
	контроль	34,86±7,79	34,65±2,65	39,03±1,55	39,35±1,53	32,30±4,25
Амилаза, у/л	100	119,66±14,09	121,00±21,03	127,50±8,24	134,50±18,11	125,46±23,45
	300	130,66±19,63	130,00±14,40	132,33±20,75	157,50±17,88	161,42±24,59
	500	125,00±25,85	121,00±19,23	125,66±9,98	123,00±14,65	121,55±12,13
	контроль	121,66±7,43	112,5±15,97	109,33±36,81	130,00±23,13	112,00±24,36
Гамма-глутамилтрансфераза, у/л	100	10,05±1,22	8,16±0,44	10,75±1,06	8,95±0,81	10,61±2,53
	300	10,52±2,06	12,10±3,53*	8,56±2,92	9,03±1,05	10,40±1,45
	500	10,01±0,98	12,42±0,44*	10,83±1,06	11,04±0,59*	9,88±1,05
	контроль	9,64±1,44	7,05±2,76	7,87±1,83	7,36±0,59	10,70±1,05
Креатининкиназа, у/л	100	2619,60±306,86	2939,60±293,88	2180,00±289,03	2689,5±161,58	2047,5±121,1
	300	1930,60±301,58	2995,30±210,23	2559,60±70,30	2269,0±68,77	2512,5±214,3
	500	2572,3±128,03	2202,50±311,66	1954,00±260,39	2385,00±129,92	2919,0±125,36
	контроль	2974,00±285,76	2401,00±95,97	2786,30±135,75	2609,00±50,56	3070,00±145,58

Примечание – Достоверность *P<0,05

Содержание общего белка в сыворотке крови кроликов в течение всего периода наблюдений находилось в пределах физиологической нормы (таблица 4).

Таблица 4. – Динамика общего белка и альбуминов в сыворотке крови кроликов после применения препарата «Трикламизол»

Доза препарата, мг/кг	Дни исследований				
	до применения	через 10 дней	через 17 дней	через 24 дней	через 29 дней
Общий белок, g/LN = 54–75 g/L					
100	51,00±2,46	49,10±4,10	54,10±3,76	52,10±5,82	44,65±3,045
300	54,76±0,30	52,56±6,16	54,50±5,82	56,50±5,47	43,15±2,75
500	53,9±2,14	54,00±4,23	58,86±4,23	63,30±2,21	49,60±3,01
Контроль	51,83±1,71	49,15±5,13	52,90±3,15	57,00±3,13	48,00±2,58
Альбумины, g/L					
100	36,60±2,46	37,83±4,10	39,15±3,76	39,20±5,82	31,55±4,25
300	39,73±0,30	38,16±6,16	40,10±5,82	43,40±5,47	32,15±3,47
500	39,06±2,35	38,5±5,01	38,08±3,48	46,7±4,35	33,4±2,38
Контроль	38,63±1,71	36,25±5,13	39,73±3,15	43,60±5,13	36,40±3,78

В поддержании гомеостаза организма определенная роль принадлежит макро- и микроэлементам. В таблице 5 представлены результаты изучения динамики кальция, фосфора, магния и железа в сыворотке крови кроликов после применения трикла-

мизола в дозах 100 мг/кг, 300 мг/кг и 500 мг/кг массы тела. Содержание микро- и макроэлементов в сыворотке крови кроликов не претерпевало статистически достоверных изменений.

Таблица 5. – Динамика содержания макро- и микроэлементов сыворотки крови кроликов при применении препарата «Трикламизол»

Показатель	Доза, препарата, мг/кг	Дни исследований				
		до применения	через 10 дней	через 17 дней	через 24 дня	через 29 дней
Кальций, ммоль/л	100	2,95±0,29	3,11±0,59	3,09±0,36	3,05±0,29	2,90±0,14
	300	3,15±0,05	2,96±0,22	3,04±0,21	3,40±0,14	2,97±0,09
	500	3,17±0,03	3,14±0,54	3,59±0,14	3,36±0,25	3,35±0,15
	контроль	2,99±0,21	2,8±0,16	2,93±0,60	2,97±0,54	3,25±0,10
Железо, мкмоль/л	100	38,83±2,23	34,71±8,12	48,35±2,10	39,30±3,89	39,10±2,45
	300	37,17±2,43	24,47±3,27	47,95±2,05	35,13±3,08	37,45±2,05
	500	29,16±3,85	26,09±3,47	35,78±2,74	37,84±9,87	37,87±3,44
	контроль	38,74±5,01	43,10±6,18	40,99±4,27	38,17±8,57	37,12±5,63
Магний, ммоль/л	100	1,56±0,05	1,23±0,16	2,57±0,21	1,37±0,06	1,88±0,02
	300	1,68±0,06	1,37±0,09	2,66±0,07	1,62±0,03	1,56±0,05
	500	1,79±0,02	1,23±0,16	2,63±0,14	1,51±0,14	1,56±0,04
	контроль	1,47±0,02	1,15±0,07	2,18±0,17	1,33±0,10	1,49±0,12
Фосфор, ммоль/л	100	2,16±0,14	1,89±0,13	1,96±1,85	2,35±0,07	2,00±0,89
	300	1,89±0,20	1,90±0,20	1,96±1,20	2,33±0,17	2,18±1,44
	500	1,80±0,13	1,80±0,13	1,76±0,82	2,25±0,27	1,85±0,97
	контроль	1,91±0,06	1,87±0,11	1,87±0,67	2,15±0,26	1,87±0,13

О положительном влиянии трикламизола на организм кроликов свидетельствует и динамика привесов массы тела в течение всего периода наблюдений, представленных в таблице 6.

Таблица 6. – Динамика привесов массы тела кроликов при применении препарата «Трикламизол»

Группа	Доза, мг/кг, и кратность применения препарата	Средняя масса тела до начала опыта, кг	Средняя масса тела в конце опыта, кг	Привес массы тела за 29 дней, кг	Средне-суточный привес, г	Прирост массы тела, %
1-я	100, 3 дня	2,96±0,08	3,70±0,13	0,74	25,52	25,00
2-я	300, 3 дня	2,76±0,05	3,30±0,03	0,54	18,60	19,56
3-я	500, 3 дня	2,90±0,13	3,40±0,10	0,50	17,24	17,24
Контроль	не применяли	2,80±0,07	3,40±0,40	0,60	20,69	21,42

Прирост массы тела у опытных животных 1-й группы, получавших терапевтическую дозу препарата, составил 25,0 % против 21,42 % в контрольной группе. С увеличением дозы препарата среднесуточные привесы массы тела ниже по сравнению с контрольными животными (группы 2 и 3).

