

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:

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

Лысенко А.П. – доктор ветеринарных наук, профессор

Кучинский М.П. – доктор ветеринарных наук, профессор

Борисовец Д.С. – кандидат ветеринарных наук, доцент

Кузьминский И.И. – кандидат ветеринарных наук, доцент

НАД НОМЕРОМ РАБОТАЛИ:

Ларькова А.Е.

Лукьянова И.А.

Пунько С.Г.

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ

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

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

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

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**

Андруевич А.С., Красникова Е.Л., Мистейко М.М., Стрельчяна И.И., Струк М.С., Григорян В.Е. БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУЗЕЙНОГО ШТАММА *HAEMOPHILUS PARASUIS* 3

Дубаневич О.В., Тяпша Ю.И. ВЫЯВЛЕНИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ (ПО РЕГИОНУ 5'-UTR) ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРС, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ 7

Згировская А.А., Тяпша Ю.И., Дубаневич О.В., Зуйкевич Т.А., Костюк Н.И., Герасименко В.И. ВЫДЕЛЕНИЕ РОТАВИРУСА ОТ БОЛЬНОГО ТЕЛЕНКА И ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ЕГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ 12

Лысенко А.П., Кучвальский М.В., Высоцкий А.Э., Прытыченко А.Н., Красникова Е.Л., Якобсон Е.И. ТРАНСПЛАЦЕНТАРНАЯ ПЕРЕДАЧА ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У КОРОВ, ЗАРАЖЕННЫХ *MYCOBACTERIUM BOVIS* 18

ИММУНОБИОЛОГИЯ

Насонов И.В., Радюш И.С., Кныш Н.В., Захарик Н.В., Романовская Н.Б. ГИПЕРИММУНИЗАЦИЯ КУР ЯЙЦЕНОСНЫХ ПОРОД ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ К *ESCHERICHIA COLI* ЖЕЛТОЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ 26

Борисовец Д.С., Зуйкевич Т.А., Згировская А.А., Красочко П.А., Осипенко А.Е. ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСОВАРИАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ СОЗДАНИИ НОВЫХ ВЕТЕРИНАРНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ 31

Лысенко А.П., Кучвальский М.В., Красникова Е.Л., Якобсон Е.И. ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ ЛИМФОСАРКОМЫ С ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ 40

Журавлёва Е.С., Бохан С.А., Азаров С.М., Дробыш А.А. ПОРИСТЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ БАЗАЛЬТОВОГО ВОЛОКНА В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ СУБСТРАТ-ЗАВИСИМОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК 54

ФАРМАКОЛОГИЯ

Жешко Н.В. ИЗУЧЕНИЕ ЭМБРИОТОКСИЧЕСКОГО И ТЕРАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ, РАЗДРАЖАЮЩИХ И АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ, СТАБИЛЬНОСТИ ПРИ ХРАНЕНИИ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА «МАСТИН» 59

Радивил А.Н. ВЛИЯНИЕ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОБИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ОВЕЦ 64

Кучинский М.П., Сонов А.А., Кучинская Г.М., Макаревич В.К. ЛЕЧЕБНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА «АКТИВЕТ МАКСИ» ПРИ АРТРИТАХ У СОБАК 71

САНИТАРИЯ

Шамонина А.И., Шамонина А.И. НОРМЫ ВНЕСЕНИЯ СОЛОМЕННОЙ ПОДСТИЛКИ В СЕКЦИИ ДЛЯ СОДЕРЖАНИЯ СУХОСТОЙНЫХ ЖИВОТНЫХ 79

CONTENTS**EPIZOOTOLOGY**

Andrusevich A.S., Krasnikova E.L., Misteyko M.M., Strelchenya I.I., Struk M.S., Hryharan V.E. BIOCHEMICAL PROPERTIES OF THE MUSEUM STRAIN *HAEMOPHILUS PARASUIS*

Dubanevich O.V., Tyapsha Yu.I. DETECTION AND GENETIC TYPING (BY REGION 5'-UTR) OF ISOLATES OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS CIRCULATING IN THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF BELARUS

Zgirovskaya A.A., Tyapsha Yu.I., Dubanevich O.V., Zuykevich T.A., Kostyuk N.I., Gerasimenko V.I. ISOLATION OF ROTAVIRUS FROM A SICK CALF AND OPTIMIZATION OF ITS CULTIVATION PARAMETERS

Lysenko A.P., Kuchvalsky M.V., Vysotsky A.E., Pritychenko A.N., Krasnikova E.L., Yakobson E.I. TRANSPLACENTAL TRANSMISSION OF TUBERCULOSIS INFECTION IN COWS INFECTED WITH *MYCOBACTERIUM BOVIS*

IMMUNOBIOLOGY

Nasonov I.V., Radyush I.S., Knysh N.V., Zakharik N.V., Romanovskaya N.B. HYPERIMMUNIZATION OF CHICKENS EGG BREEDS FOR OBTAINING YOLK IMMUNOGLOBULINS SPECIFIC TO *ESCHERICHIA COLI*

Borisovets D.S., Zuykevich T.A., Zgirovskaya A.A., Krasochko P.A., Osipenko A.E. OBTAINING TRANSOVARIAN IMMUNOGLOBULINS WHEN CREATING NEW VETERINARY BIOLOGICAL PRODUCTS

Lysenko A.P., Kuchvalsky M.V., Krasnikova E.L., Jacobson E.I. INVESTIGATION OF THE CONNECTION OF LYMPHOSARCOMA WITH LATENT TUBERCULOSIS INFECTION

Zhuravleva E.S., Bohan S.A., Azarov S.M., Drobysch A.A. POROUS MATERIALS BASED ON BASALT FIBER AS CARRIERS FOR SUBSTRATE-DEPENDENT CELL CULTURE

FARMACOLOGY

Zheshko N.V. THE VETERINARY DRUG «MASTIN» HAS EMBRYOTOXIC AND TERATOGENIC EFFECTS, IRRITATING AND ALLERGENIC PROPERTIES, STABILITY ARE DETERMINED

Radzivil A.N. INFLUENCE OF A NEW COMPLEX PREPARATION ON IMMUNOBIOCHEMICAL INDICATORS OF SHEEP

Kuchinsky M.P., Sonov A.A., Kuchinskaya G.M., Makarevich V.K. THERAPEUTIC EFFICIENCY OF VETERINARY DRUG «ACTIVET MAXI» FOR ARTHRITIS IN DOG

SANITATION

Shamonina A.I., Shamonina A.I. NORMS FOR APPLICATION OF STRAW BEDDING IN SECTIONS FOR KEEPING DRY ANIMALS

Компьютерная верстка: ЛУКЪЯНОВА И.А.

Подписано в печать 06.12.2021 г.

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

Уч.-изд. л. , усл. печ. л. 11,0 Тираж 100 экз. Заказ №

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

Республиканское унитарное предприятие «Информационно-вычислительный центр
Министерства финансов Республики Беларусь».

Свидетельства о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/161 от 27.01.2014, № 2/41 от 29.01.2014. Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.

УДК 619:579.843.95

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-3-6>

Андруевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент

Красникова Е.Л., научный сотрудник

Мистейко М.М., кандидат ветеринарных наук, доцент

Стрельчя И.И., кандидат ветеринарных наук, доцент

Струк М.С., старший научный сотрудник

Григорян В.Е., биолог

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

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУЗЕЙНОГО ШТАММА *HAEMOPHILUS PARASUIS*

Резюме

В статье приведены данные по биохимическим свойствам музейного штамма *Haemophilus parasuis*. Принадлежность штамма *Haemophilus parasuis* подтверждена в полимеразной цепной реакции с помощью разработанной РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» тест-системы для обнаружения генома *Haemophilus parasuis*.

Ключевые слова: *Haemophilus parasuis*, штаммы, биохимические свойства, полимеразная цепная реакция.

Summary

The article provides data on the biochemical properties of museum strains of *Haemophilus parasuis*. The belonging of the strains of *Haemophilus parasuis* was confirmed in the polymerase chain reaction using the developed RUE «Institute of Experimental Veterinary Medicine named after S.N. Vyshellesskiy» test system for detecting the genome of *Haemophilus parasuis*.

Keywords: *Haemophilus parasuis*, strains, biochemical properties, polymerase chain reaction.

Поступила в редакцию 03.12.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Гемофилезный полисерозит (болезнь Глессера) – инфекционная септическая болезнь поросят отъемного возраста, характеризующаяся преимущественным серозно-фибринозным воспалением перикарда, плевры, брюшины, суставов и негнойным менингоэнцефалитом.

По антигенной структуре различают 4 серологические группы: А, В, С, Д, которые включают 15 серовариантов возбудителя. Наиболее патогенными являются 2, 4, 5, 12, 13, 14 сероварианты [1, 2].

Определение видовой принадлежности штаммов, а также подтверждение их аутентичности (установление подлинности по свойствам, заявленным в паспорте на момент поступления) в процессе воспроизводства с учетом требований современной

систематики бактерий является одним из важных направлений деятельности специалистов, формирующих коллекции микроорганизмов [3].

Традиционно установление таксономической принадлежности микроорганизмов основывается на изучении их морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных, антигенных и генетических свойств. Ключевым тестом при определении аутентичности является изучение биохимической активности патогена с использованием комбинированных (комплексных) сред Клиглера, Олькеницкого, Ресселя, Кларка, Гисса и коммерческих тест-систем: систем индикаторных бумажных СИБ (Нижний Новгород), АПИ стрипов API® («Bio-Mérieux», Франция) и др. [4, 5]. Это не всегда позволяет окон-

чательно идентифицировать некоторые бактерии до вида, что является необходимым при включении их штаммов в коллекционный фонд. Нередки случаи, когда бактерия, идентифицированная по фенотипическим свойствам как определенный вид, оказывается при более детальном изучении иной видовой принадлежности [6].

Контроль соответствия паспортным данным особенно необходим при консервации и воспроизводстве референтных штаммов, используемых в производственной, диагностической и образовательной деятельности, свойства которых недостаточно изучены, т.к. выделение и описание их осуществлялось в различное время, большей частью в середине XX века, когда сведения о фенотипических свойствах носили фрагментарный характер [7].

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

Наиболее полно отвечает требованиям метод выявления ДНК возбудителя, основанный на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР). С помощью ПЦР удается обнаружить крайне малое количество гемофилов, идентифицировать их на видовом и серогрупповом уровнях и подтвердить принадлежность какого-либо штамма определенному сероварианту.

Цель работы – изучение биохимических свойств музейного штамма *Haemophilus parasuis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали суточную культуру музейного штамма *Haemophilus parasuis* (КМИЕВ-В171) – штамма-антигена коллекции РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского», выращенную на сердечно-мозговом бульоне с добавлением никотинамиддинуклеотида (НАД) («Sigma», США).

Восстановление бактериологической культуры из лиофильной сушки проводили

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

Для изучения биохимических свойств музейного штамма *Haemophilus parasuis* суточную бульонную культуру пересеивали на сердечно-мозговой агар (Brain Heart Infusion Agar, «Biolab», Венгрия) с добавлением НАД и культивировали в чашках Петри диаметром 90 мм («Бион», г. Минск) в термостате при температуре 37 °С в течение 18–24 часов.

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

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

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

Выделение ДНК проводили колоночным методом набором «ДНК-ВК» (ИБОХ, г. Минск). Концентрацию ДНК измеряли прибором Nanodrop. Для обнаружения генома *Haemophilus parasuis* использовали смеси, содержащие специфические праймеры к участку генома 16S *Haemophilus parasuis*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные данные прибора Vitek 2 compact по биохимическим свойствам музейного штамма *Haemophilus parasuis* внесены в таблицу для проведения сравнительного анализа.

Таблица. – Биохимические свойства музейного штамма *Haemophilus parasuis*

№ п/п	Тест	Сокращение	КМИЭВ-В171
1	Ala-Phe-Pro-ариламидаза	APPA	-
2	Адонитол	ADO	+
3	L-пирролидонариламидаза	PyrA	-
4	L-арабит	IARL	-
5	D-целлобиоза	dCEL	+
6	Бета-галактозидаза	BGAL	+
7	Продукция H ₂ S	H ₂ S	-
8	Бета-N-ацетилглюкозаминидаза	BNAG	-
9	Глютаминариламидаза рNA	AGLTp	-
10	D-глюкоза	dGLU	+
11	Гамма-глутамилтрансфераза	GGT	-
12	Сбраживание глюкозы	OFF	-
13	Бета-глюкозидаза	BGLU	-
14	D-мальтоза	dMAL	+
15	D-маннит	dMAN	+
16	D-манноза	dMNE	+
17	Бета-ксилозидаза	BXYL	-
18	Бета-аланинариламидаза рNA	BAlap	-
19	L-пролинариламидаза	ProA	-
20	Липаза	LIP	-
21	Палатиноза	PLE	-
22	Тирозинариламидаза	TyrA	-
23	Уреаза	URE	+
24	D-сорбит	dSOR	-
25	Сахароза	SAC	+
26	D-тагатоза	dTAG	+
27	D-трегалоза	dTRE	-
28	Цитрат (натрия)	CIT	-
29	Малонат	MNT	-
30	5-кето-D-глюконат	5KG	-
31	L-лактат, подщелачивание	ILATk	-
32	Альфа-глюкозидаза	AGLU	-
33	Сукцинат, подщелачивание	SUCT	-
34	Бета-N-ацетилгалактозаминидаза	NAGA	-
35	Альфа-галактозидаза	AGAL	-
36	Фосфатаза	PHOS	+
37	Глицинариламидаза	GlyA	-
38	Орнитиндекарбоксилаза	ODC	-
39	Лизиндекарбоксилаза	LDC	-
40	L-гистидин, ассимиляция	IHISa	-
41	Кумарат	CMT	-
42	Бета-глюкуронидаза	BGUR	-
43	Устойчивость к O/129 (вибриостат, агент)	O129R	-
44	Glu-Gly-Arg-ариламидаза	GGAA	-
45	L-малат, ассимиляция	IMLTa	-
46	Эллман	ELLM	+
47	L-лактат, ассимиляция	ILATa	-

Исходя из полученных данных было установлено, что музейный штамм *Haemophilus parasuis* (КМИЕВ-В171) – штамм-антиген сбраживает адонитол, D-целлобиозу, сахарозу, расщепляет бета-галактозидазу, D-глюкозу, D-мальтозу, D-маннит, D-маннозу, D-тагатозу, фосфатазу, продуцирует уреазу, положительно реагирует с реактивом Элмана.

В связи с необходимостью подтверждения принадлежности штамма *Haemophilus parasuis*, использованного в исследованиях, была проведена ПЦР.

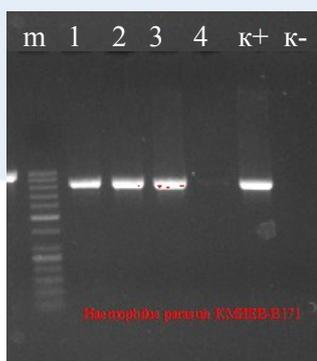
Аmplификацию ДНК проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей

2 мкл выделенной ДНК, 10 mM дНТП, 0,2 мкМ каждого праймера, 3 mM хлорида магния и 1 ЕД Таg-полимеразы (ОДО «Праймтех», Минск).

Параметры амплификации были следующими:

- | | |
|-------------------|-------------|
| 1. 95 °С – 5 мин | } 30 циклов |
| 2. 95 °С – 60 с | |
| 3. 60 °С – 60 с | |
| 4. 72 °С – 60 с | |
| 5. 72 °С – 7 мин. | |

Электрофоретическую детекцию проводили в 2%-ном агарозном геле (рисунок).



- m – маркер молекулярного веса;
1–4 – штамм *Haemophilus parasuis* КМИЕВ-В171;
k+ – положительный контроль;
k- – отрицательный контроль

Рисунок. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации выделенной ДНК из музейного штамма *Haemophilus parasuis*

В результате проведения ПЦР установлено, что штамм *Haemophilus parasuis* КМИЕВ-В171 содержит геном *Haemophilus parasuis*.

ВЫВОДЫ

1. Проведены биохимические исследования музейного штамма *Haemophilus parasuis* на приборе Vitek 2 compact и под-

тверждена его принадлежность с помощью тест-системы методом ПЦР.

2. Штамм *Haemophilus parasuis* (КМИЕВ-В171) – штамм-антиген сбраживает адонитол, D-целлобиозу, сахарозу, расщепляет бета-галактозидазу, D-глюкозу, D-мальтозу, D-маннит, D-маннозу, D-тагатозу, фосфатазу, продуцирует уреазу, положительно реагирует с реактивом Элмана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сидоров, М. А. Гемофилезы животных / М. А. Сидоров, Д. И. Скородумов. – М. : Агропромизат, 1986. – 130 с.
2. Сидоров, М. А. Специфическая профилактика гемофилезной плевропневмонии свиней / М. А. Сидоров // Ветеринарные проблемы пром. свиноводства. – 1983. – № 4. – С. 102–106.
3. Smith, D. Culture Collections / D. Smith // Microbiology. – 2012. 79:73–118. – DOI: 10.1016 / B978-0-12-394318-7.00004-8.
4. Биргер, М. О. Справочник по микробиологическим и ви-русологическим методам исследования / М. О. Биргер. – М. : Медицина, 1982. – 464 с.
5. Лабинская, А. С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская, Л. П. Блинкова, А. С. Ещина. – М. : Медицина, 2004. – 576 с.
6. Леванова, Г. Ф. Фенотаксономия и геносистематика локтобацилл / Г. Ф. Леванова, Е. И. Ефимов. – Н. Новгород : изд. Ю.А. Николаев, 2009. – 248 с.
7. Белова, Л. Н. Биологические коллекции российской Федерации / Л. Н. Белова, В. Н. Мошенцева // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2013. – Т. 5. – С. 8–10.

УДК 619:578.833.3:578.2(476)

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-7-11>

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

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

ВЫЯВЛЕНИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ (ПО РЕГИОНУ 5'-UTR) ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРС, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Резюме

Вирус вирусной диареи крупного рогатого скота (BVDV) вызывает значительные экономические потери. BVDV имеет высокое геномное разнообразие: два генотипа вируса вирусной диареи, где двадцать один субгенотип у BVDV-1 и четыре субгенотипа у BVDV-2. Вакцины – важный инструмент для уменьшения экономических потерь, вызванных этим вирусом. Однако штаммы вакцины должны соответствовать антигенному профилю вирусов, циркулирующих в регионе, где применяется вакцина. Филогенетическое исследование 13 изолятов вируса, циркулирующих на территории Республики Беларусь, показало, что генетический профиль BVDV состоял в преобладающем большинстве из субтипов BVDV-1f (76,9 %) и BVDV-1a (15,0 %) генотипа 1, в одном хозяйстве обнаружен субтип BVDV-2a генотипа 2.

Ключевые слова: вирус, филогенетический анализ, вирусная диарея крупного рогатого скота, секвенирование.

Summary

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) causes serious economic losses. BVDV has high genomic diversity: two viral diarrhoea virus genotypes, with twenty-one subgenotypes for BVDV-1 and four subgenotypes for BVDV-2. Vaccines are important tools for reducing the economic losses caused by this virus. However, the strains of the vaccine match the antigenic profile of the viruses circulating in the area where the vaccine is. A phylogenetic study of 13 virus isolates circulating in the territory of the Republic of Belarus showed that the genetic profile of BVDV consisted in the overwhelming majority of subtypes BVDV-1f (76.9 %) and BVDV-1a (15.0 %), genotype 1, in one farm the subtype was found BVDV-2a genotype 2.

Keywords: virus, phylogenetic analysis, viral diarrhoea in cattle, sequencing.

Поступила в редакцию 10.11.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусная диарея крупного рогатого скота – контагиозная болезнь, которая наблюдается у всех возрастных групп во всем мире [1] и носит, как правило, стационарный характер с заболеваемостью 10–100 % животных, гибелью 10–90 % заболевших в неблагополучном очаге и абортами до 78,6 % [2, 3].

Важным фактором заболеваемости и гибели животных являются персистентно инфицированные (ПИ) животные, составляющие от 1 до 2 % от общей численности крупного рогатого скота [4]. Получение персистентно инфицированных телят происходит при заражении плода на 80–125-м дне стельности, если это не приводит к гибели плода. Такие телята являются имму-

нотолерантными, пожизненными носителями и выделителями вируса [4]. Плоды, заражённые после 125 дней стельности, как правило, образуют вируснейтрализующие антитела и освобождаются от вируса [5].

BVDV КРС поражает преимущественно молодых животных и характеризуется эрозивно-язвенным воспалением слизистых оболочек пищеварительного тракта, постоянной или перемежающейся диареей, увеличением лимфоузлов, лихорадкой, лейкопенией. Часто болезнь протекает в виде респираторного синдрома, эрозивно-язвенного стоматита с обильным слюноотделением и хромотой. У коров чаще наблюдается латентная форма, которая может приводить к острой инфекции плодов, вы-

зывая их гибель, рассасывание и мумификацию, могут наблюдаться аборт на любой стадии беременности [1]. В настоящее время вирусная диарея КРС является эндемическим заболеванием во всех странах, в которых не было систематического контроля ее распространения [6]. В странах, где отсутствует систематический контроль, у половины стад есть ПИ животные, и до 90 % всего крупного рогатого скота подвергалось воздействию BVDV в течение жизни [7]. Болезнь регистрируется в странах Северной Америки, Европы, Ближнего Востока, ЮАР, СНГ.

Ряд стран, в том числе Швеция, Норвегия, Дания и Финляндия, ликвидировали вирусную диарею КРС или близки к тому, чтобы быть благополучными по данному заболеванию [8]. Например, в Германии, где программа искоренения заболевания была начата в 2011 году, количество ферм с ПИ животными снизилось за 5 лет более чем в 20 раз: с 3,44 до 0,16 % [8]. С каждым годом увеличивается количество стран, руководствующихся стратегией по ликвидации вирусной диареи КРС, что указывает на то, что борьба с BVDV приобретает международный уровень. Однако ликвидация все еще находится на ранних стадиях, учитывая, что ряд стран не реализовывали программы по оздоровлению стад [6].

Основопологающим аспектом программ контроля и ликвидации BVDV является диагностическое тестирование. Диагностические этапы включают тесты для выявления и удаления отдельных ПИ животных из BVDV-инфицированных стад, а затем регулярный мониторинг, подтверждающий текущий отрицательный статус BVDV [9]. В дополнение к диагностическому тестированию меры биобезопасности должны быть направлены на избежание заражения стад без BVDV, что является фундаментальной частью любой программы ликвидации вирусной диареи КРС [10, 11]. Движение зараженных животных играет решающую роль в распространении болезней [6], а перемещение ПИ животных является одним из ведущих способов распространения BVDV [12].

В странах, где отсутствуют подобные программы искоренения BVDV, применяется вакцинация [9].

Программа вакцинации включает следующие критерии:

- безопасность вакцины и уровни защиты, которые она обеспечивает;
- разнообразие антигенов и штаммов с учетом штаммов BVDV, присутствующих в регионе;
- постоянное наблюдение для выявления и характеристики возникающих полевых штаммов BVDV для правильного корректирования вакцин;
- время вакцинации в соответствии с технологическими особенностями на комплексах, направленное на снижение рождаемости ПИ телят [13, 14].

Особое значение при вакцинопрофилактике имеет соответствие субтипов BVDV, содержащихся в вакцине, подтипам штаммов, циркулирующих в регионе. За 2004–2007 гг. учеными были проведены исследования по изучению генетических различий BVDV. Так, в Чехии встречаются четыре подтипа (BVDV-1b, BVDV-1d, BVDV-1e и BVDV-1f) с преобладающими подтипами BVDV-1b и BVDV-1d, в Польше – также четыре подтипа (BVDV-1b, BVDV-1d, BVDV-1f, BVDV-1g (3,0 %) с преобладанием подтипов BVDV-1b и BVDV-1d, в Австрии – восемь подтипов (BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-1d, BVDV-1e, BVDV-1f, BVDV-1g, BVDV-1h и BVDV-1k) с преобладанием подтипов BVDV-1h и BVDV-1f, в Германии – пять подтипов (BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-1d, BVDV-1f и BVDV-1g) с преобладанием подтипов BVDV-1b и BVDV-1d, в Словакии – подтипы BVDV-1d, BVDV-1f и BVDV-1g [10, 15]. Генотип BVDV-2 на территории Европы выявляется редко, хотя BVDV-2a – это наиболее распространенный субгенотип BVDV-2 на всех континентах.

Дамман и другие ученые (2015 г.) в своих исследованиях установили, что вакцинация коров перед осеменением с учетом циркулирующих субтипов в регионе уменьшает распространение BVDV за счет

уменьшения количества родившихся ПИ телят. При этом выбор подходящего генотипа и субтипа BVDV является ключевым при вакцинации. Многие ученые утверждают, что эффективной гетерологичной защиты при вакцинации нет. Количество вируснейтрализующих антител может быть в несколько раз ниже к гетерологичным субтипам [14]. Например, были проведены исследования с использованием живой вакцины Бови Шилд, имеющей в своем составе штамм *Nadl*, принадлежащий к субтипу 1a. Вакцинированные животные имели титр вируснейтрализующих антител 189,4 к штамму 1a и 55,6 – к штамму 1b. При этом было доказано, что титр вируснейтрализующих антител 180 и выше предотвращал внутриутробное заражение и, соответственно, рождение персистентно инфицированных телят [16].

Поэтому целью нашей работы было выявить и определить, какие доминантные субтипы BVDV циркулируют на территории Республики Беларусь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На наличие генома BVDV исследовали пробы биоматериала (фекалии, носовую и влагалищную слизь), патологический материал от крупного рогатого скота. Биоматериал для исследования отбирался из животноводческих хозяйств всех областей Республики Беларусь. Экспериментальная часть работы выполнена в условиях научно-исследовательской лаборатории отдела молекулярной биологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Для детекции изолятов вируса вирусной диареи КРС применяли молекулярно-биологический метод исследования ПЦР. При этом использовали следующее оборудование и материалы:

а) приборы и расходные материалы: ламинар, бытовой холодильник, термостат, микротермостат «BIOSAN-CH100» (Латвия), амплификатор «С 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США), паровые автоклавы, микроцентрифуга высокоскоростная

(14000 об/мин) Jouan (Франция), комплект автоматических пипеток «SOCOREX» (Швейцария) 0,1–2,0 мкл, 0,5–10,0 мкл, 20,0–200,0 мкл, 100,0–1000,0 мкл, 1–10 мл и наконечники к ним (с фильтрами и без фильтров), пробирки типа «эппендорф» вместимостью 0,5 и 1,5 мл, вортекс «BIOSAN» (Латвия), пробирки для ПЦР 0,2 мл для прибора «С 1000 Thermal Cycler», система для электрофореза «Consort» (Бельгия), Gel Doc XR и программа imageLab Software, BIO-RAD (США), весы RADWAG AS 220/X (Польша).

б) реактивы: тест-система для детекции генома вируса вирусной диареи КРС, разработанная в отделе молекулярной биологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», маркер молекулярного веса «GeneRuler 50 bp Ladder» («Fermentas», Литва), агароза («Helicon», Россия), бромистый этидий («SIGMA», США), буфер для нанесения проб.

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

Обратную транскрипцию и амплификацию проводили согласно инструкции по применению тест-системы с электрофоретической детекцией.

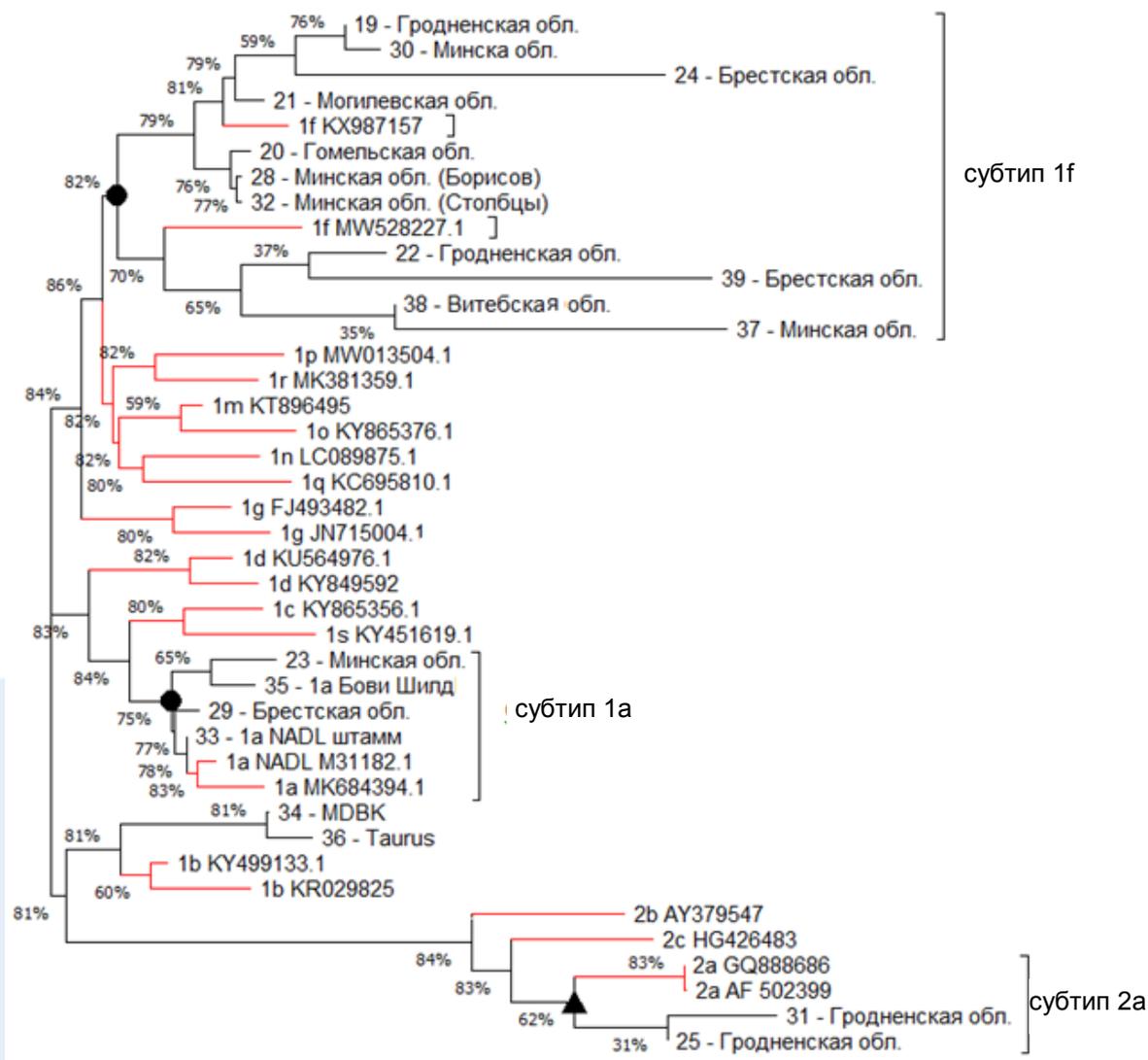
Из образцов с наиболее высокими концентрациями вируса, которые, как правило, более патогенные, делали подготовку проб для дальнейшего молекулярно-генетического анализа методом секвенирования по Сенгеру, которое проводилось в ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ.

Полученные в результате секвенирования последовательности участка генома 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) изолятов вируса BVDV анализировали с помощью программы Sequence Scanner v 1.0. Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA-X, используя референтные штаммы различных субтипов BVDV из базы данных National Center for Biotechnology Information (NCBI).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На наличие генома BVDV исследована 371 проба биологического материала от КРС с признаками пневмоэнтеритов и патологией размножения из 60 хозяйств Республики Беларусь. При этом инфицированность хозяйств составила 60 %, заболеваемость – 34 %. Образцы с наиболее высокими концентрациями вируса секвенировали. В результате филогенетического ана-

лиза установили, что в республике циркулируют субтипы генотипа 1: BVDV-1f – 76,9 % (Островецкий, Речицкий, Кировский, Мостовский, Барановичский, Столбцовский, Смолевичский, Борисовский, Полоцкий районы) и BVDV-1a – 15,0 % (Жодинский, Пружанский районы), в одном хозяйстве обнаружен субтип генотипа 2 – BVDV-2a (Ивьевский район) (рисунок).



- – кластер (подгруппа) изолятов BVDV субтипов BVDV-1f и BVDV-1a (генотип 1);
- ▲ – кластер (подгруппа) изолятов BVDV, субтип BVDV-2a (генотип 2);
- — — — — референтные штаммы BVDV (GenBank, NCBI)

Рисунок. – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе результатов анализа участка 5’-UTR генома изолятов BVDV, обнаруженных на комплексах КРС республики

Установление субтипов вируса вирусной диареи КРС, циркулирующих на территории Республики Беларусь, имеет важное значение при использовании вакцин и для разработки успешных программ борьбы с болезнью.

ВЫВОДЫ

Инфицированность хозяйств BVDV составила 60 %, заболеваемость – 34 %.

Персистентно инфицированные телята являются главной причиной длительной циркуляции BVDV в стаде, которой следу-

ет уделять ключевое значение при планировании методов борьбы с данной инфекцией.

Установлено, что в Республике Беларусь циркулируют три субтипа вируса вирусной диареи КРС: BVDV-1f, BVDV-1a и BVDV-2a.

Для предотвращения проникновения BVDV через трансплацентарный барьер целесообразно использовать вакцины, содержащие штаммы субтипов, которые гомологичны циркулирующим на данной территории.

ЛИТЕРАТУРА

1. OIE – World Organisation for Animal Health. Bovine Viral Diarrhoea. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2017. Available at [Electronic resource]. – Mode of access : <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> (Accessed 1 November 2017). – Date of access : 09.11.2021.
2. Fertility of cows challenged with a cytopathic strain of Bovine Viral Diarrhea virus during an outbreak of spontaneous infection with a noncytopathic strain / P. Virakul [et al.] // *Theriogenology*. – 1988. – Feb. 29(2). – P. 441–449.
3. Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus in 20 dairy herds in two counties in central Michigan and comparison of prevalence of antibody-positive cattle among herds with different infection and vaccination status / H. Houe [et al.] // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 1995. – № 7. – P. 321–326.
4. Fulton, R. W. Prevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States / R. W. Fulton [et al.] // *Can J Vet Res*. – 2009. – Vol. 73. – № 4. – P. 283–291.
5. Верховская, А. Е. Особенности диагностики и профилактики вирусной диареи крупного рогатого скота / А. Е. Верховская, В. А. Сергеев, Т. И. Алупер // *Ветеринария*. – 2009. – № 8. – С. 3–7.
6. Moennig, V. Pestivirus control programs: how far have we come and where are we going? / V. Moennig, P. Becher // *Animal Health Research Reviews*. – 2015. – № 16. – P. 83–87.
7. Position paper: epidemiology and risks. EU Thematic Network on BVDV control. Available at [Electronic resource] / A. Lindberg [et al.] – Mode of access: <https://www.afbini.gov.uk/articles/final-report-bvdvcontrol-europe> (Accessed 30 December 2017). – Date of access: 09.11.2021.
8. Six years (2011–2016) of mandatory nationwide Bovine Viral Diarrhea Control in Germany – a success story / K. Wernike [et al.] // *Pathogens (Basel, Switzerland)*. – 2017. – № 6. – P. 50.
9. Houe, H. Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe / H. Houe, A. Lindberg, V. Moennig // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 2006. – № 18. – P. 427–436.
10. Kuta, M. P. Predominance of bovine viral diarrhea virus 1b and 1d subtypes during eight years of survey in Poland / M. P. Kuta, M. Polak, J. F. Larska // *Veterinary Microbiology*. – 2013. – Vol. 166. – № 25. – P. 639–644.
11. Modeling the spread of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in a beef cattle herd and its impact on herd productivity / A. Damman [et al.] // *Veterinary Research*. – 2015. – № 46. – P. 12.
12. Tinsley, M. Network modeling of BVD transmission / M. Tinsley, F. I. Lewis, F. Brülisauer // *Veterinary Research*. – 2012. – № 43. – P. 11.
13. Odeón, A. C. Control del virus de la Diarrea Viral Bovina / A. C. Odeón // *Grupo de Sanidad Animal de la EEA Balcarce. INTA*. – 2016.
14. Newcomer, B. W. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus / B. W. Newcomer, M. F. Chamorro, P. H. Walz // *Veterinary Microbiology*. – 2017. – № 206. – P. 78–83.
15. Robesova, B. Genotyping of bovine viral diarrhoea virus isolates from the Czech Republic / B. Robesova, K. Kovarcik, S. Vilcek // *Veterinarni Medicina*. – 2009. – Vol. 54. – № 9. – P. 393.
16. Immune response to bovine viral diarrhea virus (BVDV) vaccines detecting antibodies to BVDV subtypes 1a, 1b, 2a and 2c / W Robert Fulton [et al.] // *Vaccine*. – 2020. – Vol. 38. – № 24. – P. 4032–4037.

Згировская А.А., кандидат биологических наук

Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук, доцент

Дубаневич О.В., старший научный сотрудник

Зуйкевич Т.А., кандидат сельскохозяйственных наук

Костюк Н.И., кандидат ветеринарных наук

Герасименко В.И., ведущий технолог

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

ВЫДЕЛЕНИЕ РОТАВИРУСА ОТ БОЛЬНОГО ТЕЛЕНКА И ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ЕГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Резюме

Статья посвящена выделению ротавируса от больного теленка и оптимизации параметров его культивирования в перевиваемых линиях гомологичных и гетерологичных культур клеток. Выделен изолят ротавируса в культуре клеток MDBK из фекалий больного теленка, что подтверждено в полимеразной цепной реакции и реакции нейтрализации. Отработан способ культивирования выделенного изолята в гомологичной (MDBK) и гетерологичной (СПЭВ) культуре клеток. Культивирование ротавируса в щелочной среде и обработка его трипсином в концентрации 20 мкг/мл и внесение трипсина в поддерживающую среду (15 мкг/мл) приводили к увеличению титра вируса до 8,0–8,25 lg ТЦД_{50/мл}.

Установлено, что накопление выделенного ротавируса в роллерах приводило к увеличению выхода вируса и повышению его титра до 8,5 lg ТЦД_{50/мл}. Выделенный изолят ротавируса обладает антигенными свойствами и приводит к формированию иммунного ответа при внутримышечном введении кроликам.

Ключевые слова: выделение, ротавирус, культура клеток, питательная среда, очистка и концентрация вируса.

Summary

The article is devoted to the isolation of rotavirus from a sick calf and optimization of its cultivation parameters in the transplanted lines of homologous and heterologous cell cultures. Rotavirus isolate was isolated in MDBK cell culture, which was confirmed in polymerase chain reaction and neutralization reaction, from the faeces of a sick calf. A method of culturing the isolated isolate in homologous (MDBK) and heterologous (SPEV) cell culture has been worked out. The cultivation of rotavirus in an alkaline medium and its treatment with trypsin at a concentration of 20 mcg/ml and the introduction of trypsin into a supportive medium (15 mcg/ml) led to an increase in the titer of the virus to 8.0–8.25 lg TCD_{50/ml}. It was found that the accumulation of isolated rotavirus in the rollers led to an increase in the yield of the virus and an increase in its titer to 8.5 lg TCD_{50/ml}. The isolated rotavirus isolate has antigenic properties and leads to the formation of an immune response when administered intramuscularly to rabbits.

Keywords: isolation, rotavirus, cell culture, nutrient medium, purification and concentration of the virus.

Поступила в редакцию 22.10.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Ротавирусная инфекция КРС (ротавирусный энтерит, диарея неонатальных телят) – остро протекающая контагиозная болезнь новорожденных телят, характеризующаяся поражением желудочно-кишечного тракта.

Болезнь широко распространена во всех странах мира и наносит большой экономический ущерб промышленному животноводству за счет высокого уровня заболе-

ваемости телят (50–78 %), смертности до 25–53 % в результате диареи, потери массы животных и снижения сопротивляемости другим инфекциям.

Чрезвычайно широкое распространение возбудителя заболевания, его приспособленность к паразитированию в организме некоторых видов животных, тенденция вызывать длительную персистенцию, антигенная полиморфность и относительная устойчивость к воздействию разнооб-

разных факторов обуславливают энзоотическое течение болезни в хозяйствах с неблагоприятными условиями содержания животных.

Стационарность болезни поддерживается за счет длительной персистенции возбудителя в организме животных-реконвалесцентов.

Важные условия успешной борьбы с этим заболеванием – своевременная и правильная его диагностика, проведение мер специфической профилактики, что в свою очередь предполагает получение в достаточном количестве активного вирусного антигена.

Для специфической профилактики ротавирусного энтерита применяют живые и инактивированные вакцины, которыми прививают глубокостельных коров. При этом практическое значение для профилактики ротавирусной диареи новорожденных телят имеет колостральный иммунитет, обусловленный поступлением с молозивом в организм новорожденных телят специфических антител, нейтрализующих возбудитель в просвете тонкого кишечника, а также иммунокомпетентные клетки и другие протективные факторы [2, 4].

Ротавирусы КРС характеризуются значительным антигенным полиморфизмом и нестабильностью антигенной структуры. Сложная структура генома ротавируса, в том числе его фрагментарность, обуславливают постоянную возможность модификации антигенной структуры. В связи с этим одним из основных требований, предъявляемых к производственным штаммам, является соответствие их антигенных свойств эпизоотическим штаммам возбудителя [5].

Целью нашего исследования являлось выделение ротавируса из патологического материала, поступившего от больного теленка из неблагополучного хозяйства, адаптация его к перевиваемой культуре клеток, оптимизация параметров его культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. Ротавирус выделяли из фекалий, полученных от больного теленка из

хозяйства «Восход-Агро» Молодечненского района Минской области.

Выделение ротавируса. Из фекалий готовили 20%-ную суспензию, тщательно гомогенизировали, выдерживали при температуре плюс 2–4 °С в течение 3 ч, центрифугировали при 2000 об./мин в течение 20 мин. Предварительно материал, отобранный от больного теленка, проверяли в полимеразной цепной реакции (ПЦР) на наличие антигена ротавируса. Надосадочную жидкость отбирали, пропускали через мембранный фильтр Millipore 0,22 мкм. Полученный материал использовали для заражения культур клеток.

Культура клеток. В работе использовали перевиваемые культуры клеток почки эмбриона коровы MDBK, почки африканской зеленой мартышки *Vero*, почки эмбриона макаки-резуса MA-104 и ее клон Mac-145, почки эмбриона свиньи СПЭВ.

Питательные среды. В опытах использовали среды как ростовые, так и поддерживающие согласно паспортам на перевиваемые культуры клеток: ДМЕМ, Игла МЕМ с двойным набором аминокислот и витаминов, 199, обогащенные 10%-ной (ростовая среда) и 2%-ной (поддерживающая среда) сыворотками эмбрионов коров. В работе использовали эмбриональную сыворотку в связи с широким распространением ротавирусов и соответственно высоким уровнем антивирусных тел в сыворотках крови крупного рогатого скота. Уровень рН 7,2 и 8,0 среды регулировали 7,5%-ным раствором натрия двууглекислого. Для отмывки монослоя клеток от сыворотки и продуктов жизнедеятельности использовали раствор Хенкса.

Культивирование вируса. Сформированный монослой отмывали трижды раствором Хенкса после удаления ростовой среды. Вирус, обработанный трипсином в концентрации 20 мкг/мл в течение 30 мин при температуре плюс 37 °С, наносили на монослой клеток и адсорбировали в течение 60 мин при температуре плюс 37 °С, после чего вносили поддер-

живающую среду с добавлением трипсина в концентрации 10 мкг/мл. Обязательно ставили контроли клеток с трипсином и без него. Инкубацию клеток проводили в течение 72 ч или до появления цитопатического действия вируса (ЦПД). В связи с тем, что при выделении ротавируса на начальных этапах отсутствовало цитопатическое действие, проводили 5 «слепых» пассажей.

Титрование вируса. Вирусосодержащий материал титровали на той же культуре клеток, на которой проводили его выделение. В лунки 96-луночного планшета вносили по 150 мкл суспензии клеток в концентрации 300 тыс./мл и по 50 мкл разведений вируса с 10^{-1} до 10^{-8} . В контрольные лунки вместо вирусосодержащего материала вносили питательную среду. Инкубировали планшеты 7 суток при температуре плюс 37 °С и 5,0 % CO_2 . Титр рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина или по Риду и Менчу.

Очистка ротавируса. Очистку вирусосодержащего материала от контаминации другими вирусами осуществляли методом бляшек в однослойной культуре клеток под агаровым покрытием. Культуру клеток МА-104 культивировали в чашках Петри. Готовили десятикратные разведения вируса с 10^{-1} до 10^{-8} на средах 199 и Игла MEM, взятых в соотношении 1:1. Сформировавшийся сплошной монослой клеток отмывали раствором Хенкса, вносили два последних разведения вируса, равномерно распределяя его по поверхности монослоя клеток и обеспечивая контакт вируса с клетками в течение 60 мин при температуре плюс 37 °С, после чего несвязанный вирус удаляли промыванием раствором Хенкса. Затем на слой клеток наносили специальное агаровое покрытие. В его состав входили агар, раствор Эрла, сыворотка эмбрионов коров, нейтральный красный, раствор соды (NaHCO_3), среда, антибиотики. После застывания (30–60 мин) с поверхности агара сливали конденсированную влагу, флаконы переносили в термостат и инкубировали клетками вверх. Время инкубации – 36–48 ч, температура – плюс 37 °С.

В дальнейшем для получения чистой линии вируса (клона), происходящей из одной бляшкообразующей частицы, бляшку вместе с агаром вырезали с поверхности чашки Петри, ресуспендировали в питательной среде и заражали клеточные культуры. Полученную таким образом популяцию вируса проверяли в ПЦР на типовую принадлежность и контаминацию другими вирусами.

В работе использовали еще один метод очистки вируса – метод предельных разведений. Для этого готовили последовательные разведения первого пассажа вируса, дающего выраженное ЦПД и заражали монослойную культуру клеток МА-104, выращенную в планшетах на 24 лунки. Адсорбцию проводили в течение 1 ч при температуре плюс 37 °С, инокулят удаляли, в лунки вносили среды 199 и Игла MEM с 10 мкг/мл трипсина и инкубировали при температуре плюс 37 °С 72 ч. По истечении указанного срока планшеты замораживали, оттаивали, собирали культуральную жидкость из лунок, зараженных вирусом в том разведении, которое дает ЦПД лишь в 5–10 % от площади монослоя в лунке. Вирус из этих лунок разводили и опять высевали на культуру клеток, как описано выше. Данную процедуру повторяли 3 раза.

Концентрация вируса. Для концентрации полученного вируса использовали полиэтиленгликоль (ПЭГ) 6000, которым обрабатывали материал в концентрации 10 % от объема вируса в течение 12 ч при температуре плюс 4 °С. Смесь центрифугировали при 6000 об/мин и температуре плюс 4 °С в течение 30 мин. Надосады удаляли, а осадок ресуспендировали в средах 199 и Игла MEM. Осадок отмывали три раза средой с последующим центрифугированием. Полученный вирус использовали для изучения оптимальных условий накопления в культуре клеток.

Постановка реакции нейтрализации. Вирусосодержащую культуральную жидкость предварительно замораживали и оттаивали, затем освобождали от клеточного детрита центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 мин. Готовили

последовательные десятикратные разведения вирусосодержащего материала, в равных объемах соединяли с инактивированной гипериммунной сывороткой (инактивировали при температуре 56 °С в течение 30 мин) к ротавирусу, выдерживали эту смесь при температуре плюс 37 °С в течение 1 ч. Этой смесью заражали культуру клеток MDBK в объеме 100 мкл, выращенную в 96-луночных планшетах. В каждую лунку вносили по 100 мкл поддерживающей среды. Инкубировали в течение 7 суток при температуре плюс 37 °С и 5,0 % CO₂. Результат идентификации считали положительным, если титр вируса без сыворотки составлял не ниже 3 lg, а во всех лунках, инокулированных смесью вирус+сыворотка, ЦПД не обнаруживалось.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенных исследований нами был выделен штамм ротавируса, что было подтверждено в ПЦР. Выделение ротавируса из фекалий больного теленка проводили на разных линиях культур клеток: MDBK, *Vero*, MA-104 и ее клон Marc-145 и СПЭВ. Из литературных источников известно, что для успешного выделения ротавируса необходимо суспензию патологического материала обрабатывать трипсином [6]. Механизм действия фермента заключается в расщеплении белка наружного капсида Vp4, что является обязательным условием для функциональной активности вириона. В связи с этим суспензию фекалий обрабатывали трипсином в концентрации 30 мкг/мл в течение 30 мин при температуре плюс 37 °С. ЦПД

вируса проявилось через 7 пассажей на культуре клеток почки эмбриона коровы MDBK и почки эмбриона макаки-резуса MA-104. Хотя известно, что лучшей линией клеток для выделения ротавируса является MA-104, в нашем случае наиболее выраженное ЦПД проявлялось в культуре клеток MDBK [1, 4]. Идентификацию выделенного вируса проводили в реакции нейтрализации с гипериммунной сывороткой к ротавирусу крупного рогатого скота. Полученный вирусосодержащий материал был проверен на контаминацию другими вирусами в ПЦР. Было установлено, что выделенный вирус содержит антиген вируса диареи крупного рогатого скота и коронавируса крупного рогатого скота. На данном этапе проводили очистку выделенного ротавируса от присутствующих в материале вируса диареи и коронавируса методом предельных разведений и методом бляшек в однослойной культуре клеток под агаровым покрытием. Очищенный таким образом вирус подвергали концентрации.