ВЫВОДЫ

1. На основании полученных результатов исследований можно сделать заключение, что созданный комплексный препарат «Трикламизол» для ранней терапии и профилактики трематодозов и ассоциативных нематодозов крупного рогатого скота в терапевтической дозе и превышающей ее в 3 и 5 раз не оказывает отрицательного влияния на гематологические и некоторые биохимические (динамика общего белка и альбуминов, содержание макро- и микроэлементов в сыворотке крови) показатели организма кроликов.

Активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, амилазы,

креатининкиназы в сыворотке крови была в пределах физиологической нормы. Активность гамма-глутамилтрансферазы повышалась в зависимости от дозы препарата на 76,63 % и 76,17 % ($P < 0,05$) при дозах 300 мг/кг и 500 мг/кг массы тела соответственно на 10-й день после применения препарата. На 29-й день активность глутамилтрансферазы была на уровне контрольных животных. Повышение уровня активности данного фермента, по-видимому, связана с некоторым отрицательным воздействием препарата на печень, т.к. гамма-глутамилтрансфераза – это фермент, который служит неспецифическим биомаркером патологии печени.

2. Прирост массы тела у животных зависел от дозы препарата. У животных, получавших терапевтическую дозу, он составил 25,0 %. С увеличением дозы препарата в 3 и 5 раз среднесуточные привесы массы тела составляют 19,56 % и 17,24 % соответственно против 21,42 % в контрольной группе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Даугалиева, Э. Х. Иммунный статус и пути его коррекции при гельминтозах сельскохозяйственных животных / Э. Х. Даугалиева, В. В. Филиппов. – М. : ВО «Агропромиздат», 1991. – С. 120–127.
2. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии / Э. А. Высоцкий [и др.]. – Минск, 2007. – 156 с.
3. Мяцова, Т. Я. Токсикологические параметры комплексного антгельминтного препарата «Трикламизол» / Т. Я. Мяцова, М. В. Якубовский, Н. Ю. Щемелева // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – Минск, 2020. – № 1. – С. 56–59.
4. Напалкова, В. В. Фармако-токсикологические свойства суспензии на основе триклабендазола и ее терапевтическая эффективность при фасциолезе крупного рогатого скота: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / В. В. Напалкова. – М., 2008. – 33 с.
5. Якубовский, М. В. Особенности эпизоотологии и современные технологии профилактики паразитарных болезней / М. В. Якубовский // Вет. наука – производству. – Минск, 2010. – Вып. 40. – С. 84–91.
6. Якубовский, М. В. Резистентность паразитических организмов к лекарственным препаратам и пути ее профилактики / М. В. Якубовский // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – Минск, 2004. – № 1. – С. 37–39.

УДК 619:615

Кузьминский И.И., кандидат ветеринарных наук, доцент
Степанова Е.А., кандидат ветеринарных наук, доцент
Лиленко А.В., кандидат ветеринарных наук, доцент

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

ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТА «МЕТРАФАРМ»

Резюме

В статье представлены данные по фармако-токсикологической характеристике нового ветеринарный препарат «Метрафарм».

Описан опыт по определению острой токсичности препарата, его эмбриотоксического и тератогенного действия на лабораторных животных.

Среднесмертельная доза (LD_{50}) ветеринарного препарата «Метрафарм» при пероральном введении для белых мышей составила 62500 мг/кг массы тела. Препарат относится к веществам малоопасным (IV класс) с LD_{50} более 5000 мг/кг согласно ГОСТ 12.1.007-76. Лабораторный образец препарата не вызывает каких-либо отклонений от физиологической нормы в клиническом состоянии у мышей, получавших препарат в дозах 1/10, 1/20 и 1/50 дозы LD_{50} .

Установлено, что ветеринарный препарат «Метрафарм», применяемый в токсической дозе (30000,0 мг/кг массы тела) крысам в различные сроки беременности (периоды эмбриогенеза, органогенеза, плодный период филогенеза и в течение всего периода беременности), не вызывает патологических изменений в течение беременности у крыс, а также отклонений в развитии потомства, уродств, что свидетельствует об отсутствии у него эмбриотоксических и тератогенных свойств.

Summary

The article presents data on pharmaco-toxicological characterization of a new veterinary preparation «Metrofarm».

The article describes the experience of determining acute toxicity of the drug, embryotoxic and teratogenic effects of the drug on laboratory animals.

The average lethal dose (LD_{50}) of the veterinary drug Metrafarm when administered orally for white mice was 62500 mg/kg of body weight. The drug belongs to low-hazard substances (class IV) with an LD_{50} of more than 5000 mg/kg, according to GOST 12.1.007-76. The laboratory sample of the drug does not cause any deviations from the physiological norm in the clinical state in mice treated with the drug at doses of 1/10, 1/20 and 1/50 of the LD_{50} dose.

It was found that the veterinary drug «Metrafarm» used in a toxic dose (30000,0 mg/kg body weight) to rats at various stages of pregnancy (periods of embryogenesis, organogenesis, fetal phylogeny and throughout the pregnancy period) does not cause pathological changes during pregnancy in rats, as well as deviations in the development of offspring, deformities, which indicates the absence of embryotoxic and teratogenic properties.

Поступила в редакцию 03.12.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

Для Республики Беларусь высоко-развитое животноводство является основой обеспечения продовольственной безопасности страны, важнейшим условием сохранения суверенитета и независимости государства. В настоящее время в республике отрасль животноводства производит около 60 процентов валовой продукции

сельского хозяйства. Продуктивность животных во многом зависит от генетического потенциала. Однако реализовать его возможно только при условии поддержания здоровья животных [1].

Послеродовой эндометрит имеет наибольшее распространение в хозяйствах с относительно высоким уровнем обеспеченности кормами и благоустроенными

родильными отделениями. Уровень заболеваемости не снижается и в период летнего лагерного содержания и часто развивается после нормальных родов. Для лечения коров, больных эндометритом, в большинстве случаев в практической ветеринарии используются антибиотики, сульфаниламиды, нитрофураны и производные хиноксалина. Однако в настоящее время в мировой практике накопилось достаточно фактов и имеется множество научных публикаций о развитии резистентности микроорганизмов к различным химиотерапевтическим препаратам, вследствие чего эффективность их значительно снижается. Применение антибиотиков в связи с этим должно быть обоснованным [9, 11].

При несвоевременном или недостаточно эффективном лечении острый эндометрит в большинстве случаев принимает характер хронического течения с развитием необратимых изменений в матке, что в последующем приводит к постоянному бесплодию. Выбраковка коров из стада по причинам гинекологических заболеваний и яловости составляет 8,8–13,9 % (А.Г. Нежданов, А.Г. Шахов, 2005) и иногда до 30 % (В.Л. Ялуга, 2005) [2, 4].

Видовой состав микрофлоры, вызывающей неспецифическое воспаление гениталий у коров, довольно разнообразен, но преобладают в основном стрептококки, диплококки, стафилококки, протей и кишечная палочка [3, 12, 13, 15, 16].

Учитывая, что при воспалительном процессе в матке возникает нарушение местного кровообращения, питания, иммунитета, что приводит к глубоким гистоморфологическим изменениям, отражающимся на воспроизводительной способности и нередко приводящим к бесплодию коров, обоснованным является терапия с применением метаболических препаратов-антигипоксантов, витаминов, дезагрегантов, антиоксидантов, аминокислот, ферментативных препаратов [5, 6, 7, 8].

В связи с вышеизложенным, представляется вполне обоснованным и актуальным разработка препарата с антитоксическими свойствами, стимулирующего ре-

генерацию поврежденных участков слизистой, для лечения коров, больных эндометритом.

В РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» разработан новый ветеринарный препарат «Метрафарм».

Цель наших исследований – провести токсикологическую оценку разработанного препарата «Метрафарм».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение острой и хронической токсичности, а также эмбриотоксическое и тератогенное действие ветеринарного препарата «Метрафарм» провели согласно «Методическим указаниям по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии» (Минск, 2007) [10, 14, 17].

Для изучения острой токсичности в опыте использовали 36 клинически здоровых белых мышей обоего пола массой 18–20 г. Животные содержались на стандартном рационе со свободным доступом к корму и воде.

Для определения **острой токсичности** использовали «тест накопления». Для этого было сформировано пять опытных и одна контрольная группа, по 6 белых мышей в каждой. Введение препарата осуществляли внутривентрикулярно трехкратно с интервалом между введениями 2 часа. Мышам 1-й группы ввели препарат в дозе 30000,0 мг/кг, 2-й группы – 45000,0 мг/кг, 3-й группы – 60000,0 мг/кг, 4-й группы – 75000,0 мг/кг, 5-й группы – 90000,0 мг/кг, мышам контрольной группы вводили крахмальный клейстер в объеме, соответствующем объему вводимого препарата.

За животными вели постоянное клиническое наблюдение в течение 14 дней, при этом учитывали поведенческие реакции (возбуждение или угнетение), характер поедаемости корма, степень проявления реакции на внешние раздражители, клинический статус, время возникно-

вения и характер проявления интоксикации, сроки наступления гибели животных. Павших животных подвергали патолого-анатомическим исследованиям.

Для определения **хронической токсичности** препарата было сформировано 4 группы белых мышей по 10 животных в каждой живой массой по 18–20 г. Животным 1-й группы внутрижелудочно ввели 1/10 дозы LD₅₀ (6250 мг/кг), 2-й группы – 1/20 дозы LD₅₀ (3125 мг/кг), 3-й группы – 1/50 дозы LD₅₀ (1250 мг/кг), мыши 4-й группы служили контролем.

Ветеринарный препарат «Метрафарм» вводили животным в виде суспензии на крахмальном клейстере внутрижелудочно в течение 3 дней один раз в сутки натошак, контрольной группе мышей вводили крахмальный клейстер. Животных опытных и контрольных групп содержали в одинаковых условиях, кормление и поение их осуществляли спустя 3 часа после введения. Клинические наблюдения за животными вели в течение 14 дней, учитывая общее состояние, активность, состояние шерстного покрова, наличие или отсутствие аппетита, жажды.

Для изучения эмбриотоксического и тератогенного действия лабораторного образца препарата для профилактики и лечения воспалительных заболеваний матки у коров исследование препарата провели на 45 половозрелых белых крысах обоего пола массой тела 220–250 г. Было сформиро-

вано 5 групп: самок разделили на четыре опытные и одну контрольную группы по 7 голов и подсадили по 2 самца. Самок подсаживали в клетку к самцу вечером, а утром следующего дня исследовали мазок из влагалища. День обнаружения спермиев в мазке крыс (или влагалищной пробки у мышей) считали началом беременности. Препарат для профилактики и лечения воспалительных заболеваний матки у коров в дозе 30000,0 мг/кг массы тела применили крысам внутрь с кормом: в 1-й группе – с 1-го по 7-й день беременности (период эмбриогенеза), во 2-й группе – с 8-го по 14-й день беременности (период органогенеза), в 3-й группе – с 15 по 19 день беременности (плодный период филогенеза), в 4-й группе – с 1 по 19 день (в течение всего периода беременности). Контрольным крысам препарат не применяли. За крысами велось клиническое наблюдение.

Для выявления эмбриотоксического эффекта по 5 самок крыс из опытных и контрольной групп декапитировали на 20-й день беременности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В процессе проведения опыта по определению острой токсичности ветеринарного препарата «Метрафарм» на белых мышах получены следующие результаты (таблица 1).