Следующий этап работы заключался в подборе наиболее оптимальной перевиваемой культуры клеток для накопления ротавируса. Опыт проводили как с гомологичными (MDBK), так и с гетерологичными (*Vero*, MA-104, Marc-145, СПЭВ) культурами клеток, в которых четко проявлялось цитопатическое действие вируса. Клетки заражали одной дозой вируса 0,5 ТЦД₅₀ на клетку. Результаты изучения чувствительности перевиваемых культур клеток к выделенному ротавирусу представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Результаты титрования ротавируса на перевиваемых линиях культур клеток

Культура клеток	Время наступления ЦПД, ч	Инфекционная активность, lg ТЦД ₅₀ /мл
MDBK	20–24	6,0
<i>Vero</i>	48	5,5–5,8
MA-104	28–30	5,5–6,0
СПЭВ	24–30	6,0
Marc-145	40	5,5–6,0

Как видно из таблицы 1, оптимальными культурами клеток для накопления ротавируса являются MDBK, СПЭВ. Титр вируса составлял 6,0 lg ТЦД_{50/мл}, при титровании вируса в других линиях клеток инфекционная активность достигала 5,5–6,0 lg ТЦД_{50/мл}.

Согласно литературным данным в процессе пассирования уровень инфекционности ротавируса постепенно утрачива-

ется [2, 3]. Однако предобработка вируса трипсином и введение фермента в поддерживающую среду при культивировании увеличивает выход инфекционного вируса. В связи с этим следующий этап работы заключался в подборе оптимальной дозы трипсина для обработки вируса и добавления в поддерживающую среду. Результаты этих опытов представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Влияние концентрации трипсина и рН среды на инфекционную активность ротавируса в культуре клеток MDBK и СПЭВ

Культура клеток	Концентрация трипсина, мкг/мл		рН поддерживающей среды	Титр вируса, lg ТЦД _{50/мл}	
	обработка вируса	внесение в поддерживающую среду		без обработки	после обработки
MDBK	15	10	7,2	5,0	6,5
			8,0	5,5	7,0
	20	15	7,2	-	7,0
			8,0	-	8,0
СПЭВ	15	10	7,2	5,0	6,25
			8,0	5,5	7,0
	20	15	7,2	-	7,25
			8,0	-	8,25

Как видно из таблицы 2, рН среды на не обработанный трипсином ротавирус не оказывал значительного влияния. Так, инфекционная активность вируса составляла 5,0–5,5 lg ТЦД_{50/мл} при рН 7,2–8,0 до обработки его трипсином в культуре клеток MDBK и СПЭВ. Однако обработка вирусосодержащего материала трипсином в концентрациях 15–20 мкг/мл и введение его в поддерживающую среду (10–15 мкг/мл) приводили к увеличению титра вируса до 6,25–8,25 lg ТЦД_{50/мл}. Наибольший «урожай» вируса был получен при обработке его трипсином в концентрации 20 мкг/мл и внесении в среду 15 мкг/мл для обеих линий клеток. Известно, что максимальная активность трипсина проявляется при рН 8,0. Это подтверждается результатами, представленными в таблице 2. При культивировании ротавируса в щелочных условиях (рН 8,0) титр его увеличивался до 8,0–8,25 lg ТЦД_{50/мл}. Для получения таких результатов важное значение имеет отмывка монослоя клеток (не менее 3 раз) от сыво-

ротки в ростовой среде, так как она ингибирует энзиматическую активность.

Важное значение для накопления ротавируса в высоких титрах имеет множественность инфицирования культуры клеток [5, 7]. В наших исследованиях мы заражали культуру клеток MDBK выделенным ротавирусом в дозе 0,1, 0,5 и 1,0 ТЦД₅₀ на клетку. Установлено, что наибольшую инфекционную активность ротавирус проявлял при заражении культуры клеток MDBK в дозе 0,5 и 1,0 ТЦД₅₀ на клетку. При этом титр составлял 8,0–8,25 lg ТЦД_{50/мл}.

Следующий этап работы заключался в изучении антигенных свойств выделенного ротавируса. Кроликам вводили выделенный ротавирус внутримышечно дважды с интервалом 14 суток в объеме 2 мл. Через 21 сутки после повторной иммунизации производили отбор крови для проверки в реакции нейтрализации наличия антител к ротавирусу. Результаты изучения антигенных свойств выделенного изолята представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Изучение антигенных свойств выделенного изолята ротавируса на кроликах

Способ введения	Средний титр антител в сыворотках крови в реакции нейтрализации, \log_2		
	до введения	через 14 суток после введения	через 21 сутки после повторного введения
Внутримышечный	2,0±0,52	4,0±0,43	6,0±0,33

Как видно из таблицы 3, выделенный изолят ротавируса обладает антигенными свойствами. В организме кроликов на введение ротавируса образуются антитела, титр которых составляет $6,0 \pm 0,33 \log_2$ в реакции нейтрализации.

В процессе работы установлено, что накопление выделенного ротавируса в роллерах приводило к увеличению выхода вируса и повышению его титра до $8,5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выделен изолят ротавируса в культуре клеток MDBK, что подтверждено в ПЦР и реакции нейтрализации, из фекалий больного теленка. Оработан способ куль-

тивирования выделенного изолята в гомологичной (MDBK) и гетерологичной (СПЭВ) культуре клеток. Культивирование ротавируса в щелочной среде и обработка его трипсином в концентрации 20 мкг/мл и внесение трипсина в поддерживающую среду (15 мкг/мл) приводили к увеличению титра вируса до $8,0-8,25 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$.

Установлено, что накопление выделенного ротавируса в роллерах приводило к увеличению выхода вируса и повышению его титра до $8,5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$. Выделенный изолят ротавируса обладает антигенными свойствами и приводит к формированию иммунного ответа при внутримышечном введении кроликам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Выделение и характеристика изолятов ротавируса крупного рогатого скота / Г. С. Скитович [и др.] // *Научные основы в области охраны здоровья животных* / ФГУ «ВНИИЗЖ» // *Ветеринарная патология*. – 2006. – № 4. – С. 170–172.
2. Дороненкова, Г. Н. Выделение ротавируса крупного рогатого скота / Г. Н. Дороненкова, С. А. Чупин, А. М. Тимин // *Биотехнология*. – 2004. – № 4. – С. 47–52.
3. Повышение репродукции ротавируса крупного рогатого скота штамм 101 в перевиваемой культуре клеток / О. Н. Окулова [и др.] // *Труды федерального центра охраны здоровья животных*. – Владимир, 2005. – Т. 3. – С. 194–202.
4. Рамиевили, Л. Г. Серийное пассирование ротавируса крупного рогатого скота в гетерологичной культуре клеток / Л. Г. Рамиевили, Г. Г. Рухадзе, Е. А. Непоклонов // *Вопросы вирусологии*. – 1991. – № 6. – С. 521–523.
5. Сергеев, В. А. Ротавирусы. Вирусы и вирусные инфекции / В. А. Сергеев, Е. А. Непоклонов, Т. И. Алипер. – М.: Библионика, 2007. – С. 365–369.
6. Clark, B. *Tripsin enhancement of rotavirus infectivity mechanisms of enhancement* / B. Clark, J. R. Roth, M. L. Clark // *J. Virol.* – 1981. – V. 39. – P. 816–822.
7. *Cell culture propagation of rotaviruses* / L. J. Saif [et al.] // *Tissue culture methods*. – 1988. – V. 11, № 3. – P. 152–153.

УДК 619:616-078:637.12.05-619:616.5-002.525
<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-18-25>

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹
Кучвальский М.В., аспирант²
Высоцкий А.Э., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Красникова Е.Л., научный сотрудник¹
Якобсон Е.И., магистрант²

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск
²Белорусский государственный университет, г. Минск

ТРАНСПЛАЦЕНТАРНАЯ ПЕРЕДАЧА ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У КОРОВ, ЗАРАЖЕННЫХ *Mycobacterium bovis*

Резюме

При исследовании гомогената печени и селезенки, тканей и амниотической жидкости 8- и 6-месячного плодов коров с локальными туберкулезными изменениями в лимфатических узлах легких выделена культура *M. bovis*, что достоверно подтверждает трансплацентарную передачу инфекции. Перенос происходил за счет фильтрующихся вирусоподобных форм микобактерий туберкулеза, которые трансформировались в тканях в некислотоустойчивые, частично кислотоустойчивые и типичные формы микобактерий туберкулеза. Это может приводить к возникновению эндогенного туберкулеза после рождения или создавать незаметный резервуар инфекции, так как некислотоустойчивые формы микобактерий не индуцируют развитие гиперчувствительности к туберкулину. Кроме того, персистенция у плодов измененных и типичных микобактерий может приводить к иммунологической толерантности к их антигенам.

Полученные результаты подтверждают правильность положения об изолированном выращивании телят, родившихся в неблагополучных стадах, с последующим откормом и сдачей на убой.

Ключевые слова: трансплацентарная передача, скрытая туберкулезная инфекция, микобактерии туберкулеза с дефектной клеточной стенкой.

Summary

A culture of *M. bovis* was isolated from liver and spleen homogenate, from tissues and amniotic fluid of 8- and 6-month-old fetuses of cows with local tuberculous changes in the lymph nodes of the lungs. It serves as confirmation of the transplacental infection transmission. The transfer occurred due to filtering virus-like forms of tuberculosis mycobacteria, which were transformed into non-acid-fast, partially acid-fast and typical forms of tuberculosis mycobacteria in tissues, which can lead to the emergence of endogenous tuberculosis after birth or create an invisible reservoir of infection, because non-acid-fast forms of mycobacterium do not induce the development of hypersensitivity to tuberculin. In addition, the persistence of modified and typical mycobacteria in fetuses can lead to immunological tolerance to their antigens.

The results obtained confirm the correctness of the regulations on the isolated rearing of calves born in disadvantaged conditions, followed by fattening and delivery for slaughter.

Keywords: transplacental transmission, latent tuberculosis, cell wall deficient tuberculosis mycobacteria.

Поступила в редакцию 01.09.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Прерывание звеньев эпизоотической цепи передачи микобактерий туберкулеза (МБТ) составляет основу противотуберкулезных мероприятий и оздоровления стад крупного рогатого скота. Наименее изученным и даже спорным, но важным звеном

является трансплацентарная передача туберкулезной инфекции. Если Баумгартен в 1907 г. считал, что основной путь заражения человека и животных МБТ внутриутробный [1], то в настоящее время Международное эпизоотическое бюро (МЭБ) даже не упоминает возможность транспла-

центарного инфицирования крупного рогатого скота, считая основными путями заражения воздушно-капельный и кормовой [2]. Вместе с тем, представление о том, что плацента, разделяя кровотоки матери и плода, препятствует проникновению в ткани плода бактерий, ставилось под сомнение еще в первой половине XX века, в период значительного распространения туберкулеза, когда туберкулезные изменения обнаруживались у 2,3 % плодов больных коров и 3 % родившихся телят [1].

Несмотря на то, что случаи туберкулеза плодов и новорожденных большей частью объясняли туберкулезными поражениями матки и плаценты [3], в 1928 г. М.В. Триус по результатам опытов пришла к выводу, что через неповрежденную плаценту могут проходить какие-то «элементы туберкулезного возбудителя с ослабленной вирулентностью», по мнению В.А. Любарского (1928) – фильтрующиеся формы МБТ [1].

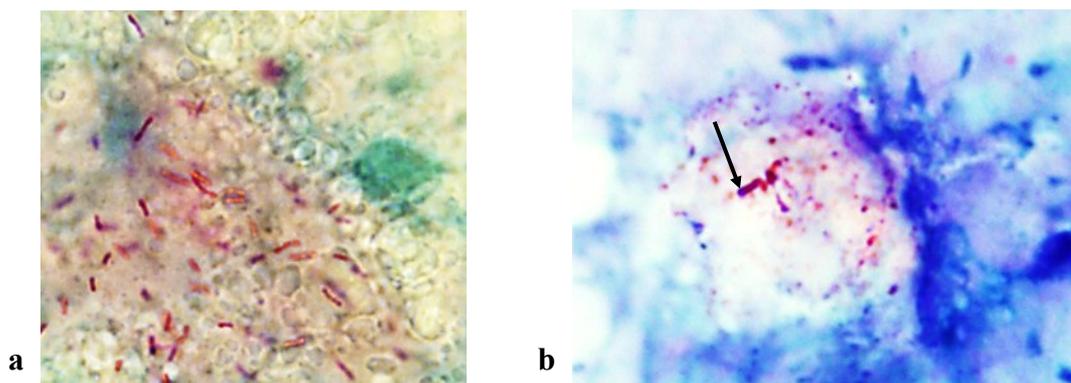
Возможность трансплацентарной передачи туберкулезной инфекции, в частности у человека, не отрицается и в настоя-

щее время [4], хотя механизм в деталях не изучен и не ясны последствия такого инфицирования. Лишь недавно было установлено, что L-формы вакцинного штамма *Mycobacterium bovis* BCG, персистирующие в организме матери при беременности, способны колонизировать плаценту и, трансформируясь в ультрамелкие формы, проходить через плацентарный барьер и проникать в ткани плода [5].

Цель исследований – изучение возможности трансплацентарной передачи туберкулезной инфекции у крупного рогатого скота с учетом способности МБТ трансформироваться в формы с дефектной клеточной стенкой (L- и cell wall deficient – CWD-формы).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали кровь, ткани сердца, легких, печени 8-месячного плода, амниотическую жидкость, селезенку, печень 6-месячного плода, взятых при диагностическом убое 2 стельных коров с единичными туберкулезными гранулемами в лимфатических узлах легких (рисунок 1).



а – корова № 11; б – корова № 32

Рисунок 1. – Отпечатки лимфатических узлов коров-матерей, 10×100

Микроскопия. Мазки тканей и выделенных культур фиксировали нагреванием и окрашивали по Кinyoun, а также дифференцирующим иммунопероксидазным методом (ДИП) [6], включавшим инактивацию эндогенной пероксидазы (ЭП) 3 % H₂O₂, окраску по Кinyoun, инкубацию с конъюгатом пероксидазы и аф-

финно-очищенных Ig (антител) антисыворотки к *M. bovis* 8 (истощенной антигенами микобактерий II–IV группы по Раньону и нетуберкулезной микрофлоры), обработку субстратным раствором 3,3'-диаминобензидина с H₂O₂. При такой ДИП-окраске кислотоустойчивые (КУ) МБТ окрашиваются в красный, некислотоустойчивые

(НКУ, CWD) формы – в коричневый, а немикобактериальная микрофлора и ткани – в синий цвет. Результаты учитывают, если в контрольных мазках, окрашенных по Kinyoun и обработанных субстратным раствором, все объекты синего (сине-зеленого) цвета (полная инактивация ЭП). Микроскопию проводили на Olympus B51X (10×100).

Бактериологический посев. Гомогенаты тканей плодов после деконтаминации 6%-ной щавелевой кислотой по общепринятой методике высевали на среду Гельберга.

Кровь, алантоисную жидкость, гомогенаты селезенки и печени высевали на среду MucSel DW [7]. Перед посевом пробы (1:3) инкубировали 24 ч при температуре 37 °С со стимуляторами роста: MucSel DW (с 0,1% хлоргексидина для посева крови) [7], ВКГ («Hansa») [8].

Амниотическую жидкость перед смешиванием со стимулятором роста пропускали через фильтр Millex GP 0.22 µm, а гомогенат селезенки и печени деконтаминировали 6%-ной щавелевой кислотой.

Посевы инкубировали при температуре 37 °С, при отсутствии роста делали «слепые» пересевы на среде MucSel DW.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Пробы прогревали 5 мин (95 °С) в лизирующем буфере. ДНК выделяли на колонках с сорбентом (ИБОХ НАНБ). ДНК исследовали в ПЦР с праймерами 16s RNA, MPB64, MPB 70, Is 6110 (Mycobacteria). Амплификацию проводили на C1000™ ThermoCycler и CFX96™ Real-Time System (BioRad). Результаты электрофореза амплификатов учитывали на Molecular Imager GelDoc™ XR+ (BioRad).

Для электрофореза в полиакриламидном геле (12 % ПААГ-ДСН) (Laemmli, 1970) и иммуноблоттинга отмытую бактериальную массу изолятов суспендировали в буферном растворе для нанесения образцов (4х), прогревали 7 мин при температуре 98 °С, осаждали центрифугированием при 14000 об/мин. После электрофореза

перенос осуществляли на Trans-blot SD. Для иммуноблоттинга использовали кроличью антисыворотку к CWD *M. tuberculosis* H37Rv (1:80), адсорбированную смесью инактивированных стафилококков, стрептококков, кишечной палочки и пастерелл, конъюгат пероксидазы с козьими IgG к IgG кролика (ThermoFisher Scientific 1:3000) и субстратную смесь (3,3'-диаминобензидин «Fluka» с H₂O₂).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В средостенных лимфатических узлах коров-матерей обнаружены единичные гранулемы, в которых при микроскопии найдены типичные МБТ (рисунок 1). Туберкулезных изменений в других тканях, в том числе в матке и плаценте, не было.

В мазках-отпечатках легких 8-месячного плода обнаружены микобактериальные антигены: коричневые включения в клетках, коричневая «сеть» в межклеточном пространстве (рисунок 2, стрелки). В печени найдены слабые следы антигенов (темная окантовка клеток), а также палочковидные формы светло-красного цвета (частично кислотоустойчивые – ЧКУ), окружавшие некоторые клетки (рисунок 2).

Выраженное накопление микобактериальных антигенов отмечено в клетках сердца и крови 8-месячного плода (рисунки 2, 3 интенсивная коричневая окраска клеток). При этом в крови в значительных количествах (нередко до 5 клеток в поле зрения микроскопа) обнаружены коричневые палочковидные формы, явно НКУ (CWD) МБТ (рисунок 4, стрелки).

Посев крови 8-месячного плода коровы, больной туберкулезом, дал рост микроорганизмов с характерной для CWD МБТ морфологией (рисунки 5, 6). В ПЦР была подтверждена принадлежность изолята к роду *Mycobacterium* (рисунок 7). Вместе с тем при посеве тканей, деконтаминированных 6%-ной щавелевой кислотой, на среду Гельберга выделить типичные МБТ не удалось.

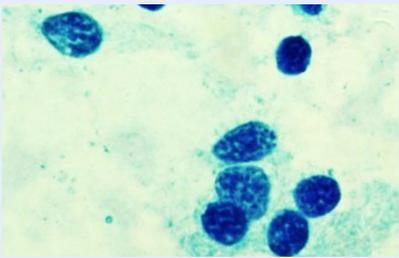
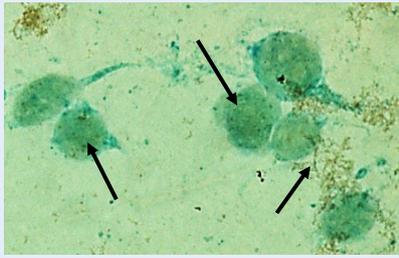
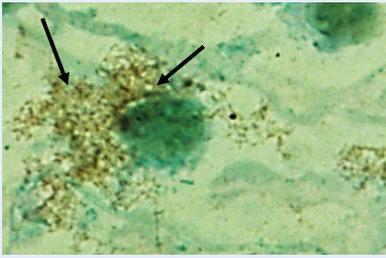
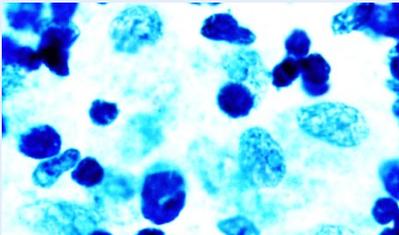
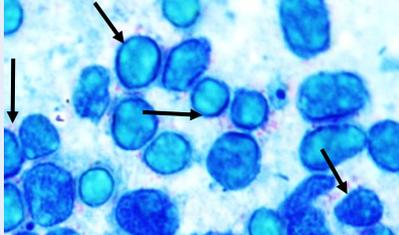
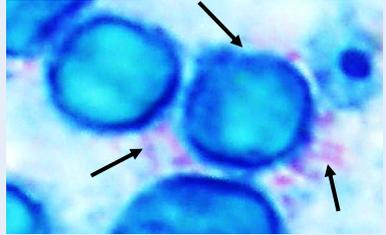
Контроль инактивации ЭП	ДИП-окраска	
	легкое	
		
печень		
		
сердце		
		

Рисунок 2. – Отпечатки тканей легкого, печени, сердца 8-месячного плода коровы, больной туберкулезом. ДИП-окраска с использованием конъюгата пероксидазы с Ig к антигенам *M. bovis* 8, 10×100

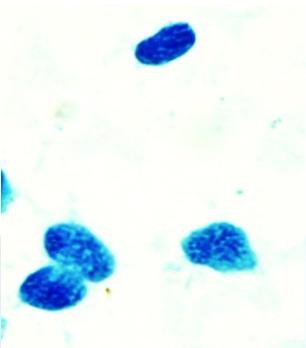
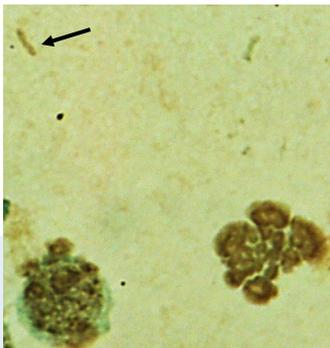
Контроль инактивации ЭП	ДИП-окраска	
		

Рисунок 3. – Мазки крови 8-месячного плода коровы, больной туберкулезом. ДИП-окраска с использованием конъюгата пероксидазы с Ig к антигенам *M. bovis* 8, 10×100

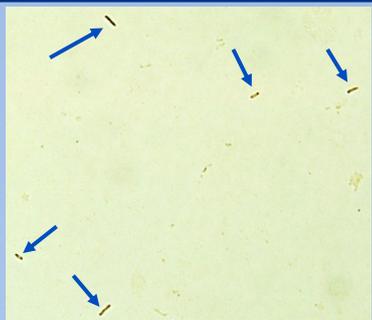
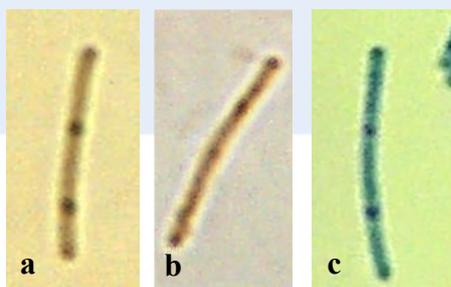


Рисунок 4. – Мазок крови 8-месячного плода коровы, больной туберкулезом. 5 коричневых палочковидных форм – CWD МБТ (стрелки). ДИП-окраска с использованием конъюгата пероксидазы с Ig к антигенам *M. bovis* 8, 10×100



Рисунок 5. – Изолят из крови 8-месячного плода коровы, больной туберкулезом. ДИП-окраска с использованием конъюгата пероксидазы с Ig к антигенам *M. bovis* 8, 10×100

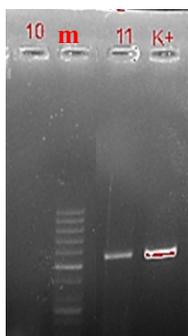


а – палочковидная форма, выделенная из крови 8-месячного плода коровы, зараженной *M. Bovis*; б – CWD МБТ из крови человека с костным туберкулезом; с – CWD *M. bovis* 8, 10×100; а, б – ДИП-окраска, с – Kinyoun, 10×100

Рисунок 6. – Морфология палочковидных форм CWD МБТ, выделенных из разных источников

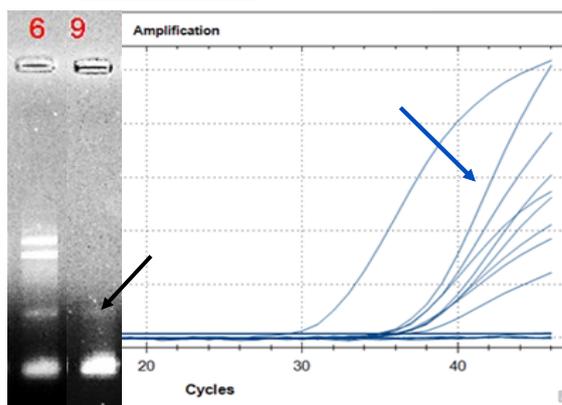
В гомогенате печени и селезенки 6-месячного плода коровы № 32, больной туберкулезом, был обнаружен геном микобактерий комплекса *tuberculosis-bovis* (ри-

сунок 8), что коррелировало с присутствием в клетках микобактериальных антигенов (рисунок 9).



10 – отрицательный контроль; m – маркер молекулярной массы (м.м.); 11 – исследуемый изолят; K+ – положительный контроль

Рисунок 7. – Результат ПЦР с праймерами 16s RNA ДНК изолята из крови 8-месячного плода коровы № 11, больной туберкулезом



6 – положительный контроль; 9 – исследуемая проба
Рисунок 8. – Результаты ПЦР с праймерами 16s RNA, MPB70, MPB 64 (сверху-вниз) ДНК из гомогената печени и селезенки эмбриона коровы № 32, больной туберкулезом (ампликон MPB 64 – черная стрелка), и ПЦР-RT с праймерами Is 6110 (Cq 35.91, синяя стрелка)

При посеве амниотической жидкости, пропущенной через фильтр 0,22 μm, гомогената печени и селезенки 6-месячного плода, деконтаминированного 6%-ной щавелевой кислотой, инкубированных в стимуляторах роста, в обоих случаях через 6 и 5 дней был получен рост НКУ полиморфных палочко-

видных форм, которые по морфологии не отличались от изолята из лимфатического узла матери (таблица). ДНК изолятов в ПЦР дала положительную реакцию с праймерами микобактерий комплекса *tuberculosis-bovis* (рисунок 10), что позволило отнести их к CWD МБТ.