Таблица 1. – Результаты определения острой токсичности препарата на белых мышах

№ группы	Доза препарата, мг/кг	Количество голов	После применения препарата	
			пало	выжило
1-я	30000	6	0	6
2-я	45000	6	1	5
3-я	60000	6	3	3
4-я	75000	6	4	2
5-я	90000	6	6	0
Контроль	-	6	0	6

Выявлено, что у мышей 1-й группы, получавших препарат в дозе 30000,0 мг/кг, в течение всего срока наблюдения (14 дней) не было клинических признаков интоксикации. Клинико-функциональный

статус у всех животных не имел отклонений от физиологического состояния, присущего мышам данной возрастной группы. В течение опытного периода гибели мышей в 1-й группе не было. У животных 2-й

группы (доза 45000,0 мг/кг) была отмечена гибель 1 особи на 6-е сутки наблюдения. У животных 3-й группы (доза 60000,0 мг/кг) в течение первых суток, а также на 3-4-е сутки наблюдалось снижение двигательной активности и реакции на внешние раздражители, после чего произошла нормализация выявленных нарушений, а через 16 ч и на 4-е сутки была отмечена гибель по 1 и 2 мыши в указанные сроки. У животных 4-й группы (доза 75000 мг/кг) на 1-2-е сутки была отмечена гибель 4 мышей. У животных 5-й группы (доза 90000,0 мг/кг) в течение первых 24 часов наблюдалось снижение двигательной активности и реакции на внешние раздражители, а через 5 ч и 24 ч, а также на 2-е, 3-и, 6-е и 8-е сутки после введения препарата была отмечена гибель по 1 мыши в указанные сроки. Животные контрольной группы оставались клинически здоровы.

Павших животных подвергали вскрытию. Было установлено, что печень, почки, селезенка темно-вишневого цвета и кровенаполнены, катарально-геморрагические изменения в желудочно-кишечном тракте, содержимое в желудке и кишечнике отсутствовало. У выживших мышей при вскрытии патологоанатомических изменений внутренних органов отмечено не было.

При расчете параметров острой токсичности методом Г.Н. Першина установ-

лено, что при пероральном введении ветеринарного препарата «Метрафарм» мышам ЛД₅₀ составило 62500 мг/кг массы тела. Таким образом, препарат относится к веществам малоопасным (IV класс) с LD₅₀ более 5000 мг/кг согласно ГОСТ 12.1.007-76.

В ходе проведения второй серии опыта по определению хронической токсичности ветеринарного препарата «Метрафарм» установлено, что после каждого введения суспензии препарата и в течение всего периода наблюдений у мышей всех опытных и контрольной групп отклонений в клиническом состоянии от физиологической нормы отмечено не было, т.е. животные были активны, охотно поедали корм, жажда отсутствовала, шерстный покров оставался гладким и блестящим.

При определении эмбриотоксического эффекта по результатам вскрытия матки и обследования плаценты, плодов, определения числа желтых тел беременности в яичниках, количества мест имплантации в матке, количества живых и мертвых зародышей установлено, что количество живых плодов у самок 1-й группы 57, 2-й группы – 60, 3-й группы – 57, 4-й – 56, контрольной – 61 соответственно. Количество мест имплантации совпадало с количеством живых плодов. Мертвых плодов не отмечали (таблица 2).

Таблица 2. – Учет показателей эмбриотоксического эффекта у крыс

№ группы	Количество голов	20-й день беременности		
		Эмбриотоксический эффект		
		количество живых плодов	количество мест имплантации	количество мертвых плодов
1-я	5	11+13+10+12+11=57	11+13+10+12+11=57	0
2-я	5	11+14+12+13+10=60	11+14+12+13+10=60	0
3-я	5	12+10+11+11+13=57	12+10+11+11+13=57	0
4-я	5	11+10+11+12+12=56	11+10+11+12+12=56	0
Контроль	5	11+11+13+12+14=61	11+11+13+12+14=61	0

Для выявления тератогенного эффекта плоды переносили в чашки Петри с физиологическим раствором и исследовали под бинокулярной лупой с целью выявления уродств. При этом аномалий глаз (анофтальмия, микрофтальмия и др.), мозга (мозговая грыжа и прочие аномалии),

лицевого черепа (заячья губа, волчья пасть и др.), конечностей, пальцев, хвоста, позвоночника, передней брюшной стенки не выявлено, что подтверждает отсутствие эмбриотоксического и тератогенного действия комплексного препарата на эмбрионы крысят (таблица 3).

Таблица 3. – Результаты изучения тератогенного действия лабораторного образца препарата при введении белым крысам

Показатели	№ группы, количество голов				
	1-я (п=5)	2-я (п=5)	3-я (п=5)	4-я (п=5)	Контроль (п=5)
Количество мест имплантаций в матке	11,2±0,20	11,6±0,81	11,4±0,50	12,0±0,31	12,0±0,70
Количество живых плодов	11,2±0,20	11,6±0,81	11,4±0,50	12,0±0,31	12,0±0,70
Количество погибших плодов	0	0	0	0	0
Аномалии развития внутренних органов и скелета	отсутствуют				
Уродства	отсутствуют				
Масса эмбрионов, г	3,13±0,02	3,12±0,03	3,14±0,03	3,13±0,02	3,12±0,02

Таким образом, препарат не имеет тератогенных свойств.

Для выяснения органогенеза в постнатальном периоде было получено потомство от двух самок из каждой группы, за которым вели клиническое наблюдение в течение 2 месяцев. При этом учитывали

двигательную активность, сроки открытия глаз, появление шерстного покрова и т.д. Результаты исследований показали, что во всех опытных и контрольной группах патологических родов, уродств и мертворожденных животных не наблюдали (таблица 4).

Таблица 4. – Учет показателей органогенеза в постнатальном периоде у крыс

№ группы	Кол-во голов	Постнатальный период					
		кол-во потомства, голов	мертворожденных животных	двигательная активность	сосательный рефлекс	опушение крысят, дн.	открылись глаза, дн.
1-я	2	11+13=24	0	+	+	8–10	14–17
2-я	2	11+12=23	0	+	+	7–9	15–18
3-я	2	12+13=25	0	+	+	8–10	15–17
4-я	2	10+13=23	0	+	+	7–10	14–17
Контроль	2	13+11=24	0	+	+	7–10	15–18

Отмечали рождение 24 крысят в 1-й группе, 23 крысят во 2-й группе, 25 крысят в 3-й, 23 крысят в 4-й группе и 24 крысят в контрольной группе. Двигательная активность крысят нарушена не была. Кожные покровы целостные, сосательный рефлекс хороший. Опушение крысят начиналось в 1-й группе на 8–10-й день, глаза полностью открылись на 14–17-й день; во 2 группе – на 7–9-й день, глаза полностью открылись на 15–18-й день; в 3-й группе – на 8–10-й, глаза полностью открылись на 15–17-й день; в 4-й группе – на 7–10-й, глаза полностью открылись на 14–17-й день; в 5-й группе – на 7–10-й и 15–18-й день соответственно.