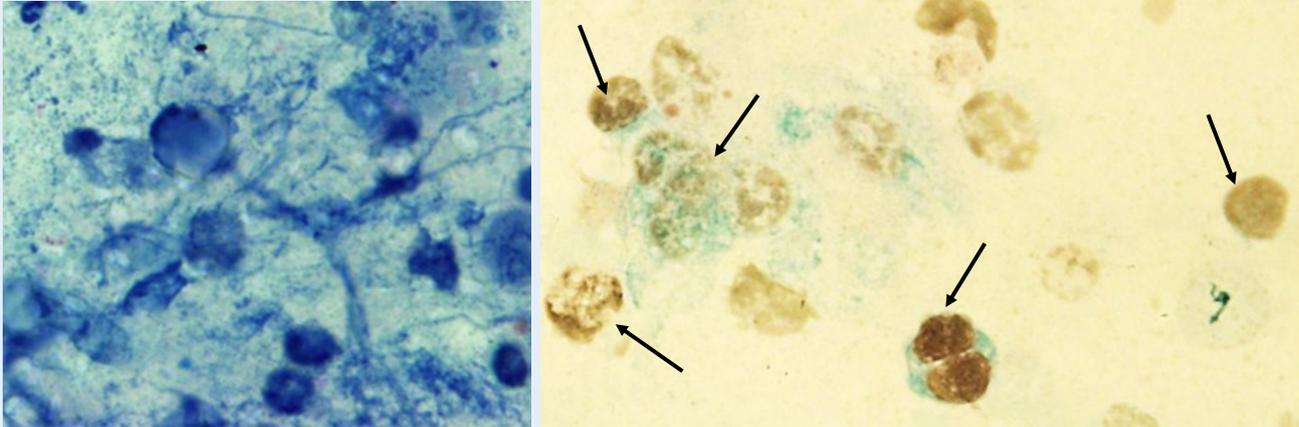


Рисунок 9. – Клетки в гомогенате печени и селезенки 6-месячного плода коровы, больной туберкулезом. ДИП-окраска с использованием конъюгата пероксидазы с Ig к антигенам *M. bovis* 8, 10x100

Полипептидный и антигенный состав CWD изолята из гомогената печени и селезенки плода коровы № 32, деконтаминированного 6%-ной щавелевой кислотой, изолятов из стерилизованной фильтрацией аллантаической жидкости, выделенных с использованием стимуляторов роста ВКГ и МусСел DW, был одинаков и не отличался от состава CWD МБТ из лимфатического узла коровы № 32, больной туберкулезом (рисунок 11). Это указывает на то, что изоляты не были контаминантами, так как имели идентичный антигенный спектр, выявляемый антисывороткой к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, и были CWD-формой од-

ного и того же штамма *M. bovis*. Наиболее важным явилось выделение из гомогената печени и селезенки 6-месячного плода типичных МБТ (рисунок 12). На среде Гельберга рост (1 колония Ø2 мм) был обнаружен только через 3,5 месяца после посева. Большую часть популяции изолята составляли КУ красного цвета палочки разной длины, но встречались и НКУ синего цвета, похожие по морфологии на ранее выделенные из этого материала CWD-формы. Исследование ДНК в ПЦР подтвердило принадлежность изолята к *M. bovis* (Is 6110, Cq 20.90).

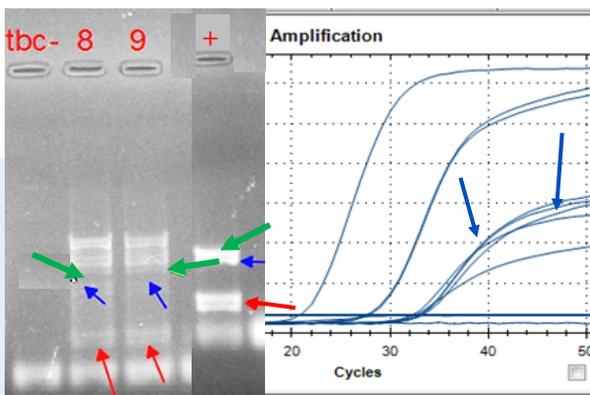
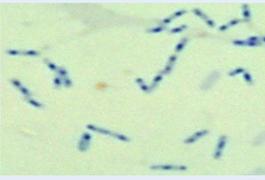
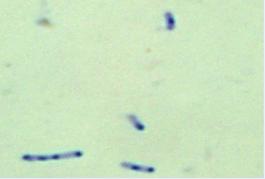
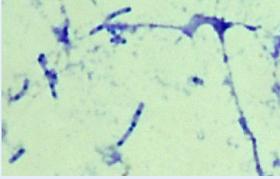
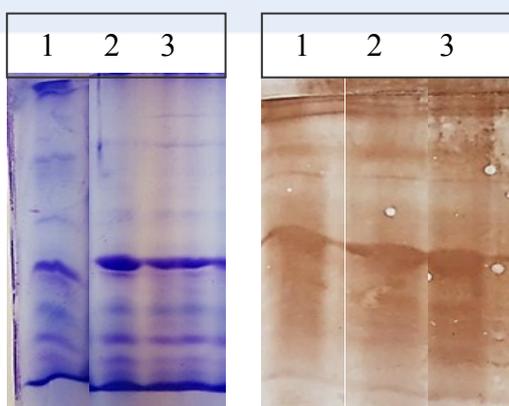


Рисунок 10. – Результаты ПЦР с праймерами 16s RNA (зеленая стрелка), MPB70 (синяя стрелка), MPB 64 (красная стрелка) и ПЦР-RT с праймерами Is 6110 ДНК изолятов из амниотической жидкости (проба № 8) и из гомогената печени и селезенки 6-месячного плода (проба № 9) (положительные реакции – стрелки)

Таблица. – Результаты посева на среду MucCel DW амниотической жидкости, гомогената печени и селезенки 6-месячного плода коровы № 32, больной туберкулезом

Материал, посеянный на среду MucCel DW	Рост в исходном посеве	Рост после нескольких пересевов
Амниотическая жидкость, пропущенная через фильтр 0,22 мк		
Гомогенат печени и селезенки плода коровы, деконтаминированный 6%-ной щавелевой кислотой		
Гомогенат лимфатического узла с туберкулезными изменениями коровы № 32, деконтаминированный 6%-ной щавелевой кислотой		



1 – CWD МБТ из лимфоузла коровы № 32;
 2 – CWD МБТ из гомогената печени и селезенки плода коровы № 32;
 3 – CWD МБТ из аллантоисной жидкости
Рисунок 11. – Электрофорез (12 % ПААГ–ДСН) и иммуноблоттинг с а/с к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv

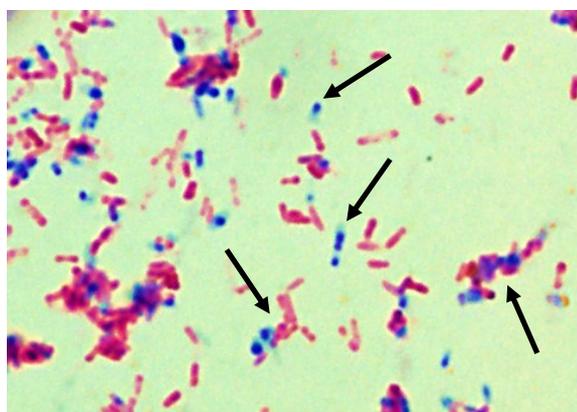


Рисунок 12. – Изолят из гомогената печени и селезенки 6-месячного плода коровы № 32, выросший на среде Гельберга, НКУ (синего цвета) формы МБТ (стрелки)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Факт выделения типичных МБТ из смеси тканей печени и селезенки плода коровы с локальными туберкулезными изменениями в лимфатических узлах лег-

ких и без видимой патологии матки и плаценты достоверно свидетельствует о трансплацентарной передаче туберкулезной инфекции. Известно, что в основе трансплацентарной передачи туберкулез-

ной инфекции может лежать колонизация плаценты L-формами МБТ, образующими ультрамелкие вирусоподобные формы, преодолевающие плацентарный барьер [5]. В проведенных исследованиях подтверждено, что трансплацентарный перенос явно осуществлялся за счет вирусоподобных фильтрующихся форм МБТ, так как из амниотической жидкости, пропущенной через фильтр 0.22 μm , были выделены CWD МБТ, являющиеся результатом развития фильтрующихся форм МБТ под действием стимулятора роста и культивирования на специальной питательной среде.

Установлено, что преодолевшие плацентарный барьер вирусоподобные формы МБТ инфицировали клетки тканей плодов и трансформировались в бактериальные неокислостойчивые CWD-формы, фактически вызывавшие бактериемию (рисунки 3, 4). Локализуясь в тканях, они частично восстанавливали кислотоустойчивость (рисунок 2) и даже в одном случае реверсировали в типичные МБТ (рисунок

12). Способность к реверсии L-форм МБТ, преодолевших плацентарный барьер, отмечалась и другими исследователями [5]. Последствием этого может быть развитие эндогенного туберкулеза после рождения [1, 3]. Вместе с тем, CWD МБТ не всегда могут трансформироваться в типичную форму [7, 8, 11], однако способны пожизненно персистировать в организме, оставаясь незамеченными, так как не индуцируют развитие гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к туберкулину [9–11]. При этом нельзя исключить, что персистенция у плодов CWD и типичных МБТ может приводить к иммунологической толерантности к их антигенам, что резко снижает эффективность иммунологических методов выявления туберкулезной инфекции у взрослых животных. То есть телята, родившиеся в неблагополучном по туберкулезу стаде, представляют собой скрытый резервуар инфекции и должны исключаться из воспроизводства стада и получения молока.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ротов, В. И. Туберкулез сельскохозяйственных животных / В. И. Ротов, П. И. Кокуричев, П. Е. Савченко. – Киев : Урожай, 1973. – 384 с.
2. Cousins, D. V. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock / D. V. Cousins // *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* – 2001. – Vol 20, № 1. – P. 71–85.
3. Юсковец, М. К. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птиц / М. К. Юсковец. – Минск, 1963. – 446 с.
4. Врожденный туберкулез / Е. В. Богданова [и др.] // *Туберкулез и болезни легких.* – 2012. – № 1. – С. 54–58.
5. *Mother-to-newborn transmission of mycobacterial L-forms and V δ 2 T-cell response in placentobiotome of BCG-vaccinated pregnant women* / T. Dimova [et al.] // *Scientific Reports.* – 2017. – 11 – P. 1–11.
6. Выявление микобактерий туберкулеза в тканях с помощью дифференцирующей иммунопероксидазной окраски / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез и болезни легких.* – 2014. – № 10. – С. 55–58.
7. Феномен изменчивости микобактерий туберкулеза и его использование для обнаружения туберкулезной инфекции / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез – глобальная катастрофа человечества: материалы I Междунар. заочной науч.-практ. конф., 24 марта 2014 г. / Ростов-на-Дону : РостГМУ, 2014. – С. 176–198.*
8. Власенко, В. В. Современная диагностика туберкулеза / В. В. Власенко, А. П. Лысенко, И. Г. Власенко. – Vinnica : Edelweis I K^o, 2011. – 198 с.
9. Diller, I. *Three similar strains of pleomorphic acid-fast organisms isolated from rat and mouse tissues and from human blood* / I. Diller // *Am. Rev. Resp. Dis.* – 1962. – Vol. 86. – P. 932–935.
10. *Morphological, biological and immunological studies on isolates from tumors and leukemic bloods* / F. Seibert [et al.] // *Ann. NY Acad Sci.* – 1970. – Vol. 174, № 2. – P. 690–728.
11. Chandrasekhar, S. *Studies on cell-wall deficient non-acid fast variants of Mycobacterium tuberculosis* / S. Chandrasekhar, S. Ratnam // *Tubercle and Lung Disease.* – 1992. – Vol. 73. – № 5. – P. 273–279.

УДК 619:616-085.36:636.52/58:619:579.842.11
<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-26-30>

Насонов И.В., доктор ветеринарных наук, профессор
Радюш И.С., кандидат ветеринарных наук, доцент
Кныш Н.В., кандидат ветеринарных наук
Захарик Н.В., кандидат ветеринарных наук
Романовская Н.Б., ветеринарный врач

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

ГИПЕРИММУНИЗАЦИЯ КУР ЯЙЦЕНОСНЫХ ПОРОД ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ К *ESCHERICHIA COLI* ЖЕЛТОЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Резюме

В данной статье представлены результаты исследований по подбору адъювантов и оптимальной схемы гипериммунизации кур-несушек для получения специфических к *Escherichia coli* желточных иммуноглобулинов. Установлено, что для получения специфических желточных иммуноглобулинов достаточно двух иммунизаций кур формализованным антигеном *Escherichia coli* (3×10^9 КОЕ/мл) с адъювантом Montanide ISA 70 или Montanide ISA 206. Использование адъюванта Montanide ISA 70 в соотношении по весу 70:30 с антигеном и адъюванта Montanide ISA 206 в соотношении по весу 50:50 с антигеном является равноценным.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, эшерихиоз, антиген, антитела, иммунитет, куры-несушки, адъюванты, гипериммунизация кур, желточные иммуноглобулины, конъюгаты специфических антител с антибиотиками.

Summary

This article presents the results of studies on the selection of adjuvants and the optimal scheme for hyperimmunization of *Escherichia coli* laying hens to obtain specific yolk immunoglobulins. It was found that to obtain specific yolk immunoglobulins, two immunizations of chickens with formalized *Escherichia coli* antigen (3×10^9 CFU/ml) with Montanide ISA 70 or Montanide ISA 206 adjuvant are sufficient. The use of Montanide ISA 70 in an adjuvant:antigen ratio of 70:30 by weight, respectively, and Montanide ISA 206 in an adjuvant:antigen ratio of 50:50 by weight, respectively, is equivalent.

Keywords: *Escherichia coli*, escherichiosis, antigen, antibodies, immunity, laying hens, adjuvants, hyperimmunization of chickens, yolk immunoglobulins, conjugates of specific antibodies with antibiotics.

Поступила в редакцию 02.11.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Применение антибиотиков позволило успешно бороться со многими инфекциями, поражающими птицу при промышленном ведении птицеводства. Однако сегодняшние реалии таковы, что при постоянном, а зачастую бесконтрольном применении антибиотиков мы сталкиваемся с ростом числа возбудителей болезней, которые приобрели устойчивость к антибактериальным средствам, и уже большая часть обычных антибиотиков не оказывает эффекта против внутриклеточно локализованных бактерий.

Во всем мире интерес ученых направлен на поиск новых методов борьбы с возбудителями бактериальных инфекций, позволяющих сократить использование антибиотиков. Одним из современных методов лечения и профилактики бактериальных инфекций у животных и птиц является применение специфических желточных иммуноглобулинов (IgY), полученных из яиц иммунизированных кур [2], а также применение конъюгатов специфических антител с антибиотиками.

Доклинические исследования с использованием лабораторных животных по-

казали: лечение инфекций с помощью конъюгатов антител с антибиотиками гораздо более эффективно, чем лечение одними антибиотиками [5]. Бимодальная структура конъюгированной формы антител позволяет усилить противобактериальную эффективность антител за счет сочетанного действия ключевых свойств антител и антибиотиков [6]. Структурные компоненты антител, обуславливающие их аффинные и эффекторные свойства, играют решающую роль в механизмах антибактериального действия антител [2, 3, 4].

Клинические испытания подтверждают, что желточные антитела являются безопасным эффективным средством для лечения и профилактики многих бактериальных болезней животных и птиц [5]. Применение желточных иммуноглобулинов дает толчок собственному иммунитету организма для борьбы с патогеном и стимулирует защитные функции организма.

Использование желточных антител расширяет возможности ветеринарии для использования их при пассивной иммунизации и терапии бактериальных и вирусных заболеваний, а также при создании тест-наборов для диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний.

Перспективным направлением использования желточных иммуноглобулинов в ветеринарии Республики Беларусь является профилактика и лечение эшерихиоза у птиц – распространенного заболевания, поражающего желудочно-кишечный тракт молодняка птицы в возрасте от 3 до 140 дней. Эшерихиоз птиц наносит значительный финансовый ущерб промышленному птицеводству из-за гибели эмбрионов и цыплят, снижения привесов и яйценоскости, неудовлетворительным развитием перерожденного молодняка [1].

В настоящее время при эшерихиозе птиц применяются различные методы лечения: антибиотики, пробиотики, вакцины. Тем не менее, эшерихиоз по-прежнему остается одним из заболеваний, наносящих крупный ущерб промышленному птицеводству. Причин тому множество: применение препаратов без определения чувствитель-

ности к ним микроорганизмов, отсутствие комплексного подхода к решению данной проблемы и др. [1].

Очевидно, что разработка принципиально новых препаратов для лечения эшерихиоза у птиц на основе конъюгированных с антибиотиками антиген-специфических желточных иммуноглобулинов является весьма актуальной и своевременной.

Для получения желточных иммуноглобулинов необходимо проведение гипериммунизации кур-несушек. Поэтому на данном этапе **целью нашей работы** являлся подбор адъювантов и оптимальной схемы гипериммунизации кур яйценосных пород для получения специфических к *Escherichia coli* желточных иммуноглобулинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе отдела болезней птиц, пчел и физико-химических исследований и вивария РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Для иммунизации кур-несушек инфекционным агентом нарабатывали бактериальную массу культуры *Escherichia coli* на среде МПА. Чистоту посевов определяли микроскопией мазков, окрашенных по Граму (эшерихии визуализируются как полиморфные мелкие грамтрицательные палочки с закругленными концами, не образующие спор, расположенные одиночно или попарно), и посевами на агар Эндо, МПА, МПБ, МППБ под вазелиновым маслом и среду Сабуро с последующим просмотром через 18–24 часа культивирования при температуре плюс 37 °С, а на среде Сабуро – при температуре плюс 22 °С через 6 суток.

Колонии эшерихий, выращенные на МПА в течение 20–24 часов, смывали раствором натрия хлорида массовой долей 0,9 %, центрифугировали в течение 20 минут при 3000 об/мин, надосадочную жидкость сливали, а осадок ресуспендировали в растворе натрия хлорида массовой долей 0,9 % до концентрации 3×10^9 КОЕ/мл, инактивировали формалином с содержани-

ем формальдегида не ниже 36 %, который добавляли из расчета 0,3 % к объему. Формалин разводили стерильной дистиллированной водой в соотношении 1:1 и добавляли к бактериальной культуре при постоянном перемешивании.

После добавления формалина культуру выдерживали в термостате при температуре плюс 37 °С в течение 21 суток для полной инактивации токсинов эшерихий. Содержимое флаконов ежедневно тщательно перемешивали. Полноту инактивации контролировали посевом культур во флаконы с бульоном Хоттингера из расчета 3 мл культуры на 100 мл среды. Посевы культивировали в течение суток, а затем пересеивали во флаконы с бульоном Хоттингера и чашки с агаром Эндо.

Патогенные свойства культур *Escherichia coli* изучали в опыте при внутрибрюшинном заражении трех белых мышей массой 14–16 г смывом с агаровой культуры концентрацией 1×10^9 КОЕ/мл в объеме 0,5 мл. Три белые мыши массой 14–16 г служили контролем, им внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл стерильного раствора натрия хлорида массовой долей 0,9 %. Срок наблюдения составлял 3 суток.

Для иммунизации *Escherichia coli* кур-несушек, а также для определения оптимального состава антигена (*Escherichia coli*) и адьюванта, который обеспечивает в организме птицы выработку специфических антител к возбудителю эшерихиоза, были сформированы три группы по 5 кур-несушек в возрасте 140 суток.

Антиген готовили следующим образом:

- формализованный антиген (в дозе 3×10^9 КОЕ/мл) смешивали с адьювантом Montanide ISA 70 в соотношении по весу адьювант:антиген 70:30;

- формализованный антиген (в дозе 3×10^9 КОЕ/мл) смешивали с адьювантом Montanide ISA 206 в соотношении по весу адьювант:антиген 50:50.

Кур первой группы иммунизировали четырехкратно с интервалом 10–14 суток формализованным антигеном (*Escherichia coli*) в дозе 3×10^9 КОЕ/мл с адьюван-

том Montanide ISA 70 в 4 точки внутримышечно в область грудных мышц; кур второй группы – четырехкратно с интервалом 10–14 суток формализованным антигеном (*Escherichia coli*) в дозе 3×10^9 КОЕ/мл с адьювантом Montanide ISA 206 в 3 точки в область грудных мышц; курам третьей группы (контроль) вводили раствор натрия хлорида массовой долей 0,9 % в 3 точки в область грудных мышц.

С целью получения сыворотки и проверки ее на наличие антител к *Escherichia coli* в реакции агглютинации (РА) отбирали пробы крови из подкрыльцовой вены иммунизированных кур-несушек на протяжении всего опыта, а также на 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки после последнего введения антигена с адьювантами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При посевах на МПБ, МПА и агар Эндо через 18–24 часа культивирования при температуре плюс 37 °С наблюдали рост характерных для *Escherichia coli* колоний: в МПБ – диффузный рост с образованием интенсивной равномерной мути и легко разбивающийся осадок, в отдельных пробирках отмечали появление поверхностной пленки и кольца на стенках пробирки; на МПА отмечали рост гладких, выпуклых, блестящих, с ровными краями серо-белых колоний диаметром 2–4 мм, иногда сливающихся в сплошное наложение и хорошо суспендируемых в растворе натрия хлорида с массовой долей 0,9 %; на агаре Эндо – рост розовых и бесцветных колоний с интенсивно окрашенным центром. При микроскопии мазков, окрашенных по Граму, микроорганизмы визуализировались как полиморфные мелкие грамотрицательные палочки с закругленными концами, не образующие спор, расположенные одиночно или попарно. При посеве в МППБ под вазелиновым маслом и среде Сабуро с последующим просмотром через 18–24 часа культивирования в МППБ при температуре плюс 37 °С, а на среде Сабуро – при температуре плюс 22 °С через 6 суток роста микроорганизмов не наблюдалось.

Escherichia coli была признана патогенной для белых мышей, так как 2 мыши погибли после заражения культурой *Escherichia coli* в течение 3 суток наблюдения, и из органов павших животных была выделена исходная культура.

Изготовленный для иммунизации кур-несушек антиген считали стерильным, так как рост эшерихий в течение 72 часов

во флаконах с бульоном Хоттингера и на чашках Петри с агаром Эндо отсутствовал.

При иммунизации кур-несушек первой группы на 10-е сутки после 2-й иммунизации средний титр антител в сыворотке крови в РА с аутоантигеном *Escherichia coli* составил $6,244 \pm 0,24 \log_2$, а при иммунизации кур-несушек второй группы – $6,644 \pm 1,0 \log_2$ (таблица).

Таблица. – Титр антител к *Escherichia coli* при иммунизации кур-несушек формализованным антигеном с применением различных адъювантов в виде величин, обратных разведениям

Группа	После 2-й иммунизации, сут.		После 3-й иммунизации, сут.	После 4-й иммунизации, сут.		
	10	14	7	7	14	21
	средний титр антител, \log_2					
Формализованный антиген (3×10^9 КОЕ/мл) с адъювантом Montanide ISA 70	$6,244 \pm 0,24$	$7,044 \pm 0,24$	$7,144 \pm 0,65$	$6,394 \pm 0,63$	$6,394 \pm 0,25$	$5,894 \pm 0,63$
Формализованный антиген (3×10^9 КОЕ/мл) с адъювантом Montanide ISA 206	$6,644 \pm 1,0$	$7,044 \pm 0,40$	$5,394 \pm 0,48$	$6,644 \pm 0,45$	$6,894 \pm 0,25$	$6,644 \pm 0,55$
Контроль (раствор натрия хлорида массовой долей 0,9 %)	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.

Как видно из таблицы, средний титр антител к *Escherichia coli* у птиц первой группы на 14-е сутки после 2-й иммунизации на $0,8 \log_2$ (при $p < 0,05$) выше среднего титра антител птиц данной группы, регистрировавшегося на 10-е сутки после 2-й иммунизации. У птиц второй группы средний титр антител к *Escherichia coli* на 14-е сутки после 2-й иммунизации на $0,4 \log_2$ выше среднего титра антител птиц той же группы на 10-е сутки после 2-й иммунизации, однако увеличение среднего титра не является достоверным.

Средний титр антител к *Escherichia coli* у птиц первой группы на 7-е сутки после 3-й иммунизации на $0,1 \log_2$ выше такового у птиц данной группы на 14-е сутки после 2-й иммунизации. У птиц второй группы средний титр антител к *Escherichia*

coli на 7-е сутки после 3-й иммунизации на $1,65 \log_2$ достоверно (при $p < 0,05$) ниже среднего титра антител птиц той же группы на 14-е сутки после 2-й иммунизации.