Наблюдение за крысятами на протяжении 2 месяцев показало, что отклоне-

ний в их поведении, развитии и физиологическом состоянии не было отмечено. Аппетит был хороший, животные подвижные. Потомство во всех группах развивалось одинаково, без каких-либо изменений, сохранность составила 100 %.

Таким образом, ветеринарный препарат «Метрафарм», применяемый в дозе 30000,0 мг/кг массы тела крысам в различные сроки беременности (периоды эмбриогенеза, органогенеза, плодный период филогенеза и в течение всего периода беременности), не вызывает патологических изменений в течение беременности у крыс, а также отклонений в развитии потомства, что свидетельствует об отсутствии у препарата тератогенных, мутагенных и эмбриотоксических свойств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среднесмертельная доза (LD₅₀) ветеринарного препарата «Метрафарм» при пероральном введении для белых мышей составила 62500 мг/кг массы тела. Препарат относится к веществам малоопасным (IV класс) с LD₅₀ более 5000 мг/кг согласно ГОСТ 12.1.007-76. Лабораторный образец препарата не вызывает каких-либо отклонений от физиологической нормы в клиническом состоянии у мышей, получавших 1/10, 1/20 и 1/50 дозы LD₅₀.

Установлено что ветеринарный препарат «Метрафарм», применяемый в токсической дозе (30000,0 мг/кг массы тела) крысам в различные сроки беременности (периоды эмбриогенеза, органогенеза, плодный период филогенеза и в течение всего периода беременности) не вызывает патологических изменений в течение беременности у крыс, а также отклонений в развитии потомства, уродств, что свидетельствует об отсутствии у него эмбриотоксических и тератогенных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агафоновичев, В. А. Фармакопрофилактика симптоматического бесплодия коров на почве слабых схваток, субинволюции половой сферы и эндометрита : автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук / В. А. Агафоновичев. – Ставрополь, 1989. – 23 с.
2. Андреева, А. В. Некоторые показатели естественной резистентности организма коров, больных эндометритами / А. В. Андреева // Вестник ветеринарии : научные труды Академии ветеринарной медицины. – Вып. V. – Оренбург, 2002. – С. 13–17.
3. Багманов, М. А. Микрофлора матки коров после нормальных и патологических родов / М. А. Багманов // Актуальные проблемы и достижения в области репродукции и биотехнологии : сб. науч. тр. – Ставрополь, 1998. – С. 179–181.
4. Баженова, Н. Б. Лечение коров при остром эндометрите / Н. Б. Баженова // Ветеринария. – 1989. – Вып. 2. – С. 42–43.
5. Валюшкин, К. Д. Акушерско-гинекологическая диспансеризация-коров и телок / К. Д. Валюшкин. – Минск, 1987. – 126 с.
6. Гавриш, В. Г. Субклинический эндометрит у коров (диагностика и терапия) / В. Г. Гавриш // Ветеринария. – 1998. – № 1. – С. 36–38.
7. Грига, О. Э. Комплексная фармако-коррекция гнойно-катарального эндометрита у коров : автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук / О. Э. Грига. – Краснодар, 2006. – 17 с.
8. Губаревич, Я. Г. Акушерство, гинекология и основы искусственного осеменения сельскохозяйственных животных / Я. Г. Губаревич. – Л. : Сельхозгиз, 1948. – 399 с.
9. Машиковский, М. Д. Лекарственные средства. Пособие для врачей : справочник / М. Д. Машиковский. – 15-е изд. – М. : Новая Волна, 2005. – 1164 с.
10. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии / НАН Беларуси, Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского ; сост. : А. Э. Высоцкий [и др.]. – Минск, 2007. – 156 с.
11. Мозгов, И. Е. Фармакология / И. Е. Мозгов. – М. : Агропромиздат, 1985. – 455 с.
12. Муртазин, Б. Ф. Бактериальная флора при эндометритах у коров (идентификация и терапия) : автореф. дисс. ... канд. ветеринар. наук / Б. Ф. Муртазин. – М., 1972. – 20 с.
13. Напримеров, В. А. Микрофлора матки при гнойно-катаральных эндометритах у коров / В. А. Напримеров // Актуальные проблемы сельскохозяйственной экологии. – Новосибирск, 2004. – С. 39–42.
14. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М. : ЗАО ИИА «Ремедиум», 2005. – 398 с.
15. Сафронова, Л. А. Характеристика микрофлоры выделенной при эндометритах крупного рогатого скота / Л. А. Сафронова, В. А. Кудрявцев, А. И. Осадчая // Микробиологический журнал. – 1991. – Т. 53 – № 6. – С. 71–77.
16. Сидоров, М. А. Нормальная микрофлора животных и ее коррекция пробиотиками / М. А. Сидоров, В. В. Субботин, Н. В. Данилевская // Ветеринария. – 2000. – № 11. – С. 17–21.
17. ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности : ГОСТ 12.1.007-76. – Введ. 01.01.77. – М. : Изд-во стандартов, 1976.

УДК 619:615.28:614.48

Каменская Т.Н., кандидат ветеринарных наук
 Лукьянчик С.А., кандидат сельскохозяйственных наук
 Кривенок Л.Л., младший научный сотрудник
 Хендогина О.В., старший научный сотрудник

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

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ И ВЛИЯНИЕ СРЕДСТВА ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО «АЛЬДЕЧАС» НА ПРОДУКТЫ УБОЯ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЕГО ПРИМЕНЕНИИ В РАБОЧИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ

Резюме

В статье идет речь об антимикробной активности нового дезинфицирующего средства «Альдечас», созданного в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», и влиянии его применения на продукты убоя животных.

Summary

The article deals with the antimicrobial activity of the new disinfectant «Aldechас», created in the Republican unitary enterprise «Institute of experimental veterinary medicine» and the impact of its application on animal slaughter products.