На 7-е и 14-е сутки после 4-й иммунизации наблюдалась тенденция к снижению среднего титра антител к *Escherichia coli* у птиц первой группы на $0,75 \log_2$ по сравнению со значениями среднего титра антител у птиц данной группы на 7-е сутки после 3-й иммунизации.

У птиц второй группы, напротив, наблюдалась тенденция к увеличению среднего титра антител к *Escherichia coli*. Так, на 7-е сутки после 4-й иммунизации титр антител на $1,25 \log_2$ выше среднего титра антител птиц той же группы на 7-е сутки после 3-й иммунизации. На 14-е сутки после 4-й иммунизации средний титр

антител к *Escherichia coli* у данной группы составил $6,894 \pm 0,25$, что на $0,25 \log_2$ выше среднего титра антител птиц той же группы на 7-е сутки после 4-й иммунизации и на $1,5 \log_2$ достоверно (при $p < 0,05$) выше среднего титра антител на 7-е сутки после 3-й иммунизации. У птиц первой группы на 21-е сутки после 4-й иммунизации титр специфических антител к *Escherichia coli* продолжал снижаться и составил $5,894 \pm 0,63 \log_2$. У птиц второй группы также наблюдалась тенденция к снижению среднего титра антител к *Escherichia coli*. Так, на 21-е сутки после 4-й иммунизации титр антител составил $6,644 \pm 0,71 \log_2$, что на $0,25 \log_2$ ниже среднего титра антител птиц той же группы на 14-е сутки после 4-й иммунизации. Однако снижение титра специфических антител в данной группе происходило более плавно, чем в первой.

В дальнейшем наблюдалось более быстрое снижение титра антител. Так, на 28-е сутки после 4-й иммунизации средний титр антител составил для первой группы $5,233 \pm 1,85$ (на $0,66 \log_2$ ниже среднего титра антител птиц той же группы на 21-е сутки после 4-й иммунизации), для второй группы – $4,096 \pm 2,07$ (на $2,548 \log_2$ ниже среднего титра антител птиц той же группы, чем на 21-е сутки после 4-й иммунизации).

У птиц контрольной группы на протяжении всего опыта антитела к *Escherichia coli* отсутствовали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для иммунизации кур-несушек достаточно двух введений формализованного антигена *Escherichia coli* (в дозе 3×10^9 КОЕ/мл) с адъювантом Montanide ISA 70 в соотношении по весу адъювант:антиген 70:30 или того же антигена с адъювантом Montanide ISA 206 в соотношении по весу адъювант:антиген 50:50.

При иммунизации кур *Escherichia coli* в качестве адъюванта можно использовать как Montanide ISA 70, так и Montanide ISA 206, поскольку достоверных отличий среднего титра антител у птиц между опытными группами не выявлено.

Для получения желточных иммуноглобулинов мы будем использовать яйцо от иммунизированных кур несушек, полученное на 10–21-е сутки после 2-й иммунизации, так как в этот период в сыворотках крови кур регистрировались наиболее высокие значения титра антител.

Наши дальнейшие исследования будут направлены на разработку способов физико-химической модификации выделенных желточных иммуноглобулинов из яйца иммунизированных *Escherichia coli* кур-несушек для последующей конъюгации с антибиотиками и испытание антибактериальной эффективности конъюгированных антител с антибиотиками на экспериментальных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Винокуров, В. Ю. Колибактериоз (эшерихиоз) кур: эпизоотология, диагностика, профилактика и меры борьбы : дис. ... канд. ветеринар. наук : 06.02.02 / В. Ю. Винокуров. – Персиановский, 2010. – 120 л.
2. Каплин, В. С. Использование желточных антител птиц (IgY) для пассивной иммунизации сельскохозяйственных и домашних животных / В. С. Каплин, О. Н. Каплина // Ветеринария Кубани. – 2018. – № 4. – С. 19–24.
3. Каплин, В. С. IgY-технологии. Желточные антитела птиц / В. С. Каплин, О. Н. Каплина // Биотехнология. – 2017. – Т. 33, № 2. – С. 29–40.
4. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: a review / E.P.V. Pereira [et al.] // Int. Immunopharmacol. – 2019. – № 73. – P. 293–303.
5. Egg yolk IgY antibodies : a therapeutic intervention against group A rotavirus in calves / C. Vega [et al.] // Res. Vet. Sci. – 2015. – № 103. – P. 1–10.
6. Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion / P. B. Conlon [et al.] // Nature Microbiology. – 2016. – P. 1–7.
7. Production of Egg yolk immunoglobulin against *Escherichia coli* from White Leghorn and Lohmann chickens / J. F. Liou [et al.] // Journal of Animal and Veterinary Advances. – 2011. – Vol. 10, № 18. – P. 2349–2356.

УДК 619:57.083.35

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-31-39>**Борисовец Д.С.**, кандидат ветеринарных наук, доцент¹**Зуйкевич Т.А.**, кандидат сельскохозяйственных наук¹**Згировская А.А.**, кандидат биологических наук¹**Красочко П.А.**, доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор²**Осипенко А.Е.**, младший научный сотрудник¹¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск²УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСОВАРИАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ СОЗДАНИИ НОВЫХ ВЕТЕРИНАРНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ

Резюме

В статье предложены способы получения трансвариальных иммуноглобулинов для создания ветеринарных биопрепаратов нового поколения. В процессе исследований определен наиболее эффективный метод выделения трансвариальных иммуноглобулинов – с использованием органических растворителей, а также наиболее оптимальный способ их очистки путем осаждения с использованием ПЭГ-6000, позволяющий получить максимальный результат при сравнительно небольших затратах. Представлены результаты исследования структурных и функциональных особенностей полученных желточных иммуноглобулинов кур-несушек IgY в сравнительном аспекте.

Ключевые слова: трансвариальные иммуноглобулины, биопрепараты, животные, антитела, штаммы вирусов и бактерий.

Summary

The methods of obtaining of transovarial immunoglobulins for the development of veterinary biological preparation of a new generation are shown in the article. In the process of the research, the most effective method of isolating of transovarial immunoglobulins was determined - the method using organic solvents, and also the most optimal way to purify them by precipitation using PEG-6000, which allows to obtain the maximum result at relatively low cost. The results of the study of structural and functional features of the obtained yolk immunoglobulins of laying hens IgY in a comparative aspect are presented.

Keywords: transovarian immunoglobulins, biological products, animals, antibodies, strains of viruses and bacteria.

Поступила в редакцию 18.10.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день одним из перспективных направлений при разработке новых ветеринарных препаратов является применение специфических иммуноглобулинов, способных образовывать комплексы антиген-антитело с наиболее распространенными возбудителями энтеритов с последующей их нейтрализацией и выведением из организма [1].

Наиболее изученным классом иммуноглобулинов у млекопитающих является иммуноглобулин класса G (IgG). Его молекулярная структура и функции хорошо изу-

чены. В середине XX века птичьи иммуноглобулины обозначались также IgG. Но в настоящее время известно, что птичьи иммуноглобулины 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 сопоставима 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 [2].

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 [3, 4, 5, 6].

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 птиц значительно ниже, чем на содержание крупных млекопитающих (лошадей, ослов, мулов, коров), часто

используемых для пассивной иммунизации.

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

Целью данной работы является получение трансвариальных иммуноглобулинов и изучение их структурных и функциональных особенностей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

При работе над получением трансвариальных иммуноглобулинов использовали 10 кур-несушек в возрасте 120–160 дней, которых разделили на 2 группы (опытную и контрольную) по 5 птиц в каждой. Куры были подвергнуты гипериммунизации по ранее отработанной схеме, включающей введение вирусных антигенов с адьювантом Montanide IMS 1313 VG в дозе 0,5 см³ внутримышечно в область грудной мышцы четырехкратно с интервалом 10–14 суток.

В качестве антигенов для гипериммунизации кур использованы следующие штаммы:

- штамм вируса диареи крупного рогатого скота «КМИЭВ-V120», депонированный в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» (РНК-содержащий, представлен 1-нитевой РНК). Вирус использован в виде вирусосодержащей взвеси, полученной в перевиваемой культуре клеток почки эмбриона крупного рогатого скота MDBK с инфекционным титром 6,5 Ig ТЦД₅₀/мл;

- штамм вируса диареи крупного рогатого скота «КМИЭВ-V120» – РНК-содержащий, представлен 1-нитевой РНК. Ис-

пользован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром 6,5 Ig 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 1-цепочечную несегментированную полиаденилированную РНК. Использован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром 5,25 Ig ТЦД₅₀/мл. Вирус поддерживали в серийных пассажах и титровали на культуре клеток MDBK;

- штамм вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота «КМИЭВ-V122» – ДНК-геномный, содержит непрерывную линейную 2-спиральную ДНК. Использован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром 6,75 Ig ТЦД₅₀/мл. Вирус поддерживали в серийных пассажах и титровали на культуре клеток MDBK;

- штамм ротавируса крупного рогатого скота «КМИЭВ-116» – РНК-содержащий, диаметр вириона 70–75 нм, нуклеиновая кислота представлена 11 сегментами 2-нитевой РНК. Использован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром 7,0 Ig ТЦД₅₀/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 бактериальных клеток – 500 млн/мл. Среда культивирования – бульон Хоттингера.

Штаммы вирусов и бактерий инактивированы формалином в концентрации 0,2 % и смешаны в соотношении 1:1:1:1.

Первым этапом выделения иммуноглобулинов IgY из желтка яиц было отделение липидных компонентов желтка (липидов и липопротеинов).

Для определения наиболее эффективного способа получения водорастворимой IgY-содержащей фракции из яичных желтков было использовано 3 основных метода удаления липидов:

1) С использованием органических растворителей. Для этой цели была изготовлена органическая смесь следующего состава: хлороформ + этанол + 2-пропанол + фосфатно-солевой буфер (ФСБ) + этилацетат, взятые в процентном (v/v) соотношении 21,6:6,5:36:18:18 соответственно. Процедура выделения выполнялась с соблюдением правил асептики. Куриные яйца промывали водой и обрабатывали изопропиловым спиртом. Яичную скорлупу вскрывали, отделяли желток от белка и помещали на фильтровальную бумагу. Перекатывая желток на бумаге, максимально удаляли остаток белка. Затем оболочку желтка прокалывали ланцетом или кончиком пипетки, и желток помещали в пробирку вместимостью 50 мл. К желтку добавляли смесь 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 центрифугировали при 2500 об/мин в течение 20 мин.

2) С использованием 3,5%-ного полиэтиленгликоля [5]. Эквивалентный объем буфера (0,01 М фосфат натрия, 0,1 М NaCl, pH 7,5) добавляли к желтку и перемешивали. Твердый полиэтиленгликоль-6000 (Sigma) добавляли до концентрации 3,5 %, перемешивали до полного его растворения и образовавшийся осадок белка осаждали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант фильтровали через фильтровальную бумагу и декантировали в другую пробирку для центрифугирования и дальнейшей очистки IgY.

3) Комбинированный метод в соответствии с [5, 7]. Яичный желток разбавляли 1:2 дистиллированной водой, гомогенизировали в течение 30 с и пропускали через фильтровальную бумагу. Смесь перемешивали с двумя объемами декстрана в концентрации 0,01 %. Полученную смесь оставляли на 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант пропускали через фильтровальную

бумагу и декантировали в другие пробирки для центрифугирования. Для полного удаления липида к надосадочной жидкости добавляли 3,5 % ПЭГ-6000 и перемешивали до растворения. Смесь центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 мин, чтобы осадить остаточный осадок липопротеина. Супернатант пропускали через фильтровальную бумагу для удаления остатков липидов и декантировали в другую центрифужную пробирку для дальнейшей очистки IgY.

На втором этапе было необходимо определить наиболее оптимальный метод очистки иммуноглобулинов от водорастворимой фракции желтка яиц. Для этого было апробировано 3 метода: осаждение, хроматографический метод и ультрафильтрация.

Для выполнения метода осаждения верхнюю водорастворимую фазу желтка яиц отбирали шприцем, переносили в чистые пробирки вместимостью 50 мл с последующим добавлением 2 объемов ФСБ. Для приготовления ФСБ навеску $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ массой 2,689 г помещали в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяли в 600 мл дистиллированной воды. Затем, последовательно растворяя, вносили в эту же колбу навеску $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ массой 0,388 г и навеску NaCl массой 5,852 г. Объем раствора доводили до метки дистиллированной водой. Далее в пробирку вносили 12 % (w/v) сухого измельченного ПЭГ-6000 и интенсивно перемешивали до полного растворения. Через 20 мин precipитирующие иммуноглобулины осаждали центрифугированием при 2500 об/мин в течение 20 мин. Супернатант декантировали. Осадок растворяли в ФСБ в объеме, равном первоначальному объему желтка.

Для проведения гидрофобной хроматографии водный супернатант желтка яиц вносили в колонку с фенил-сефарозой CL-4B (Sigma) 2 мг белка/мл геля. Для удаления несвязанного материала колонку промывали физиологическим раствором с фосфатным буфером (ФБР, разбавленный 1/10 дистиллированной водой). Элюирование проводили деминерализованной водой.

Элюированные белки подвергали замораживанию при температуре минус 20 °С.

Для проведения последующей гель-фильтрации белки ресуспендировали в ФБР, содержащем 0,02 % NaN_3 , пропускали через мембранный фильтр 0,2 мкм и вносили в колонку, содержащую Сефарил S-300 Superfine (Sigma), уравновешенную ФБР+0,02 % NaN_3 . В результате была собрана фракция белка с молекулярной массой 175 кДа.

Ультрафильтрацию проводили с использованием мембран XM 300 кДа, PM 30 кДа или YM 100 кДа для разделения водорастворимой фракции иммуноглобулинов по молекулярному весу 300, 30 и 100 кДа соответственно. Ультрафильтрация проводилась при температуре плюс 4–6 °С.

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

Наличие птичьих иммуноглобулинов (IgY) во фракции выделяемых иммуноглобулинов определяли прямым методом иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA) с использованием коммерческих кроличьих антикуриных IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена. Анализ проводили следующим образом: микротитрующие планшеты на 96 лунок покрывали иммуноглобулинами путем последовательного разведения фракции иммуноглобулинов каждого образца с шагом, равным 2, в карбонатно-бикарбонатном буфере (100 мМ) при pH 9,6. Планшеты выдерживали в течение ночи при температуре плюс 4 °С. Далее планшеты трижды промывали фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,1%-ный раствор (w/v) детергента Tween 20. Для блокировки неспецифической сорбции кроличьих конъюгатов IgG использовался 1%-ный раствор БСА. Связавшиеся конъюгаты проявляли тетраметилбензидином в присутствии перекиси водорода.

Оптические плотности ферментативной реакции регистрировали при 450 нм.

Далее для решения поставленной задачи были проведены исследования структурных и функциональных особенностей трансвариальных иммуноглобулинов в сравнительном аспекте полученных желточных иммуноглобулинов кур-несушек IgY и иммуноглобулинов кроликов IgG.

Для получения иммуноглобулинов класса Y (IgY) куры-несушки в возрасте 120–160 дней (4 птицы) были подвергнуты гипериммунизации по схеме, включающей введение антигена вируса диареи (штамм «КМИЭВ-V120», депонированный в музее штаммов микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского»), инактивированного формалином в 0,2%-ной концентрации, эмульгированного в масляном адьюванте, в дозе 0,5 см³ внутримышечно в область грудной мышцы четырехкратно с интервалом 10–14 суток.

Для получения иммуноглобулинов класса G (IgG) 4 кроликов живой массой 2,5–3,0 кг иммунизировали по аналогичной схеме внутримышечно в область бедра.

Через 14 дней после последней иммунизации у кроликов отбирали пробы крови, у кур-несушек – пробы крови и яйца с целью получения иммуноглобулинов классов G и Y соответственно. При этом оценивали показатель интенсивности накопления иммуноглобулинов в крови кроликов в сравнении с уровнем накопления в яйцах и крови кур-несушек. Степень накопления специфических антител определяли в реакции нейтрализации.

Для получения из желтка яиц IgY было проведено отделение липидных компонентов желтка (липидов и липопротеинов). Получение водорастворимой IgY-содержащей фракции из яичных желтков проводили методом удаления липидов с использованием органических растворителей.

Дальнейшее изучение при получении препаратов на основе трансвариальных иммуноглобулинов для молодняка крупного рогатого скота должно учитывать высушивание яичных желтков при температуре плюс 70–90 °С, а также пероральное применение готового препарата, предполагающее воздействие на него аг-

рессивных сред желудка (соляной кислоты и протеолитических ферментов).

В связи с этим были изучены структурные и функциональные особенности трансвариальных иммуноглобулинов под влиянием температуры, pH и протеолитических ферментов в сравнении с иммуноглобулинами млекопитающих, а также влияние на них стабилизаторов (сорбитола, каррагинана, глюкозы, маннита и др.).

Для оценки влияния pH среды готовили 0,2%-ный раствор IgY на забуференном растворе натрия хлорида. В качестве стабилизаторов к раствору IgY добавляли растворы D-сорбитола, каппа-каррагинана, D-глюкозы, D-маннита, микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) в 30%-ной концентрации; pH среды доводили с помощью раствора соляной кислоты от 2 до 7. Полученный раствор инкубировали при температуре плюс 37 °С. После инкубации при каждом pH раствор нейтрализовали с помощью ФБР, содержащий 0,05%-ный Твин 20. После этого изучали активность IgY.

Для изучения влияния температуры раствор IgY (концентрация 1 мг/мл) нагревали при температурах плюс 50, 60, 70, 80 или 90 °С на водяной бане в течение 30 мин в присутствии D-сорбитола, каппа-каррагинана, D-глюкозы, D-маннита и МКЦ в концентрации 30 %. Активность IgY изучали в реакции нейтрализации.

Влияние протеолитических ферментов на IgY (концентрация 1 мг/мл) проводили при осторожном встряхивании (температура плюс 37 °С). Иммуноглобулины IgY разбавляли в 0,2 М-ацетатном буфере (pH 2,5) для пепсина и 0,2 М-Трис-НСl-буфере (pH 7,5) – для трипсина в присутствии D-сорбитола, каппа-каррагинана, D-глюкозы, D-маннита и МКЦ в концентрации 30 %, а также с добавлением желтка и белка яиц. Конечное соотношение по массе фермента к субстрату – 1:20. Расщепление пепсином проводили при температуре плюс 37 °С в течение 2 ч, трипсином – в течение 4 ч при той же температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М трисоснования или фенолметилсульфонилфторида в изопропанол для пепсина и трипсина соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты исследований по получению водорастворимой IgY-содержащей фракции из яичных желтков с использова-

нием методов обработки органическими растворителями с использованием 3,5%-ного полиэтиленгликоля и комбинированным методом представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Средний выход иммуноглобулинов из желтков гипериммунизированных кур при различных способах выделения

Показатель	Метод выделения иммуноглобулинов		
	с использованием органических растворителей	с использованием 3,5%-ного полиэтиленгликоля	комбинированный метод
Средний выход иммуноглобулинов из 1 желтка, мг	87,5	63,8	74,2

По данным таблицы 1 наиболее эффективным способом выделения иммуноглобулинов является метод с использованием органических растворителей, позволяющий получить средний выход иммуноглобулинов из 1 яйца на уровне 87,5 мг.

Результаты исследований по апробированию метода осаждения, хроматографического метода и ультрафильтрации с целью очистки иммуноглобулинов из водорастворимой фракции желтка яиц представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Средняя концентрация протеинов (мг/мл) из желтков яиц гипериммунизированных кур при использовании различных способов очистки трансвариальных иммуноглобулинов

Показатель	Методы очистки иммуноглобулинов		
	осаждение	хроматография	ультрафильтрация
Средняя концентрация иммуноглобулинов, мг/мл	18,1±0,15	18,8±0,4	20,0±0,7

По данным, представленным в таблице 2, при использовании менее дорогостоящего и трудозатратного метода осаждения средняя концентрация протеинов (трансвариальных иммуноглобулинов) на уровне 18,1±0,15 мг/мл не имела значимых различий в сравнении с хроматографическим методом (18,8±0,4 мг/мл) и ультра-

фильтрацией (20,0±0,7 мг/мл), что позволяет рекомендовать данный способ для использования в технологии производства трансвариальных иммуноглобулинов.

Результаты изучения интенсивности накопления иммуноглобулинов в крови кроликов, крови и яйце кур-несушек представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Интенсивность накопления иммуноглобулинов в крови кроликов, крови и яйце кур-несушек

Группа животных	Биологический материал	Титры антител в РН, log ₂	
		до иммунизации	через 14 дней после последней иммунизации
Опытная группа (куры-несушки)	кровь	0	5,9±0,1*
	яйцо	0	4,8±0,25*
Опытная группа (кролики)	кровь	1,67±0,33	5,67±0,33*
Контрольная группа (куры-несушки)	кровь	0	0
	яйцо	0	0
Контрольная группа (кролики)	кровь	2,0±0	1,67±0,33

Примечание – *P≤0,001

По данным таблицы 3 применение разработанной схемы гипериммунизации приводило к достоверному ($P \leq 0,001$) увеличению титров специфических антител в организме иммунизированных кроликов и кур-несушек. При этом следует отметить, что уровень антител в крови и яйце кур-несушек ($5,9 \pm 0,1 \log_2$ и $4,8 \pm 0,25 \log_2$ соответственно) не имел достоверных различий в сравнении с данным показателем в организме кроликов ($5,67 \pm 0,33 \log_2$).

Из полученных в ходе опыта данных можно также сделать вывод о прямой

взаимосвязи между уровнем IgY к антигену в крови иммунизированных кур и полученных от них яйцах, при этом наблюдаются индивидуальные различия в титре антител, которые являются хорошим индикатором ожидаемой передачи этих антител потомству. Таким образом, уровень антител IgY яичного желтка к специфическим антигенам также является хорошим индикатором как титра антител у самок, так и передачи материнских антител потомству. Результаты оценки влияния pH среды на активность IgY представлены в таблице 4.

Таблица 4. – Влияние pH среды на активность IgY, полученных при гипериммунизации кур-несушек

Образец	Активность IgY, %					
	pH среды					
	2	3	4	5	6	7
IgY+D-сорбитол	60,4	63,8	69,6	84,6	95,4	100
IgY+каррагенан	59,5	63,2	68,4	83,4	95,2	100
IgY+D-глюкоза	10,3	45,8	72,6	87,1	95,8	98,8
IgY+D-маннит	7,8	35,0	48,7	78,5	96,7	98,9
IgY+МКЦ	11,3	46,6	54,7	76,3	93,4	99,6
IgY без стабилизатора	5,3	16,8	35,9	63,9	69,6	93,6

Из данных таблицы 4 видно, что наиболее интенсивное снижение активности IgY происходит при значениях pH от 2 до 4, при этом активность IgY падает на 64,1–94,7 %. Добавление стабилизаторов в 30%-ной концентрации позволяет повысить сохранность антител класса Y при агрес-

сивном воздействии кислой среды на 2,5–55,1 %. При этом наиболее высокие результаты получены при использовании в качестве стабилизатора D-сорбитола.

Результаты изучения влияния температуры на активность IgY представлены в таблице 5.

Таблица 5. – Влияние температуры на активность IgY, полученных при гипериммунизации кур-несушек

Образец	Активность IgY, %				
	температура, °C				
	50	60	70	80	90
IgY+D-сорбитол	100	95,8	78,9	6,8	2,3
IgY+каррагенан	92	78,2	32,4	3,2	0
IgY+D-глюкоза	100	84,6	72,6	3,4	0,2
IgY+D-маннит	95,3	73,9	16,5	3,6	0
IgY+МКЦ	98,6	74,0	20,3	5,6	0,3
IgY без стабилизатора	57,5	55,2	18,9	0,2	0

Данные таблицы 5 свидетельствуют о наиболее интенсивном снижении активности IgY при воздействии высоких температур (выше 70 °C). Активность IgY падает при этом на 81,1–100 %. Добавление стабилизаторов позволяет повысить сохранность антител класса Y при воздействии высоких температур на 13,5–60 %. При этом наиболее высокие результаты получены при использовании в качестве стаби-

лизаторов D-сорбитола и D-глюкозы, позволяющих сохранить активность IgY до 72,6–78,9 % при температуре 70 °C. При более высоких температурах активность IgY даже при добавлении стабилизаторов значительно снижается – на 93,2–96,8 %.

Результаты изучения влияния протеолитических ферментов на активность IgY представлены в таблице 6.

Таблица 6. – Влияние протеолитических ферментов на активность IgY, полученных при гипериммунизации кур-несушек

Образец	Активность IgY, %	
	ферменты	
	пепсин	трипсин
IgY+D-сорбитол	5,3	85,6
IgY+каррагенан	4,1	87,3
IgY+D-глюкоза	5,1	89,6
IgY+D-маннит	2,3	80,1
IgY+МКЦ	7,3	80,4
IgY+белок и желток яиц	39,5	100
IgY без стабилизатора	2,3	75,3

Результаты, представленные в таблице 6, показали, что под действием протеолитических (пищеварительных) ферментов наиболее интенсивное снижение активности IgY (на 92,7–97,7 %) происходит под влиянием пепсина, под воздействием трипсина этот показатель снижается только на 10,4–24,7 %.