Поступила в редакцию 05.10.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

На базе РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» разработано и внедрено новое средство дезинфицирующее «Альдечас». Средство внесено в Реестр ветеринарных препаратов. Представляет собой прозрачную жидкость синего цвета. При хранении допускается наличие легкой опалесценции, хорошо смешивается с водой в любых соотношениях. В состав средства дезинфицирующего «Альдечас» в качестве активно действующих веществ входят компоненты из группы альдегидов, четвертичных аммониевых соединений, фунгицидного неорганического соединения и вспомогательных компонентов: изопропанола, комплексообразователя и воды. Срок годности в невскрытой упаковке производителя средства – 3 года. Средство по степени воздействия на организм при введении в желудок относится к 3-му классу умеренно опасных веществ по ГОСТ 12.1.007-76. Применяется для проведения профилактической и

вынужденной дезинфекции объектов ветеринарного надзора, включая животноводческие помещения, находящееся в них технологическое оборудование, вспомогательные объекты животноводства, а также виварии, лечебницы, клиники; для проведения дезинфекции боенских пунктов и имеющегося в них оборудования; для дезинфекции транспортных средств, используемых для перевозки сельскохозяйственных животных, навоза, кормов; для заправки санпропускников, дезинфекционных барьеров, ванн и ковриков; для дезинфекции одежды и обуви обслуживающего персонала, инвентаря и предметов ухода за животными; для дезинфекции навоза и других объектов, с которыми могут контактировать больные животные и обслуживающий персонал и которые могут быть фактором передачи заболеваний. Средство также применяется для обработки копыт с целью профилактики гнойно-некротических поражений.

Ниже приведены результаты исследова-

дований по изучению антимикробной активности и влияния средства дезинфицирующего «Альдечас» на продукты убоя животных при его применении в рабочих концентрациях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антимикробную активность средства дезинфицирующего «Альдечас» изучали согласно СанПиН 21-112-99 «Нормативные показатели безопасности эффективности дезинфекционных средств» [6], а также Временной инструкции «Методы испытания противомикробной активности дезинфицирующих средств» № 4718 от 24.12.98 г. [5].

Опыты начинали с приготовления основного (базового – 1:50) разведения испытуемого раствора средства дезинфицирующего «Альдечас». Приготовленный раствор последовательно разведений доводили до соответствующего разведения, в котором бактериальная тест-культура могла быть обеззаражена или сохраняла свою жизнеспособность. Одновременно готовили бульонную культуру микробов кишечной палочки и вносили в колбы, содержащие испытуемые концентрации средства. После экспозиции 10 и 30 минут бактериологической петлей брали пробы и переносили в пробирки с МПБ, которые помещали в термостат с температурой 37 °С. Первый раз посеvy проверяли через 24 часа, окончательно – через 48 часов. Параллельно определяли фенольный коэффициент и белковый индекс.

На втором этапе провели количественный суспензионный тест. Взвеси суточных тест-микроорганизмов (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium terrae*) в физиологическом растворе с 20 % лошадиной сыворотки стандартизировали с использованием денситометра DEN-1 до 10^9 клеток/см³, смешивали с водными рабочими растворами дезинфицирующего средства «Альдечас» разных концентраций. По истечении заданной экспозиции дезинфицирующее средство нейтрализовали и проводили высевы на питательные среды. В контрольных образ-

цах взвесь тест-культур смешивали со стерильной водопроводной водой с такой же экспозицией, как и экспозиция дезинфицирующего средства «Альдечас», и после нейтрализации высевали на питательные среды. Посевы инкубировали в термостате в течение 48 часов. Подсчитывали число колоний и устанавливали число выживших бактерий (КОЕ/см³) в опыте и в контроле. Определяли десятичные логарифмы и фактор редукции.

Выявленные в суспензионном тесте эффективные концентрации средства дезинфицирующего «Альдечас» проверяли на инфицированных культурой *Staphylococcus aureus* (нагрузка 10^9 КОЕ/см³) тест-объектах (дерево, металл, бетон, кафель, резина, стекло) с белковой нагрузкой и с использованием различных экспозиций. Контролем служили тест-объекты, обработанные стерильной водопроводной водой. Учет бактерицидного действия вели по наличию или отсутствию роста в опыте и контроле. Оценку качества дезинфекции проводили по наличию или отсутствию роста исходных тест-культур на питательных средах, взятых с опытных и контрольных тест-объектов.

Результаты данных исследований являлись основой для отработки режимов дезинфекции.

На третьем этапе определяли качественные показатели продуктов животноводства при применении средства дезинфицирующего «Альдечас».

Для проведения опыта по изучению влияния обработок средством дезинфицирующим «Альдечас» в виварии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» было подобрано два бокса, где содержали опытную и контрольную группы кроликов.

Животных опытной группы подвергали аэрозольной обработке методом холодного тумана 2,0%-ным рабочим раствором средства ежедневно в течение 30 дней, расход препарата – 10 см³/м³. В группе контрольных животных аэрозольная дезинфекция не проводилась. По окончании опыта кролики были подверг-

нуты убою и проведена ветеринарно-санитарная экспертиза туш и органов животных, находившихся в опыте, в сравнении с контрольной группой (здоровые кролики, не подвергшиеся обработке, согласно общепринятым методикам).

Оценку качества мяса кроликов проводили согласно ГОСТ 20235.1-74, ГОСТ 20235.2-74 [2, 3, 4] и действующим Правилам ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов [1]. В мясе определяли содержание полипептидов и других продуктов распада белков – реакцией с сернокислой медью, концентрацию водородных ионов (рН) – иономером, количество аминоаммиачного азота и летучих жирных кислот – методом титрования. Готовили мазки-отпечатки из глубоких слоев мышц, окрашивали по Граму и микроскопировали.

Биологическую ценность и безвредность мяса кроликов, находившихся в опы-

те, исследовали согласно «Методическим указаниям по токсико-биологической оценке мяса, мясных продуктов и молока с использованием инфузорий Тетрахимена пириформис» (утв. ГУВ МСХиП Республики Беларусь, 1997 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На первом этапе нами было изучено максимальное разведение, при котором проявлялся бактерицидный эффект к культуре кишечной палочки (таблица 1). Из таблицы видно, что средство дезинфицирующее «Альдечас» обладает хорошей бактерицидной активностью, его бактерицидное разведение составило 1:2429,8, фенольный коэффициент – 17,68. Это говорит о том, что дезинфицирующее средство в 17,68 раз бактерицидно активнее фенола. В присутствии белка бактерицидная активность средства снижалась, о чем говорит белковый индекс, равный 1,67.

Таблица 1. – Бактерицидное действие дезинфицирующего средства «Альдечас» в отношении тест-культуры *Escherichia coli*

Средство	Бактерицидное разведение при экспозиции, минут			Фенольный коэффициент	Белковый индекс
	10	30	среднее		
Фенол	1:98	1:192,8	1:145,4		
Альдечас	1:2024,8	1:2834,7	1:2429,8	17,68	
Альдечас + белок	1:1446,3	1:1446,3	1:1446,3		1,67

В опыте по изучению антимикробной активности средства дезинфицирующего «Альдечас» в количественном суспензионном методе (таблица 2) в испытанных режимах установлено, что с белковой нагрузкой и без нее средство оказывало воздействие на тест-микробы, относящиеся к I и II группам по чувствительности к дезинфектантам, в концентрации 0,2 %, экспозиция 60 минут, 0,3 % – экспозиция 30

минут; III группа – при концентрации 0,3 % – экспозиция 120 минут, концентрации 0,4 % – экспозиция 90 минут, при туберкулезе – концентрация 1,0 %, экспозиция 120 минут. В вышеуказанных концентрациях фактор редукции был выше 5 lg, что соответствует нормативным микробиологическим показателям дезинфицирующих средств (СанПиН 21-112-99).

САНИТАРИЯ

Таблица 2. – Антимикробная активность средства дезинфицирующего «Альдечас» к тест-культурам

Тест-культура	Концентрация раствора, %	КОЕ	log	RF
Экспозиция 30 минут				
<i>Escherichia coli</i>	0,2	$2,2 \times 10^2$	2,34	5,09
	контроль	$2,7 \times 10^7$	7,43	
	0,2 + л.с.	$2,2 \times 10^3$	3,34	4,12
	контроль с л.с.	$2,9 \times 10^7$	7,46	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,2	$2,2 \times 10^3$	3,34	4,15
	контроль	$3,1 \times 10^7$	7,49	
	0,2 + л.с.	$2,8 \times 10^3$	3,44	4,05
	контроль с л.с.	$3,1 \times 10^7$	7,49	
<i>Bacillus subtilis</i>	0,2	$3,1 \times 10^3$	3,49	4,10
	контроль	$3,9 \times 10^7$	7,59	
	0,2 + л.с.	$3,2 \times 10^3$	3,51	4,03
	контроль с л.с.	$3,5 \times 10^7$	7,54	
<i>Escherichia coli</i>	0,3	$1,8 \times 10^2$	2,26	5,40
	контроль	$4,6 \times 10^7$	7,66	
	0,3 + л.с.	$1,5 \times 10^2$	2,17	5,17
	контроль с л.с.	$2,2 \times 10^7$	7,34	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,3	$1,8 \times 10^3$	3,26	5,35
	контроль	$4,1 \times 10^8$	8,61	
	0,3 + л.с.	$2,3 \times 10^2$	2,36	5,07
	контроль с л.с.	$2,7 \times 10^7$	7,43	
<i>Bacillus subtilis</i>	0,3	$2,2 \times 10^2$	2,34	4,98
	контроль	$2,1 \times 10^7$	7,32	
	0,3 + л.с.	$2,4 \times 10^2$	2,38	4,89
	контроль с л.с.	$1,9 \times 10^7$	7,27	
Экспозиция 90 минут				
<i>Bacillus subtilis</i>	0,3	$2,7 \times 10^2$	2,43	5,03
	контроль	$2,9 \times 10^7$	7,46	
	0,3 + л.с.	$2,4 \times 10^2$	2,38	4,92
	контроль с л.с.	$2,0 \times 10^7$	7,30	
<i>Bacillus subtilis</i>	0,4	$2,1 \times 10^2$	2,32	5,07
	контроль	$2,5 \times 10^7$	7,39	
	0,4 + л.с.	$2,2 \times 10^2$	2,34	5,04
	контроль с л.с.	$2,4 \times 10^7$	7,38	
Экспозиция 120 минут				
<i>Bacillus subtilis</i>	0,3	$3,2 \times 10^2$	2,51	5,10
	контроль	$4,1 \times 10^7$	7,61	
	0,3 + л.с.	$2,8 \times 10^2$	2,45	5,08
	контроль с л.с.	$3,4 \times 10^7$	7,53	
<i>M. terra</i>	0,5	$2,1 \times 10^2$	2,32	4,79
	контроль	$1,3 \times 10^7$	7,11	
	0,5 + л.с.	$2,2 \times 10^2$	2,34	4,81
	контроль с л.с.	$1,4 \times 10^7$	7,15	
<i>M. terra</i>	1,0	$3,4 \times 10^2$	2,53	5,15
	контроль	$4,8 \times 10^7$	7,68	
	1,0 + л.с.	$2,2 \times 10^2$	2,34	5,06
	контроль с л.с.	$2,5 \times 10^7$	7,40	

Примечание – л.с – лошадиная сыворотка

Результаты испытаний эффективности на инфицированных тест-объектах (дерево, металл, бетон, кафель, резина,

стекло) с белковой нагрузкой и с использованием различных экспозиций представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Эффективность действия рабочих растворов средства «Альдечас» при обеззараживании поверхностей, контаминированных *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*

Тест-объект	Расход, л/м ²	Концентрация, %	Экспозиция, минут				Контроль
			30	60	90*	120*	
Дерево ²	0,35	0,3	о	о	-	-	н/о
Металл ¹	0,35	0,3	о	о	-	-	н/о
Бетон ²	0,35	0,3	о	о	-	-	н/о
Кафель ¹	0,35	0,3	о	о	-	-	н/о
Резина ²	0,35	0,3	о	о	-	-	н/о
Стекло ¹	0,35	0,3	о	о	-	-	н/о
Дерево ²	0,5–0,75*	0,3–0,4*	-	-	о*	о*	н/о
Металл ¹	0,5–0,75*	0,3–0,4*	-	-	о*	о*	н/о
Бетон ²	0,5–0,75*	0,3–0,4*	-	-	о*	о*	н/о
Кафель ¹	0,5–0,75*	0,3–0,4*	-	-	о*	о*	н/о
Резина ²	0,5–0,75*	0,3–0,4*	-	-	о*	о*	н/о
Стекло ¹	0,5–0,75*	0,3–0,4*	-	-	о*	о*	н/о