При этом стоит отметить, что в сравнении с полисахаридами наиболее оптимальным является белоксодержащий стабилизатор на основе белка и желтка яиц, применение которого позволяет повысить сохранность антител IgY при воздействии пепсина и трипсина на 60,5 и 100 % соответственно.

ВЫВОДЫ

1. Наиболее эффективным методом выделения трансвариальных иммуноглобулинов является метод с использованием органических растворителей, позволяющий получить средний выход иммуноглобулинов из 1 яйца на уровне 87,5 мг, а наиболее оптимальным – способ их очистки путем осаждения с использованием ПЭГ-6000, позволяющий получить среднюю концентрацию протеинов (трансвариальных иммуноглобулинов) на уровне 18,1±0,15 мг/мл.

2. Установлена прямая взаимосвязь между уровнем IgY к антигену в крови иммунизированных кур и полученных от

них яйцах, при этом наблюдаются индивидуальные различия в титрах антител, которые являются индикатором ожидаемой передачи этих антител потомству.

3. Добавление стабилизаторов в 30%-ной концентрации позволяет повысить сохранность антител класса Y при агрессивном воздействии кислой среды на 2,5–55,1 %. Наиболее высокие результаты (60,4–100 %) получены при использовании в качестве стабилизатора D-сорбитола.

4. Использование стабилизаторов повышает сохранность антител класса Y

при воздействии высоких температур на 13,5–60 %, при этом оптимальными стабилизаторами являются D-сорбитол и D-глюкоза, позволяющие сохранить активность IgY на уровне 72,6–78,9 % при температуре 70 °C.

5. В сравнении с полисахаридами при воздействии пепсина и трипсина оптимальным является белоксодержащий стабилизатор на основе белка и желтка яиц, применение которого позволяет повысить сохранность антител IgY на 60,5 и 100 %.

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. Shofiqur Rahman, Faustino C. Icatlo and Nguyen Van Sa. // *Austin J. Clin. Med.* – 2014. – Vol. 1, № 3. – 1012 p.
3. Klimentzou, P. Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha / P. Klimentzou [et al.] // *Peptides*. – 2006. – Vol. 27. – P. 183–193.
4. Pauly, D. 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. – P. 281–290.
5. Polson, A. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens / A. Polson, M. B. von Wechmar, M. H. van Regenmortel // *Immunol. Commun.* – 1980. – Vol. 9. – P. 475–493.
6. Witkowski, P. T. Gene gun-supported DNA immunisation of chicken for straightforward production of poxvirus-specific IgY antibodies / P. T. Witkowski [et al.] // *Immunol. Methods*. – 2009. – Vol. 341. – P. 146–153.
7. Hatta, H. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, «IgY» / H. Hatta, M. Kim, T. Yamamoto // *Agricultural and biological chemistry*. – 1990. – Vol. 54, № 10. – P. 2531–2535.

ПРЕПАРАТ
ВЕТЕРИНАРНЫЙ

РЕСПИФАГ



для лечения и профилактики респираторных заболеваний молодняка крупного рогатого скота, вызванных клебсиеллами

изготовлен из клебсиеллезного бактериофага (штамм «КМИЭВ-V142») и вспомогательных веществ



WWW.BIEVM.BY

УДК 619:616-078:637.12.05-619:616.5-002.525
<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-40-53>

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹
 Кучвальский М.В., аспирант²
 Красникова Е.Л., научный сотрудник¹
 Якобсон Е.И., магистрант²

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

²Белорусский государственный университет, г. Минск

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ ЛИМФОСАРКОМЫ С ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Резюме

В клетках тканей козы, павшей с признаками лимфосаркомы (резкая гиперплазия лимфатических узлов и селезенки, позитивная РИД с антигеном для диагностики лейкоза – FLK-BLV – bovine leukemia virus), обнаружена ДНК и антигены микобактерий туберкулеза (МБТ). Скрытая туберкулезная инфекция подтверждена выделением из деконтаминированных и профильтрованных через стерилизующий фильтр гомогенатов лимфатических узлов и селезенки некислоустойчивых МБТ (с дефектной клеточной стенкой – cell wall deficient – CWD). В популяциях CWD МБТ из лимфосаркоматозных тканей присутствовал ряд характерных разновидностей клеток, которые ранее были обнаружены в изолятах из крови туберкулинпозитивной козы этого же стада, из лимфатического узла BLV-серопозитивной коровы и непосредственно из FLK-BLV.

В изолятах лимфосаркоматозных тканей, наряду с антигенами МБТ, обнаружены антигены, реагирующие с антителами к BLV и имевшие такую же молекулярную массу, как и антигены BLV, что свидетельствовало о существовании связи вирусоподобных форм МБТ с онкогенезом.

Ключевые слова: измененные формы микобактерий, латентный туберкулез, дефектная клеточная стенка, онкогенез, лимфосаркоматоз.

Summary

DNA and antigens of mycobacteria tuberculosis (MBT) were detected in the cells of the tissues of a goat that fell with signs of lymphosarcoma (sharp hyperplasia of the lymph nodes and spleen, a positive AGID with an antigen or the diagnosis of leukemia - FLK - BLV - bovine leukemia virus). Latent tuberculosis infection was confirmed by the isolation of non-acid - fast MBT (cell wall-cell wall deficient - CWD) from decontaminated and filtered through a sterilizing filter of lymph node and spleen homogenates. In the populations of CWD MBT from lymphosarcomatous tissues a number of characteristic cell varieties were present which were previously found in isolates from the blood of a tuberculin-positive goat of the same herd, from the lymph node of a BLV-seropositive cow and directly from FLK-BLV.

In the isolates of lymphosarcomatous tissues along with MBT antigens, antigens that reacted with antibodies to BLV and had the same molecular weight as BLV antigens were found, which indicated the existence of a connection between virus-like forms of MBT and oncogenesis.

Keywords: altered mycobacterial forms, latent tuberculosis, deficient cell wall, oncogenesis, lymphosarcomatosis.

Поступила в редакцию 06.08.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Стада крупного рогатого скота, в которых обнаруживают животных, инфицированных вирусом лейкоза (bovine leukemia virus – BLV), встречаются по всему миру. В США инфицирование коров BLV зарегистрировано почти в 100 % крупных молочных стад [1].

Широкое распространение лейкоза

и тот факт, что в крови и в молоке инфицированных особей постоянно присутствуют лимфоциты, содержащие BLV [2, 3], вызывали необходимость изучения риска передачи BLV людям.

Исследования 1975–1979 годов по обнаружению у людей антител к антигенам BLV в реакции иммунодиффузии (РИД) не нашли серологических доказа-

тельств того, что BLV может заразить человека [4]. Использование иммуноблоттинга, который появился позже и имел чувствительность почти в 100 раз большую, чем РИД [5], позволило обнаружить в крови 39 % обследованных людей антитела к капсидному белку BLV p24 [6]. В дальнейшем с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), ПЦР *in situ* и иммуногистохимического (ИНС) тестирования геном и протеины BLV были обнаружены в тканях молочной железы женщин [7] и установлена связь инфицирования BLV с развитием рака молочной железы [8, 9]. Проблема тем не менее остается спорной, так как в ряде исследований такой связи не найдено [10].

Этиология рака молочной железы интенсивно изучалась еще в XX веке. В частности, было установлено, что почти в 100 % случаев из опухолей молочной железы можно выделить неокислостойчивые (с дефектной клеточной стенкой – *cell wall deficient* – CWD) микобактерии туберкулеза (МБТ) [11]. Недавно установлено, что CWD МБТ определенным образом связаны с BLV [12, 13]. В культуральной жидкости клеток почки эмбриона овцы, инфицированных BLV (FLK-BLV), были обнаружены кислотоустойчивые и CWD формы микобактерий и выделены CWD МБТ, вызывавшие у морских свинок образование антител, реагирующих с FLK-BLV. Более того, CWD МБТ были выделены из культуральной жидкости FLK-BLV, фильтрованной через стерилизующий фильтр, что указывало на присутствие в ней вирусоподобных форм МБТ. Идентичные культуры были выделены из фильтрованных сывороток крови и гомогенатов лимфатических узлов серопозитивных (BLV+) коров. Полученные результаты позволили предположить, что BLV может быть вирусоподобной формой МБТ. Безусловно, это требует подтверждения, в частности, по триаде Коха этиологический агент должен выделяться при всех случаях данного заболевания. В связи с этим **целью исследований** было изучение возможной связи лимфосаркомы у козы со скрытой туберкулезной инфекцией. Известно, что BLV может вызвать заболевание у

коз. В 70-х годах XX века болезнь была воспроизведена введением козе овечьих лимфоцитов, зараженных BLV. Через 8 лет животное пало от лимфосаркомы. Опухоли локализовались в лимфатических узлах брыжейки, сальнике, в ретробульбарных тканях. Результаты молекулярной гибридизации подтвердили, что лимфосаркома была индуцирована BLV [14]. Вместе с тем, позже были получены данные о существовании особого сероварианта BLV, к которому восприимчивы овцы и козы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали сыворотку крови, лимфатические узлы и селезенку павшей 5-летней козы.

Окраска мазков-отпечатков тканей. Мазки-отпечатки готовили общепринятым методом. Эндогенную пероксидазу (ЭП) инактивировали 3%-ной H_2O_2 и обработкой 96%-ным этанолом. Мазки окрашивали по Kinyoun с последующей иммунопероксидазной окраской (дифференцирующая иммунопероксидазная – ДИП-окраска), при которой кислотоустойчивые (КУ) микобактерии окрашиваются в красный, неокислостойчивые (НКУ) CWD МБТ и антигены МБТ – в коричневый с оттенками, немикобактериальная микрофлора и ткани – в синий цвет [15].

Для ДИП-окраски использовали:

- аффинно-очищенные Ig из антисыворотки к соникату *M. bovis* (истощенной смесью инактивированной нетуберкулезной микрофлоры);

- антисыворотку к изоляту из культуральной жидкости FLK-BLV серии 30 (Is CWD МБТ FLK-BLV с.30), 1:40;

- антисыворотку к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, 1:40;

- с экспозицией 90–100 мин.

На мазки на 60 мин наносили конъюгат антител к IgG кролика с пероксидазой (Sigma), на 15 мин – субстратный раствор ДАБ (10 мг 3,3'-диаминобензидина «Fluka» в 2 мл ДМСО, 10 мл дистиллированной воды с 20 мкл 33%-ной H_2O_2). После каждого этапа мазки промывали водой с твином 20 (0,05 %). Контролем инактивации

ции ЭП служили мазки, окрашенные по Kinyoun и обработанные субстратным раствором ДАБ.

Микроскопию проводили на микроскопе Olimpus B51X.

Посев тканей лимфатических узлов и селезенки. Гомогенаты тканей центрифугировали при 500 g для осаждения крупных фрагментов. Надосадочную жидкость делили на 2 части. К первой части добавляли равный объем 6%-ной щавелевой кислоты и центрифугировали при 3000g 15 мин, часть осадка суспендировали в стерильном 0,9%-ном растворе NaCl и высевали на пробирки со средой Гельберга. Вторую часть осадка суспендировали в стимуляторе роста ВКГ (1:3) [16, 17], инкубировали 24 ч при температуре 37 °С и высевали на пробирки со средой MucCel DW.

Часть гомогенатов, освобожденных от крупных частиц, последовательно пропускали через фильтры Millex® GP 0.45 µm и 0.22 µm. Фильтраты (0.22 µm) смешивали со стимулятором роста ВКГ (1:3), инкубировали 24 ч при температуре 37 °С и высевали на пробирки со средой MucCel DW. Посевы инкубировали при температуре 37 °С. При отсутствии признаков роста через 1-2 дня делали «слепые» пересевы на среду MucCel DW. При появлении колоний делали мазки, которые окрашивали по Kinyoun и ДИП-методом.

ПЦР. Для выделения ДНК гомогенаты и бактериальную массу изолятов (0,2–0,5 мг/мл) прогревали (5 мин, 95 °С) в лизирующем буфере. ДНК выделяли на колонках с сорбентом (ИБОХ НАНБ) и исследовали с праймерами Mucobacteria: 16s RNA, MPB64, MPB 70, dev, а также Is 6110 в ПЦР-РТ. Амплификацию проводили на C1000TM ThermoCycler (BioRad) и CFX96™ Real-Time System (BioRad). Продукты амплификации детектировали в электрофорезе в 2%-ной агарозе (Sigma), результаты учитывали на Molecular Imager GelDoc™ XR+ (BioRad).

Сыворотку крови павшей козы получили центрифугированием сгустков крови из сердца. Антитела к BLV в сыворотке определяли РИД (OIE Manual, 2012) с ан-

тигеном для диагностики бычьего лейкоза (AgFLK-BLV) ООО «ТМ».

Антигенный состав изолятов изучали в РИД, в ракетном иммуноэлектрофорезе (РИЭФ, Axelsen N. et al.1977), в электрофорезе ПААГ-ДСН (Laemmli, 1970) с последующим иммуноблоттингом, в непосредственном иммуноферментном анализе (ИФА) с использованием соникатов, полученных дезинтеграцией бактериальной массы изолятов ультразвуком (Bandelin Sonopuls 2400). В исследованиях использовали кроличьи антисыворотки к соникатам типичных штаммов *M. tuberculosis* H₃₇Rv и *M. bovis* 8, к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, к изоляту CWD МБТ из культуральной жидкости FLK-BLV серии 30, к изоляту CWD МБТ из культуральной жидкости FLK-BLV серии НС, фильтрованной через фильтр Millex® GP 0.22 µm, к культуральной жидкости FLK-BLV (AgFLK-BLV), а также 4 сыворотки крови BLV+ коров, 2 сыворотки волов, сенсibilизированных *M. avium* 1603 и *M. bovis* 8, 4 сыворотки здорового крупного рогатого скота.

Лекарственную чувствительность изолятов определяли в диффузионном тесте на среде MucCel DW с использованием стандартных дисков с антибиотиками (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера). Для изучения изменения морфологии изолятов под действием антибиотиков делали мазки с границы зоны задержки роста, которые окрашивали по Kinyoun.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

У павшей козы обнаружена резкая гиперплазия лимфатических узлов (особенно брыжеечных) и селезенки (рисунок 1), что было характерно для лимфосаркомы.

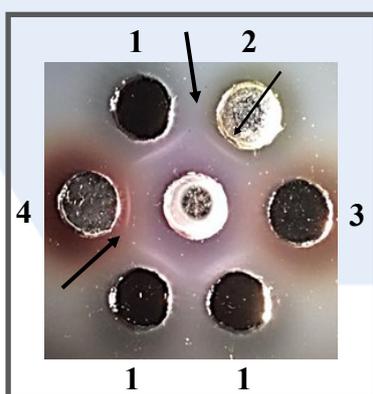
Сыворотка крови козы реагировала в РИД с антигеном FLK-BLV, образуя линию преципитации, идентичную линии положительной сыворотки коровы, больной лейкозом (рисунок 2, позиция 2, стрелка). Интересно, что такая же линия образовывалась с антисывороткой к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv (рисунок 2, позиция 4, стрелка).



Рисунок 1. – Гиперплазия бронхиального, брыжеечного лимфатического узла и селезенки

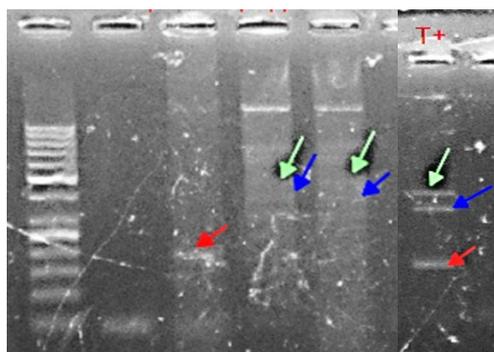
В ПЦР ДНК из гомогенатов лимфатических узлов и селезенки козы реагировала с праймерами *Mycobacteria* 16sRNA, MPB70, MPB64 (рисунок 3, таблица 1). В

ПЦР-RT с праймерами Is 6110 положительный результат получен только с ДНК из гомогената селезенки (рисунок 4, таблица 1).



1 – сыворотка павшей козы; 2 – сыворотка коровы, больной лейкозом; 3 – отрицательная сыворотка; 4 – антисыворотка к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv

Рисунок 2. – РИД с антигеном FLK-BLV (в центральной лунке)



Слева-направо: маркер молекулярной массы (м.м.); отрицательный контроль; бронхиальный лимфоузел; брыжеечный лимфоузел; селезенка; T+ – положительный контроль

Рисунок 3. – Результат ПЦР ДНК гомогенатов тканей козы с праймерами *Mycobacteria* 16s RNA (зеленые стрелки), MPB70 (синие стрелки), MPB 64 (красные стрелки)

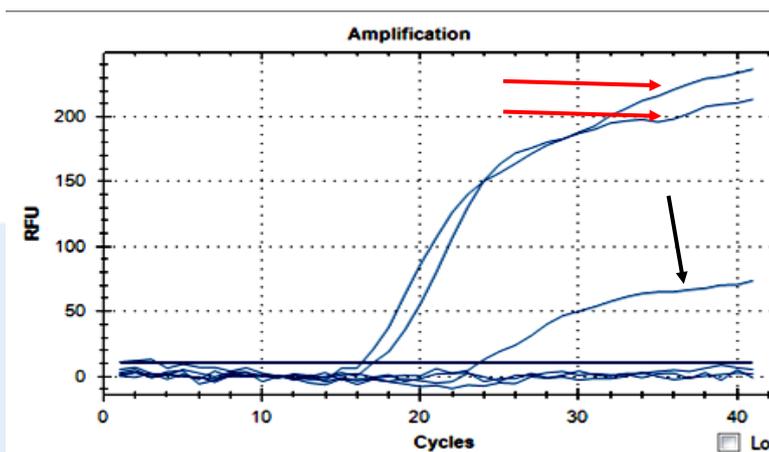
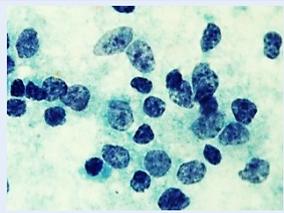
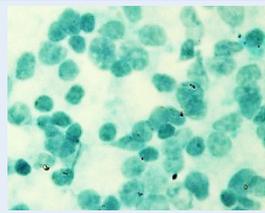
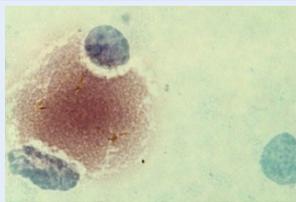
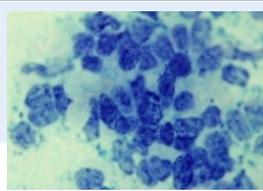
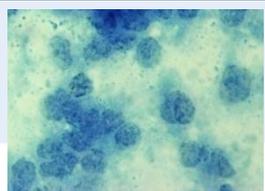
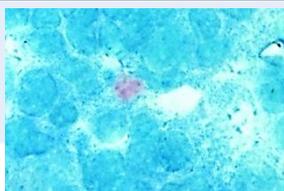
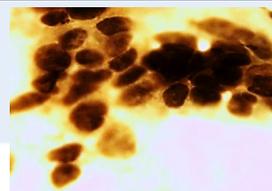
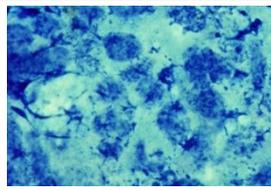
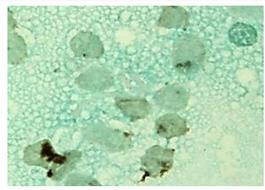
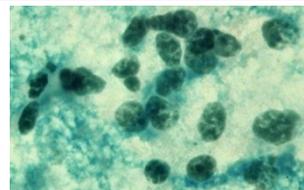


Рисунок 4. – ПЦР-RT с праймерами Is 6110. Черная стрелка – положительная реакция с ДНК из селезенки, красные стрелки – положительные контроли К+

При ДИП-окраске в контрольных мазках тканей все клетки были синего цвета, что указывало на полную инактивацию

ЭП и позволяло корректно оценивать появление специфической коричневой окраски при использовании антител (таблица 1).

Таблица 1. – Результаты ДИП-окраски мазков и ПЦР тканей

Контроль инактивации ЭП	g из a/c к <i>M. bovis</i>	a/c к CWD МБТ FLK-BLV с.30	a/c к CWD <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv
Селезенка, ПЦР – 16sRNA+, MPB70+, Is 6110+			
			
Бронхиальный лимфатический узел, ПЦР – MPB64+			
			
Брыжеечный лимфатический узел, ПЦР – 16sRNA+, MPB70+			
			

С помощью очищенных антител к *M. bovis* (Ig a/c к *M. bovis*) клетки с коричневыми и черными включениями (антигены МБТ) были выявлены в селезенке и в брыжеечном лимфатическом узле (таблица 1). Кроме того, в селезенке обнаружены черно-коричневые коккоиды, похожие на зерна Муха (рисунок 5).

Специфическую черно-коричневую окраску давали клетки селезенки и брыжеечного лимфатического узла, окрашенные с применением антисыворотки к CWD МБТ FLK-BLV с.30 (таблица 1).

Наиболее интенсивная специфическая окраска клеток тканей была получена при ДИП-окраске с использованием антисыворотки к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv (таблица 1).

В целом результаты ДИП-окраски показали, что в клетках исследованных

тканей находились антигены, которые реагировали как с антителами к антигенам типичных МБТ, так и более интенсивно с антителами к CWD МБТ.

При посеве гомогенатов тканей, деконтаминированных щавелевой кислотой, на среду Гельберга типичных МБТ не выделено. В то же время гомогенаты тканей, инкубированные со стимулятором роста, дали рост на среде МусСел DW через 2–4 дня в исходном посеве или в I-II слепом пересеве (таблица 2). Для выделения изолята из гомогената селезенки, пропущенного через фильтры 0,45 μm и 0,22 μm, потребовалось 4 «слепых» пересева.

Изоляты имели характерный для CWD МБТ полиморфизм, причем клетки одинаковых форм встречались как в изолятах из разных тканей, так и в изолятах из гомогенатов, деконтаминированных щаве-

левой кислотой и фильтрацией через поры 0,45 μm и 0,22 μm (рисунки 6, 7).

Изоляты реагировали с антителами к антигенам *M. bovis* при ДИП-окраске приобретали специфический коричневый цвет (рисунок 8). Присутствие в изолятах общих антигенов с МБТ подтверждали результаты РА (рисунок 9). Интересно, что изоляты также агглютинировались сыворотками крови BLV+ коров (рисунок 9).

ДНК изолятов в ПЦР реагировала с праймерами MPB70 и dev комплекса *tuberculosis-bovis*, что в совокупности с культурально-морфологическими свойствами позволяло отнести их к CWD МБТ. Это подтверждали результаты ИФА соникатов изо-

лятов с антисывороткой к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, с которой они реагировали в разведении 1:1200 с превышением ОП 3,5–9,4 (рисунок 10а).

Соникаты изолятов из тканей козы также интенсивно реагировали с антисывороткой (а/с) к изоляту CWD МБТ из культуральной жидкости FLK-BLV, пропущенной через фильтр 0,22 μm (рисунок 10b). Результаты РИЭФ подтвердили, что изоляты из тканей козы имели такой же антигенный состав, что и изолят CWD МБТ из культуральной жидкости FLK-BLV, фильтрованной через фильтр 0,22 μm , но концентрация общих антигенов в них была гораздо ниже (рисунок 11).