Примечание: ¹ – гладкие поверхности; ² – шероховатые поверхности; (н/о) – не обеззаражено; (о) – обеззаражено; (-) – не исследовали; (*) – тест-культура *Bacillus subtilis* обеззаражена при данной концентрации и экспозиции

Как видно из таблицы 3, рабочие растворы средства дезинфицирующего «Альдечас» обладают дезинфекционным эффектом в отношении тест-объектов, контаминированных золотистым стафилококком в концентрации 0,3 %, расход средства 0,350 л/м², экспозиция 30 минут, контаминированных *Bacillus subtilis* в концентрации 0,4 %, расход средства 0,750 л/м², экспозиция 90 минут.

На втором этапе определяли качественные показатели продуктов убоя животных, находившихся в опыте по испытанию эффективности средства дезинфицирующего «Альдечас».

При проведении ветеринарно-санитар-

ной экспертизы мяса кроликов, подвергнутых обработке средством дезинфицирующим «Альдечас», установлено, что при внешнем осмотре туш и внутренних паренхиматозных органов как опытных, так и контрольных животных видимых патологических изменений не обнаружено. Тушки хорошо обескровлены, суставные поверхности и сухожилия влажные, плотные, упругие, гладкие. Мышцы на разрезе слегка влажные, нелипкие; после надавливания на мясо ямка быстро выравнивалась, что свидетельствовало об его упругой консистенции. Запах поверхностного слоя туш опытной и контрольной групп специфический для данного вида животных (кро-

лики), характерный для свежего мяса, цвет мяса бледно-розовый. При микроскопии мазков-отпечатков с поверхности мяса в поле зрения палочковидных и кокковых форм микроорганизмов не обнаружено, следов распада мышечной ткани не выявлено.

В таблице 4 представлены данные по качественным показателям мяса кроликов.

Как видно из таблицы, достоверных различий в физико-химических показателях мяса обеих групп не установлено. Концентрация водородных ионов находилась в допустимых пределах для созревшего свежего мяса, что способствовало его хорошему санитарному состоянию.

Таблица 4. – Активность и жизнеспособность имаго мух

Показатель	Срок хранения при 2 °С, ч	Группа	
		контрольная	опытная
Реакция среды, рН единиц	24	5,98±0,01	5,86±0,02
Реакция с р-ром CuSO ₄	24	3-	3-
Реакция на аммиак	24	3-	3-
ЛЖК, мг КОН	24	2,21±0,02	2,14±0,04
ААА, мг КОН	24	0,95±0,02	0,89±0,07

Примечание: (-) – реакция отрицательная; ЛЖК – летучие жирные кислоты; ААА – аминокислотный азот

При изучении безвредности образцов мяса кроликов подопытных групп на тест-организмах инфузориях Тетрахимена пириформис отклонений в морфологической структуре, характере движения, росте

и развитии простейших не наблюдалось, что говорит о безвредности изучаемого продукта.

Относительная биологическая ценность мяса кроликов отражена в таблице 5.

Таблица 5. – Относительная биологическая ценность мяса, печени и почек кроликов, находившихся в опыте с использованием средства дезинфицирующего «Альдечас»

Группа	Мясо		Печень		Почки	
	количество клеток	%	количество клеток	%	количество клеток	%
Опытная	211	100,9	489	101,6	480	101,6
Контрольная	209	100,0	481	100,0	472	100,0

ВЫВОДЫ

1. Согласно «Методическим указаниям по контролю качества дезинфекции и санитарной обработки объектов, подлежащих ветеринарно-санитарному надзору» (Минск, 2007), средство дезинфициру-

ющее «Альдечас» оказывает воздействие на 1-ю, 2-ю и 3-ю группу микроорганизмов по устойчивости к дезинфектантам.

2. По физико-химическим и бактериологическим показателям мясо кроликов, находившихся в опыте по обработке в

присутствии животных средством дезинфицирующим «Альдечас», соответствующему доброкачественному продукту.

3. Продукты убоя животных, находившихся в опыте по использованию средства дезинфицирующего «Альдечас», были безвредными для тест-организмов инфузорий Тетрахимена пириформис. Отклонений в морфологической структуре, харак-

тере движения, росте и развитии простейших не наблюдалось.

4. Относительная биологическая ценность мяса, печени и почек образцов опытных групп находилась в пределах показателей контрольной группы образцов и, соответственно, составляла 100,9, 101,6 и 101,6 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ветеринарно-санитарные правила осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизе мяса и мясных продуктов : постановление МСХиП Республики Беларусь, 18.04.2008, № 44. – 153 с.

2. Мясо кроликов. Методы отбора образцов. Органолептические методы определения свежести : ГОСТ 20235.0–74. – Введ. 01.01.75. – М. : Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации : Изд-во стандартов, 1986. – 5 с.

3. Мясо кроликов. Методы химического и микроскопического анализа свежести мяса : ГОСТ 20235.1–74. – Введ. 01.01.75. – М. : Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации : Изд-во стандартов, 1986. – 4 с.

4. Мясо кроликов. Методы бактериологического анализа : ГОСТ 20235.2–74. – Введ. 01.01.75. – М. : Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации : Изд-во стандартов, 1986. – 8 с.

5. Методы испытания противомикробной активности дезинфицирующих средств : временная инструкция, утв. М-вом здравоохранения Республики Беларусь, 24.12.98 г., рег. № 4718. – Минск : БелНИИЭМ, 1998. – 8 с.

6. Нормативные показатели безопасности эффективности дезинфекционных средств : СанПиН 21-112-99. – Минск, 1999.



САПОФОР

ветеринарный препарат



- ▶ ИММУНОСТИМУЛЯТОР;
- ▶ ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ КОРОВ, БОЛЬНЫХ СУБКЛИНИЧЕСКИМ МАСТИТОМ;
- ▶ КОМПЛЕКСНАЯ ТЕРАПИЯ И ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ТЕЛЯТ И ПОРОСЯТ

www.BIEVM.BY