Таблица 2. – Результаты посева гомогенатов тканей козы, инкубированных со стимулятором роста на среду MycCel DW

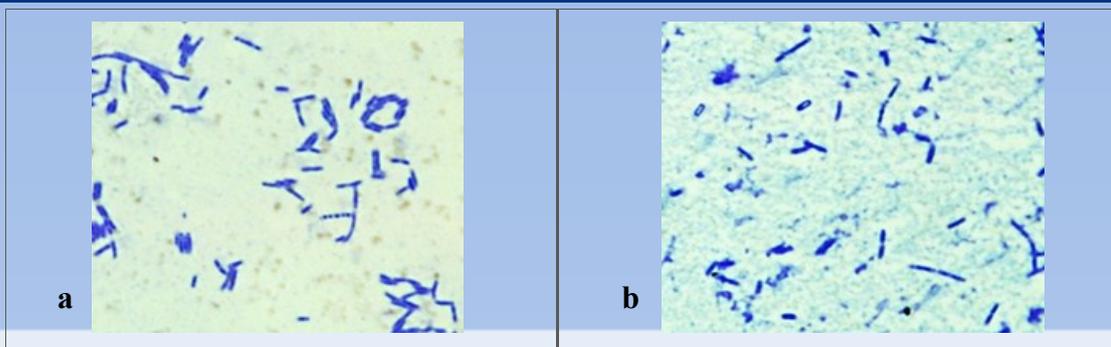
Материал	Метод деконтаминации	
	щавелевая кислота	фильтрация 0,45 μm и 0,22 μm
Бронхиальный лимфоузел	+	-
Брыжеечный лимфоузел	-	+
Селезенка	+	+



Рисунок 5. – Гомогенат селезенки. ДИП-окраска с Ig из а/с к *M. bovis*. Видны специфически окрашенные коккоиды (стрелки)

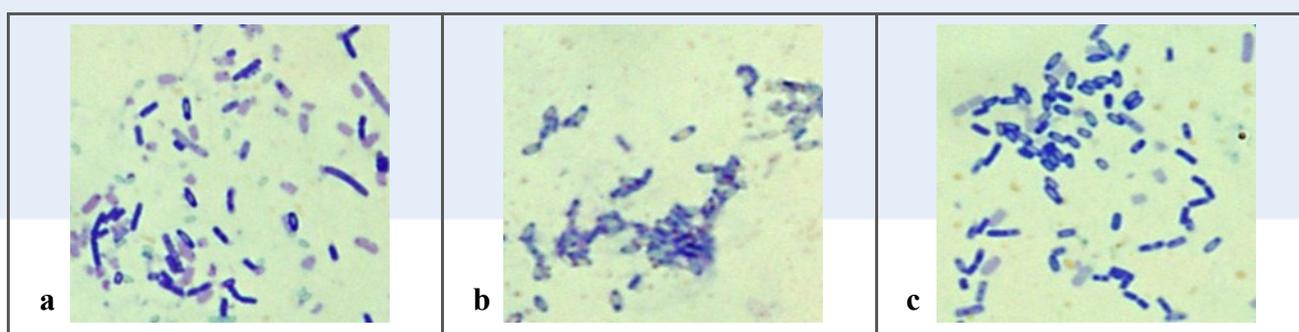
Самым интересным было то, что соникаты изолятов из тканей козы, павшей от лимфосаркомы, реагировали с антисывороткой к FLK-BLV, разведенной 1:300–1:600, а соникат изолята из брыжеечного лимфоузла (0,22 μm) – даже с разведением 1:1200 (рисунок 10с). То есть бактериальные изоляты явно содержали такие же антигены, что и BLV. Это подтверждали и результаты ИФА с сыворотками крови

BLV+ коров, которые реагировали с соникатом изолята из брыжеечного лимфоузла (0,45 и 0,22 μm) в разведениях 1:400–1:1600 (рисунок 12). Необходимо отметить, что этот же соникат одновременно давал положительные реакции с сыворотками волов, сенсibilизированных инактивированной бактериальной массой *M. bovis* и *M. avium*, но в разведении 1:200 (рисунок 12).



а – гомогенат бронхиального лимфатического узла, деконтаминированный щавелевой кислотой; б – гомогенат селезенки, пропущенный через фильтры 0,45 μm и 0,22 μm; Kinyoun, 10×100

Рисунок 6. – Первичный рост в посевах на среде MycCel DW



а – гомогенат бронхиального лимфатического узла, деконтаминированный щавелевой кислотой; б – гомогенат селезенки, деконтаминированный щавелевой кислотой; с – гомогенат брыжеечного лимфатического узла, пропущенный через фильтры 0,45 μm и 0,22 μm; Kinyoun, 10×100

Рисунок 7. – Рост в посевах на среде MycCel DW

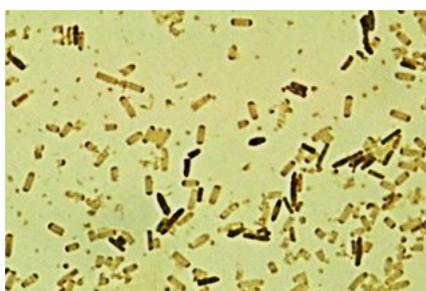
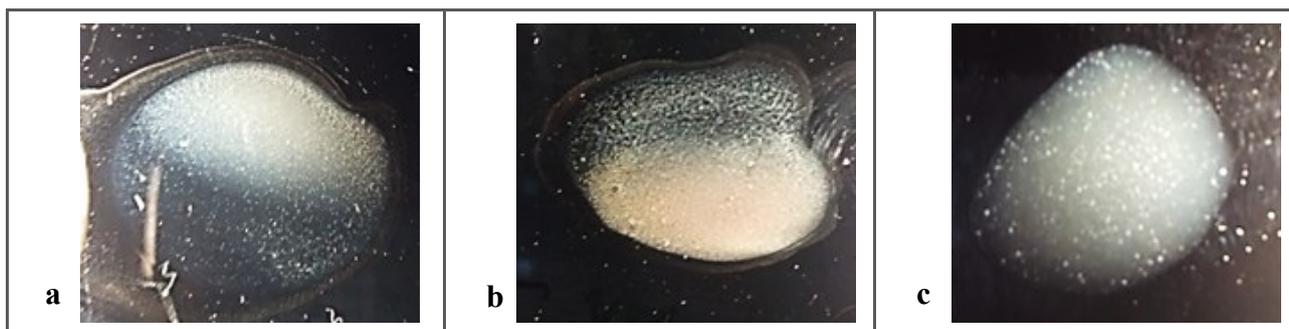
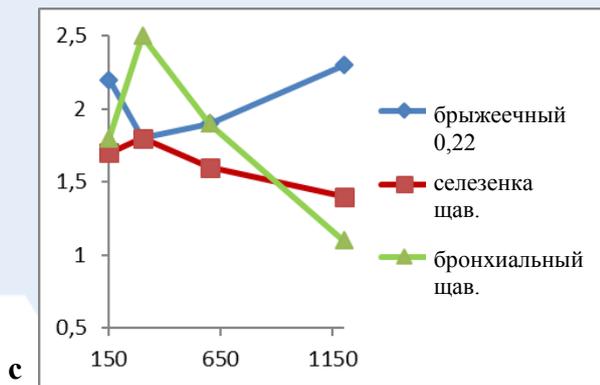
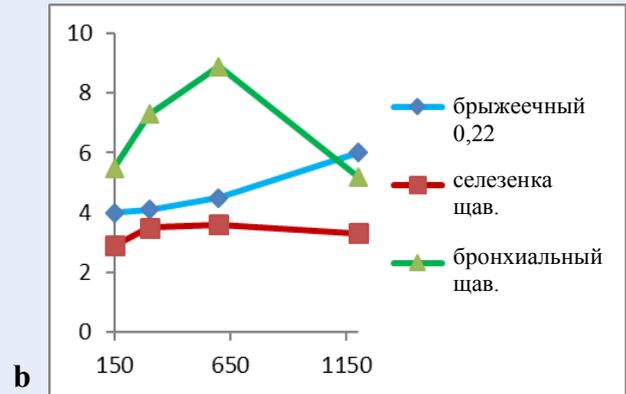
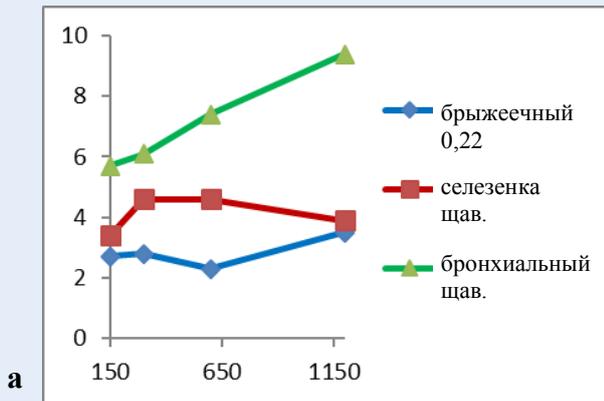


Рисунок 8. – Изолят из гомогената селезенки, деконтаминированного щавелевой кислотой. ДИП-окраска с использованием Ig из а/с к *M. bovis*; 10×100



а – с антисывороткой к *M. bovis* 8; б – к CWD *M. tuberculosis*;
с – с сывороткой коровы, больной лейкозом

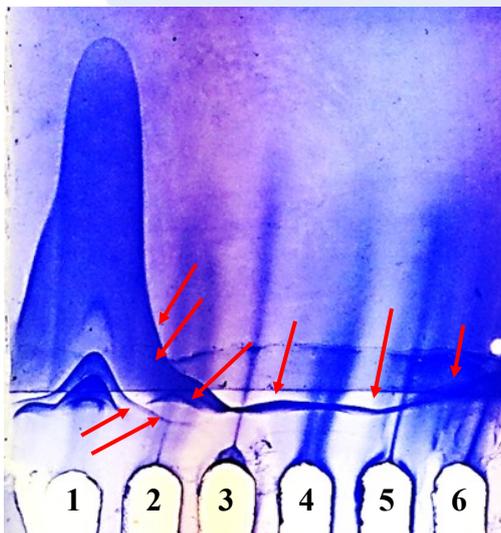
Рисунок 9. – РА изолята из бронхиального лимфоузла



а – с антисывороткой к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv; б – к CWD МБТ FLK-BLV 0.22 HC; в – к FLK-BLV

Рисунок 10. – ИФА соникатов изолятов из тканей.

Ось абсцисс – разведения антисывороток, ось ординат – превышение ОП с антисыворотками в сравнении с негативной сывороткой (Sample/negative)



1 – CWD МБТ из FLK-BLV, пропущенной через фильтр 0,22 μm; 2 – брыжеечный лимфоузел (0.45 и 0.22 μm); 3 – брыжеечный лимфоузел (щав.); 4 – селезенка (щав.); 5 и 6 – бронхиальный лимфоузел (рост в разных пробирках). В агарозе антисыворотка к CWD МБТ из FLK-BLV, пропущенной через фильтр 0,22 μm (50 мкл/мл). Стрелки – сливающиеся преципитаты общих антигенов

Рисунок 11. – РИЭФ соникатов изолятов из тканей козы

В иммуноблоттинге с сывороткой крови коровы, больной лейкозом, почти все фракции соникатов изолятов из лимфатического узла и селезенки, реагировавшие с антителами, соответствовали по молекулярной массе и подвижности фракциям антигена FLK-BLV (рисунок 12).

Изоляты из тканей козы оказались резистентными к антибиотикам, влияющим на клеточную стенку и проницаемость мембран (пенициллин, цефалоспо-

рины, ванкомицин), а также к аминогликозидам, ингибирующим синтез белков (таблица 3). Другие антибиотики, действующие на синтез белков (тетрациклин, доксициклин, фторхинолоны, линезолид), достаточно эффективно подавляли рост изолятов. Необходимо отметить, что профиль чувствительности изолятов к антибиотикам был похож на профиль экспериментально полученного штамма CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv (таблица 3).

Таблица 3. – Чувствительность CWD МБТ, выделенных из лимфатического узла и селезенки, к антибиотикам (диаметр зон задержки роста в диффузионном тесте в мм)

Изоляты	Бронхиальный лимфоузел (щав.)	Селезенка 0,22	CWD <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv (контроль)
Penicillin	10	8	0
Streptomycin	16	16	22
Kanamycin	15	15	21
Neomicin	18	15	24
Azitromicin	19	27	22
Tetracyclin	19	20	23
Doxiciclin	19	33	23
Linezolid	25	33	29
Levofloxacin	32	33	37
Norfloxacin	28	29	28
Ciprofloxacin	31	30	35
Ofloxacin	32	31	29
Cefazolin	12	12	12
Cefepime	15	16	16
Vancomycin	15	14	16

Примечание – зоны задержки роста 18 мм и меньше выделены красным цветом – результат, указывающий на резистентность изолята

Резкая гиперплазия лимфатических узлов и селезенки у павшей козы была характерна для лимфосаркомы. Диагноз подтверждался положительной РИД сыворотки крови с антигеном FLK-BLV, но в гомогенатах лимфатических узлов и селезенки обнаружена ДНК МБТ. Это явно не было

артефактом, так как в клетках лимфатических узлов и селезенки были найдены и антигены МБТ. Необходимо отметить, что геном МБТ ранее также находили в культурах лейкозных клеток человека «Kasumi» и «Jurkat» [18].

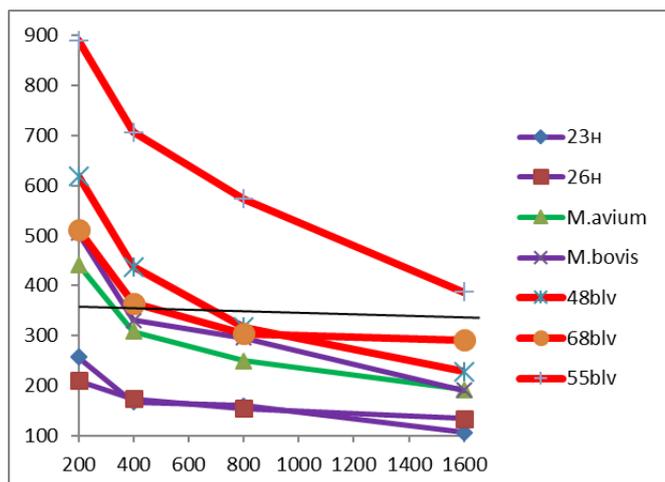
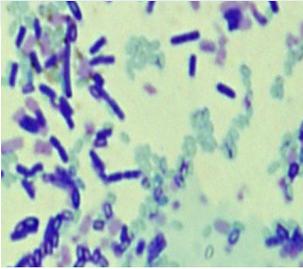
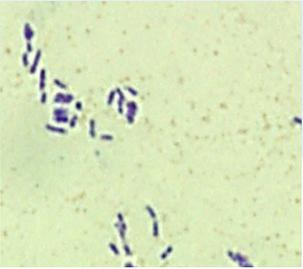
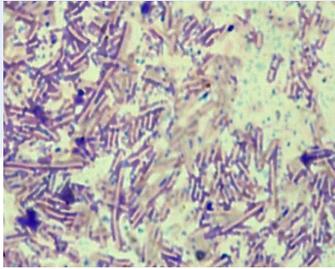
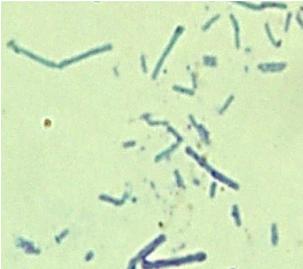
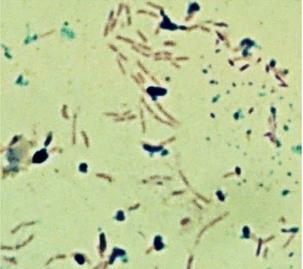
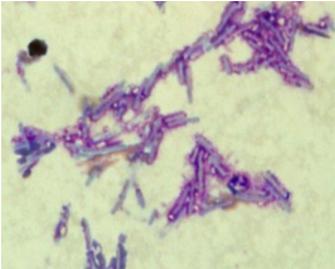
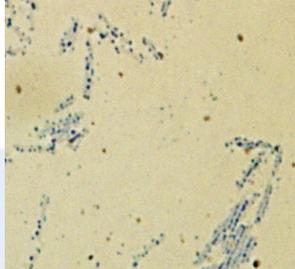
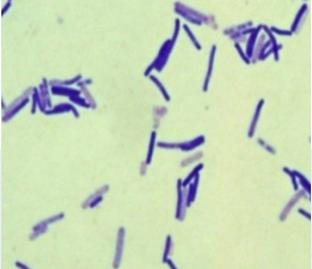


Рисунок 12. – ИФА сониката изолята из брыжеечного лимфоузла (0.45 и 0.22 μm) с 2 сыворотками крови здоровых коров (23н, 26н), волов, сенсibilизированных бактериальной массой *M. avium* и *M. bovis*, 3 коров BLV+ (красные линии). Горизонтальная линия – cut off

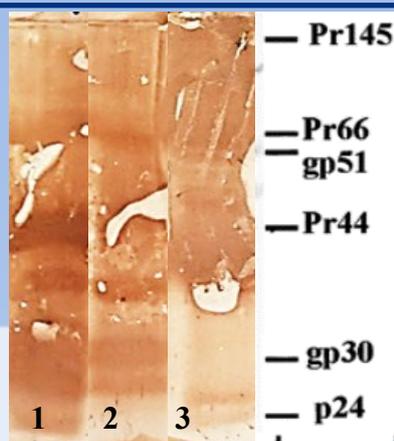
При посеве с применением стимулятора роста и специальной питательной среды из гомогенатов тканей выделены изоляты, которые по результатам ПЦР и фенотипическим свойствам были отнесены к не-кислотоустойчивым МБТ. Изоляты были выделены после деконтаминации гомогенатов тканей 6%-ной щавелевой кислотой, а также после стерилизующей фильтрации, что характерно именно для микобактерий. У изолятов были общие антигены с типичными и CWD МБТ. У них наблюдался характерный для CWD МБТ полиморфизм [13]. Профили чувствительности изолятов

к антибиотикам и экспериментально полученного штамма CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv не различались. Они были резистентны к антибиотикам, влияющим на синтез клеточной стенки. Еще в XX веке было установлено, что характерной чертой CWD МБТ и изолятов из опухолей, в частности, является резистентность к пенициллину [19]. Антибиотики резко усиливали полиморфизм изолятов и в ряде случаев повышали их кислотоустойчивость, что проявлялось красной окантовкой и коричневатой окраской клеток (таблица 4).

Таблица 4. – Изменение морфологии изолята из бронхиального узла козы при контакте с антибиотиками в диффузионном тесте; Kinyoun 10×100

Исходная морфология	Пенициллин – 10	Канамицин – 15	
			
Стрептомицин – 16	Цефазолин – 12	Азитромицин – 19	
			
Доксициклин – 19	Линезолид – 25	Левифлоксацин – 32	Офлоксацин – 32
			

Примечание – числами указан диаметр зоны задержки роста в мм



1 – бронхиальный лимфоузел; 2 – селезенка (щав.),
3 – аг FLK-BLV. 12 % ПААГ-ДСН

Рисунок 13. – Иммуноблоттинг с сывороткой крови коровы, больной лейкозом (1:20), соникатов изолятов

При микроскопии типичные МБТ не обнаружены, только в селезенке были немногочисленные гранулы, похожие на зерна Муха, которые, однако, было трудно идентифицировать. При бактериологическом посеве типичных микобактерий не выделено. То есть у павшего животного не было активной туберкулезной инфекции.

Полученные результаты указывали на то, что у павшей козы была латентная туберкулезная инфекция, связанная с персистенцией МБТ с измененными свойствами [20]. Вместе с тем выделение CWD МБТ не означает, что инфекционный агент персистировал именно в этой форме. Особенностью посева с использованием стимуляторов роста (ВКГ, МусСел DW, Влакон) является то, что независимо от того, в какой форме в патологическом материале находятся МБТ, на специальных питательных средах (ВКГ, Мус Сел DW) [16, 17, 21] вырастают именно CWD МБТ. Это отражает одну из линий стратегии выживания МБТ – появление CWD МБТ, способных в 20–30 раз быстрее размножаться, причем на простых средах и в широком температурном диапазоне [22].

Выделение CWD МБТ из патологического материала, подвергнутого стерилизующей фильтрации, указывает на то, что в тканях находились вирусоподобные формы МБТ. Такие же CWD МБТ были выделены и из проб, деконтаминированных щавелевой кислотой с использованием центрифугирования (2000 g). С одной стороны, это позволяет предположить, что инфекционный агент по массе сопоставим с бактериальными формами, но, скорее

всего, рост давали именно ультрамелкие формы [23], находившиеся в клетках тканей, осаждавшихся при центрифугировании. Независимо от того, были ли изоляты выделены из фильтрованных или деконтаминированных кислотой проб, они принципиально не отличались по морфологии и антигенному составу. Это также подтверждало, что инфекционный агент по размерам сопоставим с вирусами, но, в отличие от них, выдерживал обработку щавелевой кислотой.

Так как в тканях не обнаружено типичных и CWD МБТ, но в клетках найдены их антигены, можно предположить, что инфекционный агент персистировал в клетках и, судя по ДИП-окраске, проникал в их ядра. При исследовании связи туберкулезной инфекции и рака легких также была установлена локализация инфекционного агента в ядрах, где были обнаружены включения, похожие на L-формы МБТ и фрагменты их генома [24, 25].

Безусловно, обнаружение генома и антигенов МБТ, выделение CWD МБТ из лимфосаркоматозных тканей еще не доказывает связь туберкулезной инфекции с онкогенезом. Оба процесса могут протекать независимо друг от друга. Однако антигенные свойства изолятов указывают на то, что связь все-таки есть: соникаты изолятов из лимфосаркоматозных тканей реагировали с антисывороткой к культуральной жидкости клеток почки эмбриона овцы, инфицированных вирусом бычьего лейкоза (антиген FLK-BLV для диагностики лейкоза крупного рогатого скота в РИД). Антисыворотка к FLK-BLV, кроме

антител к антигенам BLV, содержала антитела к антигенам почки овцы, сывороткам крови эмбрионов коров и лошади, которые добавляют в ростовую среду. Было установлено, что соникаты типичных и CWD МБТ не реагировали с антисыворотками к указанным тканевым антигенам. Следовательно, позитивные результаты в ИФА соникатов изолятов CWD МБТ из лимфосаркоматозных тканей с антисывороткой к FLK-BLV могли быть только за счет связывания с антителами к антигенам BLV. То есть у них были такие же антигены, как и у BLV. Именно это было подтверждено и в иммуноблоттинге с сывороткой крови коровы, больной лейкозом (рисунок 13). Косвенным подтверждением антигенного родства CWD МБТ и BLV также было обнаружение одинаковых по специфичности антител в положительной сыворотке крови для диагностики лейкоза в РИД и в антисыворотке к CWD *M. tuberculosis H₃₇Rv* (рисунок 2), а также положительных реакций в ИФА с лейкозными сыворотками коров при использовании в качестве антигенов соникатов изолятов из лимфосаркоматозных тканей (рисунок 12). Интересно, что в последнем случае соникаты также реагировали с сыворотками животных, экспериментально сенсibilизированных микобактериями. То есть в антигенном спектре изолятов присутствовали как антигены общие с типичными и CWD МБТ, так и с BLV. Полученные результаты указывают на то, что в геноме изолятов CWD МБТ из лимфосаркоматозных тканей должны быть гены, кодирующие такие же протеины, как и у BLV.

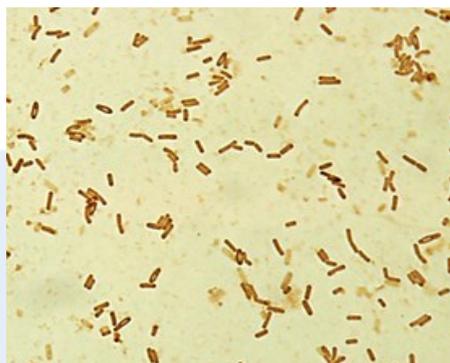
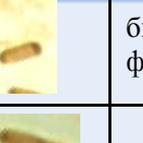
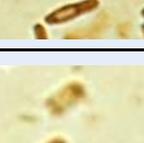
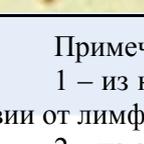
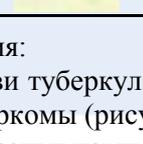
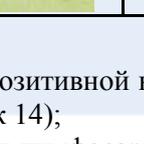
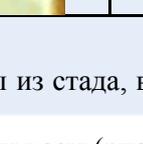


Рисунок 14. – Изолят CWD МБТ из крови туберкулинпозитивной козы (исследование 2016 г.) из стада, в котором в 2015 г. родилась коза, впоследствии павшая от лимфосаркомы

В конце XIX века J. Ferran, впервые получивший НКУ МБТ, выдвинул гипотезу о том, что типичные патогенные МБТ представляют лишь незначительную часть популяции, а ее большая часть существует в виде НКУ форм, обитающих и размножающихся во внешней среде [26]. Спорная гипотеза до сих пор не опровергнута. Исходя из полученных данных [12, 13, 18], можно также предположить, что типичные патогенные МБТ – инвазивная форма, представляющая лишь часть популяции, а ее большая часть – персистирующие измененные формы, которые в определенных условиях могут способствовать возникновению заболеваний, которые не связывают с туберкулезной инфекцией. В известной мере это отражает и рассматриваемый случай. Когда козе, впоследствии павшей, было около 1 года, в стаде, в котором она находилась, было обнаружено несколько особей, реагировавших на туберкулин. Они не имели при аутопсии туберкулезных изменений, хотя из крови были выделены CWD МБТ (рисунок 14). Больше туберкулинпозитивных животных не выявляли, но скрытая инфекция явно осталась в стаде. Изоляты из тканей павшей козы были удивительно похожи на изоляты от туберкулинпозитивной особи. В таблице 4 приводятся одинаковые характерные формы, присутствующие на рисунках 8 и 14. Самое интересное, что такие же формы ранее были обнаружены в мазках изолятов из лимфатического узла коровы BLV+ и из FLK-BLV (таблица 5) [13]. То есть подтверждался постулат Коха о том, этиологический агент должен выделяться при разных случаях заболевания.

Таблица 5. – Характерные формы клеток в мазках изолятов CWD МБТ (ДИП-окраска с использованием Ig из антисыворотки к *M. bovis* 8)

1	2	3	4	Характеристика
				полностью окрашенные в коричневый цвет палочки
				биполярные «пустые» палочковидные формы
				колбовидные формы
				короткие «обрезанные» палочковидные формы с одним «зерном»

Примечания:

- 1 – из крови туберкулинположительной козы из стада, в котором родилась коза, павшая впоследствии от лимфосаркомы (рисунок 14);
- 2 – из селезенки павшей от лимфосаркомы козы (рисунок 8);
- 3 – из лимфатического узла коровы BLV+ [13];
- 4 – из FLK-BLV [13]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сейчас уже установлено, что МБТ, попадая в организм, могут не вызывать классический туберкулез [20], а персистировать в виде dormantных нечувствительных, полностью лишенных клеточной стенки спороподобных и вирусоподобных форм. Каждая из этих форм повышает вероятность выживания вида. В частности, длительная персистенция и уход от конт-

роля иммунной системы, вероятно, может обеспечиваться за счет интеграции вирусоподобных форм, подобно ретровирусам, в ядра и в геном хозяина [24, 25]. При этом, учитывая такое ранее неизвестное свойство МБТ и их вирусоподобных форм, как «бессмертность» [23], вероятно, в определенных условиях они могут придавать его клеткам и инициировать онкогенез, что было доказано и в эксперименте [27].

ЛИТЕРАТУРА

1. US Department of Agriculture Animal and Plant Health Services, Veterinary Services, Center for Epidemiology and Animal Health. Info sheet : bovine leukosis virus (BLV) on U.S. dairy operations. – 2007.
2. Schwartz, I. Pathobiology of bovine leukemia virus / I. Schwartz, D. Lévy // *Veterinary Research*. – 1994. – Vol. 25. – № 6. – P. 521–536.
3. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human / N. Gillet [et al.] // *Retrovirology*. – 2007. – Vol. 4. – № 1. – P. 18.
4. BurrIDGE, M. J. The zoonotic potential of bovine leukemia virus / M. J. BurrIDGE // *Veterinary Research Communications*. – 1981. – Vol. 5. – № 1. – P. 117–126.
5. Choi, K. Y. Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immuno-sorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle / K. Y. Choi, R. B. Liu, G. C. Buehring // *Journal of Virological Methods*. – 2002. – Vol. 104. – № 1. – P. 33–39.
6. Buehring, G. C. Humans Have Antibodies Reactive with Bovine Leukemia Virus / G. C. Buehring, S. M. Philpott, K. Y. Choi // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2003. – Vol. 19. – № 12. – P. 1105–1113.

7. Bovine Leukemia Virus DNA in Human Breast Tissue / G. C. Buehring [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 20. – № 5. – P. 772–782.
8. Exposure to Bovine Leukemia Virus Is Associated with Breast Cancer: A Case-Control Study / G. C. Buehring [et al.] // *PloS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 9. – P. e0134304.
9. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development / G. C. Buehring [et al.] // *PloS One*. – 2017. – Vol. 12. – № 6. – P. e0179367.
10. Gillet, N. A. Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA / N. A. Gillet, L. Willems // *Retrovirology*. – 2016. – Vol. 13. – № 1. – P. 75.
11. Livingston V. Cancer : a new breakthrough / V. Livingston, V. Wuerthele-Caspe. – Los Angeles : Nash Publishing, 1972. – 269 p.
12. Further evidence for cancer as cell-wall-deficient mycobacterial disease / A. P. Lysenko [et al.] // *Journal of Molecular Pathological Epidemiology*. – 2016. – Vol. 1. – № 1. – P. 1–12.
13. Вирус бычьего лейкоза – вирусоподобная форма микобактерий туберкулеза? / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2019. – № 1. – С. 15–24.
14. Goat Lymphosarcoma From Bovine Leukemia Virus / C. Olson [et al.] // *JNCI : Journal of the National Cancer Institute*. – 1981. – Vol. 67. – № 3. – P. 671–675.
15. Выявление микобактерий туберкулеза в тканях с помощью дифференцирующей иммунопероксидазной окраски / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез и болезни легких*. – 2014. – № 10. – С. 55–58.
16. Власенко, В. В. Туберкулез в фокусе проблем современности / В. В. Власенко. – Винница : Наука, 1998. – 350 с.
17. Феномен изменчивости микобактерий туберкулеза и его использование для обнаружения туберкулезной инфекции / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез – глобальная катастрофа человечества : материалы I Междунар. заочной науч.-практ. конф., 24 марта 2014 г. / Ростов-на-Дону : РостГМУ, 2014. – С. 176–198.*
18. Вероятная связь миелоидного и лимфобластного лейкоза с туберкулезной инфекцией / А. П. Лысенко [и др.] // *Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария*. – 2020. – № 1. – С. 55–58.
19. Diller, I. Cytological studies of relationships between microorganisms isolated from tumor tissue and normal and malignant cells of the host / I. Diller // *Cancer Research*. – 1952. – № 12. – P. 257.
20. Дорожкова, И. Р. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция / И. Р. Дорожкова, З. С. Земскова. – М. : Медицина, 1984. – 222 с.
21. Живильне середовище «Влакон» для експрес-діагностики туберкулезу / В. В. Власенко [и др.] // *Науковий вісник Львівської Національної академії ветеринарної медицини ім. С. З. Гжицького*. – 2005. – Т. 7. – № 1. – С. 56–60.
22. Markova N. Cell Wall Deficiency in Mycobacteria : Latency and Persistence / N. Markova // *Understanding Tuberculosis – Deciphering the Secret Life of the Bacilli* / ed. P.-J. Cardona. – InTech, 2012. – *Cell Wall Deficiency in Mycobacteria*. – P. 1–35.
23. Микобактерии туберкулеза при термическом воздействии образуют защитные формы, проходящие через ультрафильтры и восстанавливающие жизнеспособность в виде CWD форм / А. П. Лысенко [и др.] // *Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария*. – 2019. – № 1. – С. 33–45.
24. Tian, Y. Detection of Mycobacterium tuberculosis L-forms and MPB64 gene in breast cancer tissues / Y. Tian, X. K. Cui, T. Hao // *J. of Practical Medicine*. – 2013. – № 15. – P. 45–46.
25. Clinical end-points associated with Mycobacterium tuberculosis and lung cancer : implications into host-pathogen interaction and coevolution / Y. Tian [et al.] // *BioMed Research International*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–9.
26. Ferran, J. La nueva bacteriologia de la tuberculosis : Congreso de la Tuberculosis / J. Ferran. – Valencia : Litografia de Jose Ortega, 1912. – 51 p.
27. Lung carcinogenesis induced by chronic tuberculosis infection: the experimental model and genetic control / A. Nalbandian [et al.] // *Oncogene*. – 2009. – Vol. 28. – № 17. – P. 1928–1938.

УДК 619:57.083.31

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-54-58>Журавлёва Е.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹Бохан С.А., кандидат ветеринарных наук¹Азаров С.М., доктор технических наук, доцент²Дробыш А.А., кандидат технических наук, доцент²¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», г. Минск²УО «Белорусский национальный технический университет», г. Минск

ПОРИСТЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ БАЗАЛЬТОВОГО ВОЛОКНА В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ СУБСТРАТ-ЗАВИСИМОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК

Резюме

В работе оценено влияние на перевиваемую культуру клеток почки крупного рогатого скота (MDBK) образцов 4 инновационных материалов, разработанных в УО «Белорусский национальный технический университет» на основе базальтового волокна с добавками фарфора, оксидов меди, железа, циркония.

В ходе экспериментов определено, что образец, содержащий в своем составе базальт, 4 % фарфора и 4 % FeO, не оказывает негативного воздействия на культуру клеток MDBK. Материал данного образца является перспективным для дальнейшего применения в качестве носителя субстрат-зависимых культур клеток.

Материалы образцов, проявившие выраженное цитотоксическое действие (базальт + 4 % фарфора + 4 % CuO, базальт + 4 % фарфора + 8 % CuO, базальт + 4 % ZrO₂ + 4 % CuO), могут быть рассмотрены для изготовления бактерицидных фильтров. Данное действие объясняется, очевидно, проявившимися биоцидными свойствами меди, входящей в их состав.

Ключевые слова: MDBK, носитель, субстрат-зависимая культура клеток, пористая структура, базальтовое волокно, фарфор.

Summary

The influence of samples of 4 innovative materials developed at the Belarusian National Technical University on the basis of basalt fiber with additives of porcelain, oxides of copper, iron, and zirconium on the transplanted culture of cattle kidney cells was evaluated in this work.

During the experiments, it was determined that the sample containing basalt, 4 % of porcelain and 4 % of FeO does not have a negative effect on the culture of MDBK cells. The material of this sample is promising for further use as a carrier for substrate-dependent cell cultures.

Sample materials showing a pronounced cytotoxic effect (basalt + 4 % porcelain + 4 % CuO, basalt + 4 % porcelain + 8 % CuO, basalt + 4 % ZrO₂ + 4 % CuO) can be considered for the manufacture of bactericidal filters. This action is explained, obviously, by the manifested biocidal properties of copper, which is part of their composition.

Keywords: MDBK, carrier, substrate-dependent cell culture, porous structure, basalt fiber, porcelain.

Поступила в редакцию 05.11.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Производство вирусных вакцин против инфекционных заболеваний животных невозможно без культивирования субстрат-зависимых линий клеток [1].

В настоящее время в Республике Беларусь наиболее распространены следующие технологии выращивания субстрат-зависимых линий клеток для культивирования вакцинных вирусов:

- в монослое на поверхности матрасов и роллерных флаконов;

- метод псевдосуспензионного культивирования в биореакторах с использованием микроносителей.

Метод культивирования субстрат-зависимых линий клеток в монослое на поверхности матрасов и роллерных флаконов крайне малопродуктивен из-за их низкой удельной поверхности и дорог ввиду высокой трудоемкости.

Метод псевдосуспензионного культивирования субстрат-зависимых клеток в биореакторах с использованием микроносителей высокопроизводителен, но технологически сложен.

Большой интерес представляет культивирование субстрат-зависимых линий клеток на проницаемых субстратах, которые имеют повышенную удельную поверхность. Рост клеток на таком субстрате способствует повышенной диффузии кислорода, CO_2 и питательных веществ. Некоторые производители в настоящее время поставляют проницаемые подложки, свободно вставляемые в лунки планшетов, разных размеров и материалов с различным диаметром пор (Costar, B-DBiosciences, Millipore, Nunc) [1], однако отечественных производителей среди них нет.

УО «Белорусский национальный технический университет» разработал носители на основе базальтовых пористых материалов, которые характеризуются повышенной (в 10 и более раз) удельной поверхностью, высокой пористостью, устойчивостью относительно тепловых ударов, (возможность автоклавирования при многократном использовании), способностью создавать условия роста, культивирования субстрат-зависимых линий клеток. Предположительно, создание пористой керамики из крупнодисперсных керамических частиц к указанным выше преимуществам добавит и увеличение коэффициента проницаемости.

В отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» проведен ряд исследований по применению материалов

для осветляющей и стерилизующей фильтрации биологических жидкостей [2, 3]. Однако исследования по применению пористых материалов на основе базальтового волокна в качестве носителей не проводились.

Цель настоящей работы – изучить возможность использования пористых материалов на основе базальтового волокна в качестве носителей для культивирования перевиваемых субстрат-зависимых линий клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена на базе отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и УО «Белорусский национальный технический университет».

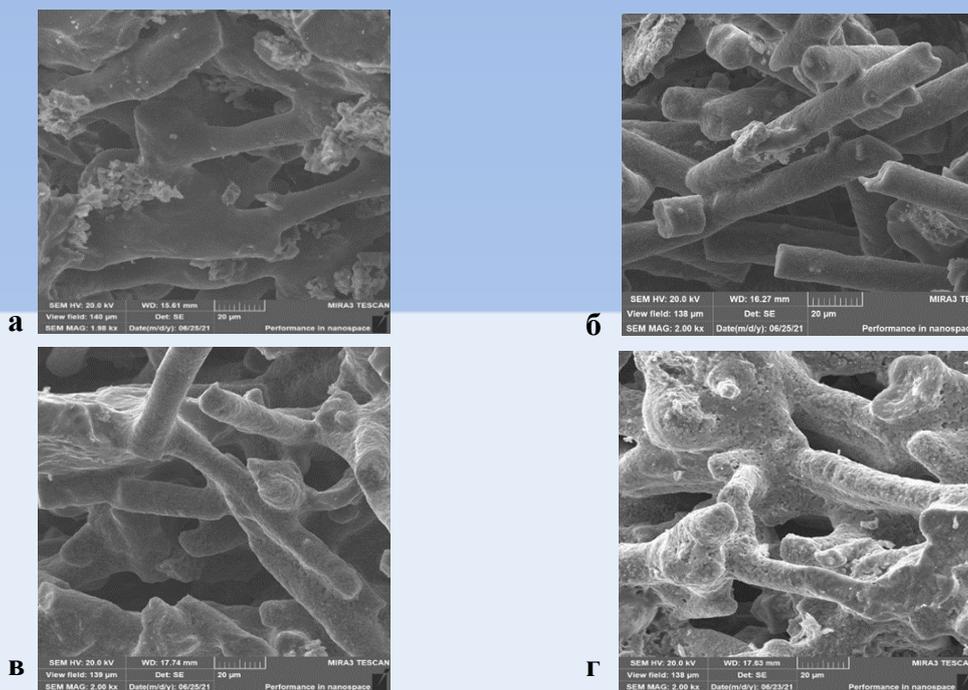
В работе оценено влияние на перевиваемую культуру клеток почки крупного рогатого скота (MDBK) экспериментальных образцов инновационных материалов, разработанных в УО «Белорусский национальный технический университет».

Экспериментальные образцы получены прессованием из базальтового волокна марки БС16-6-76 с добавками фарфора, оксидов меди, железа, циркония и изготовлены в виде дисков \varnothing 17 мм и высотой 2–5 мм. Спрессованные диски спекались на воздухе в лабораторной печи марки СНОЛ-5/14.

Температура спекания, фазовый состав и характеристики исследуемых образцов представлены в таблице. Изображения пористой структуры образцов представлены на рисунке 1.

Таблица. – Характеристики образцов

№ образца	Состав, мас %	Температура спекания, °С	Пористость, %	Прочность, МПа
1	Базальт + 4 % фарфора + 4 % FeO	1075	55–65	4–6
2	Базальт + 4 % фарфора + 4 % CuO	1075	55–65	4–6
3	Базальт + 4 % фарфора + 8 % CuO	1075	55–65	4–6
4	Базальт + 4 % ZrO_2 + 4 % CuO	1075	45–55	8–10



а – базальт + 4 % фарфора + 4 % FeO; б – базальт + 4 % фарфора + 4 % CuO;
 в – базальт + 4 % фарфора + 8 % CuO; г – базальт + 4 % ZrO₂ + 4 % CuO
Рисунок 1. – Структура образцов

Известно, что оксиды железа различной валентности при накоплении в системах водоподготовки не препятствуют росту бактерий и микроорганизмов, следовательно, оксид железа в составе носителя для культуры клеток не должен оказывать негативного влияния на ее рост. Фарфор (соединение на основе Al₂O₃-SiO₂) и оксид циркония ZrO₂ использовались для увеличения прочности образцов [4]. Оценочно размеры пор используемых материалов составляют 25–45 мкм, что создает благоприятные условия для 3D культивирования клеток в поровом пространстве. Температура спекания выше 1000 °С предполагает отсутствие химического взаимодействия

субстрат-зависимой культуры клеток с керамической поверхностью экспериментальных образцов.

Образцы помещены в 2 культуральных 6-луночных планшета.

В один планшет (опытный) добавлена суспензия культуры клеток MDBK с ростовой средой, во второй (контрольный) – только ростовая среда. Нижние лунки планшетов служили контролем клеток и контролем среды. Планшеты помещены в CO₂ инкубатор на 5 суток.

Интенсивность размножения клеток и состояние монослоя контролировали визуально под малым увеличением микроскопа (объектив ×10).

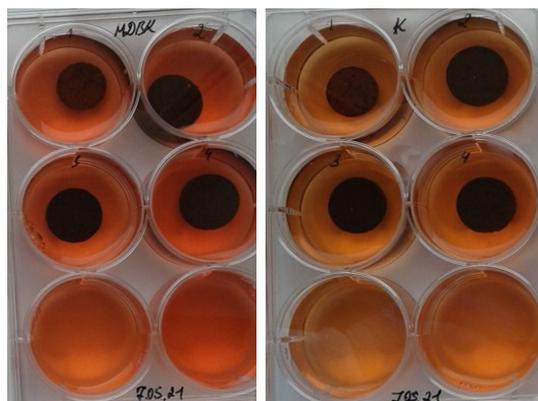


Рисунок 2. – Планшеты с образцами до инкубирования

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На рисунке 3 видно, что питательная среда в лунках планшета, не содержащих образцов, имеет такой же цвет, как и в лунках с образцами того же планшета. Следовательно, все представленные образцы не влияют на pH среды. Среда в

лунках, в которые добавлена культура клеток MDBK, пожелтела, что связано со сдвигом pH в кислую сторону под влиянием продуктов метаболизма клеток.

Результаты микроскопии монослоя клеток опытного планшета представлены на рисунках 4–8.

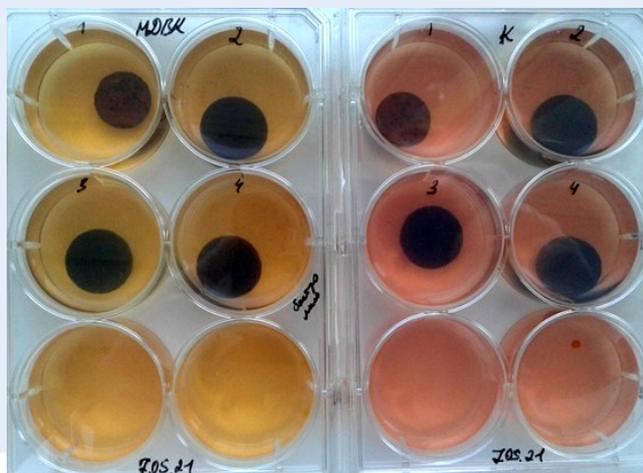


Рисунок 3. – Планшеты с образцами после инкубирования



Рисунок 4. – Монослой в лунке с образцом № 1

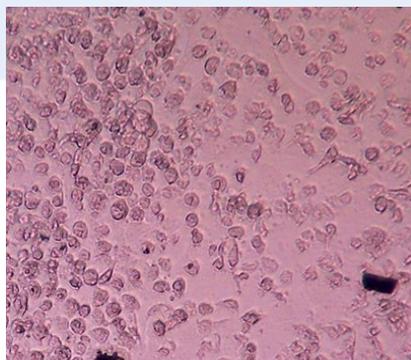


Рисунок 5. – Монослой в лунке с образцом № 2

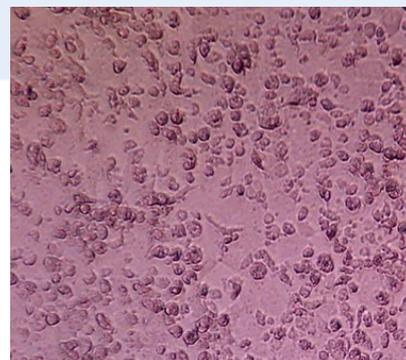


Рисунок 6. – Монослой в лунке с образцом № 3

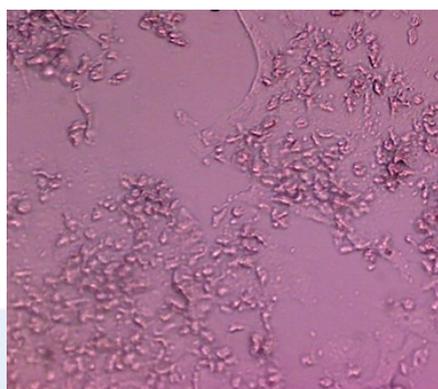


Рисунок 7. – Монослой в лунке с образцом № 4

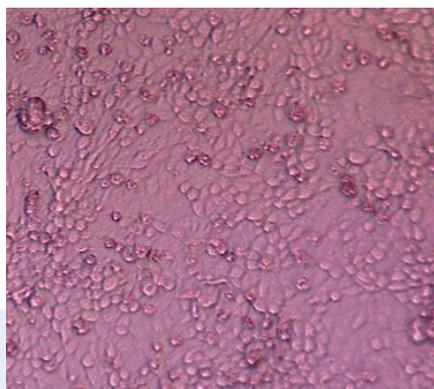


Рисунок 8. – Монослой в контрольной лунке, без образца

На представленных рисунках видно, что в лунках, содержащих образцы № 2, № 3, № 4, наблюдается токсическое поражение культуры клеток (клетки сморщены, произошла дегенерация монослоя), в то время как культура клеток MDBK в лунке, содержащей образец № 1, морфологически ничем не отличается от контрольной лунки, не содержащей образца.

Таким образом, можно сделать вывод о цитотоксичности образцов № 2, № 3, № 4 и отсутствии цитотоксических свойств у образца № 1 (базальт + 4 % фарфора + 4 % FeO), который считаем перспективным в качестве носителя для культур клеток.

Выраженные цитотоксические свойства образцов № 2 (базальт + 4 % фарфора + 4 % CuO), № 3 (базальт + 4 % фар-

фора + 8 % CuO), № 4 (базальт + 4 % ZrO₂ + 4 % CuO) объясняются, очевидно, проявившимися биоцидными свойствами меди, входящей в их состав. Материалы данных образцов могут быть рассмотрены для изготовления бактерицидных фильтров.

ВЫВОДЫ

1. Материал, содержащий в своем составе базальт, 4 % фарфора и 4 % FeO, является перспективным для дальнейшего применения в качестве носителя субстрат-зависимых культур клеток.

2. Материалы, содержащие базальт + 4 % фарфора + 4 % CuO, базальт + 4 % фарфора + 8 % CuO, базальт + 4 % ZrO₂ + 4 % CuO, могут быть рассмотрены для изготовления бактерицидных фильтров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фрешни, Р. Я. *Культура животных клеток : практ. руководство / Р. Я. Фрешни ; пер. 5-го англ. изд. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.*

2. *Regulation of Sintering Process of Selective Layers on A Large-Porous Aluminosilicate Substrate by Activating Modifiers / Y. Y. Piatsiushyk [et al.] // Euro PM 2018 Congress & Exhibition, EPMA, 4–13 September, 2018 : Proceedings, Bilbao, Spain. – Bilbao. – 4 p.*

3. *Влияние структуры пористых материалов на процессы ультрафильтрации при очистке биологических жидкостей / С. М. Азаров [и др.] // Новые материалы и технологии: порошковая металлургия, композиционные материалы, защитные покрытия, сварка: материалы 13-й Междунар. науч.-техн. конф., Минск, 16–18 мая 2018 г. – Минск : Беларуская навука, 2018. – С. 76–79.*

4. *Композиционные материалы на основе силикатов и алюмосиликатов / С. М. Азаров [и др.] – Минск : Беларуская навука, 2014. – 175 с.*

Вакцина «РЕСПИВАК»

ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ПАСТЕРЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

- вызывает выработку специфических антител у крупного рогатого скота к *Pasteurella multocida* серовариантов А, В и *Mannheimia haemolytica*;
- вводится внутримышечно;
- вакцинацию коров (тёлок) проводят независимо от срока стельности в дозе 2,0 см³;
- телок начинают вакцинировать с 15–16-месячного возраста;
 - телят вакцинируют с 5–10-дневного возраста в дозе 1,0 см³;
 - иммунитет наступает через 14–21 день после вакцинации и сохраняется в течение последующих 12 месяцев;
 - выпускают по 10, 20, 50, 100, 200, 400 см³;
 - срок годности вакцины – 18 месяцев при температуре от плюс 2 до плюс 8°С.



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

УДК 619:618.19-002:636.22/.2

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-59-63>

Жешко Н.В., младший научный сотрудник

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

ИЗУЧЕНИЕ ЭМБРИОТОКСИЧЕСКОГО И ТЕРАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ, РАЗДРАЖАЮЩИХ И АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ, СТАБИЛЬНОСТИ ПРИ ХРАНЕНИИ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА «МАСТИН»

Резюме

В статье представлены данные изучения эмбриотоксического и тератогенного действия, раздражающих и аллергизирующих свойств, стабильности при хранении нового ветеринарного препарата «Мастин», предназначенного для лечения субклинических и клинических маститов коров.

Установлено, что противомаститный препарат «Мастин» не обладает эмбриотоксическим и тератогенным действием, не имеет раздражающих и аллергизирующих свойств. Препарат стабилен в течение 6 месяцев в условиях ускоренного старения, что соответствует сроку годности 2 года от даты изготовления при соблюдении условий хранения, а показатели качества отвечают требованиям технических условий.

Ключевые слова: мастин, мастит, эмбриотоксическое действие, тератогенное действие, раздражающее свойство, аллергизирующее свойство, стабильность.

Summary

The article presents data on the study of embryotoxic and teratogenic effects, irritating and allergizing properties, stability during storage of the new veterinary drug «Mastin», intended for the treatment of subclinical and clinical mastitis of cows.

It was established that the antimastitis drug «Mastin» does not have an embryotoxic and teratogenic effect, does not have irritating and allergizing properties. The veterinary drug «Mastin» is stable for 6 months under conditions of accelerated aging, which corresponds to a shelf life of 2 years from the date of manufacture, subject to storage conditions, and quality indicators meet the requirements of technical specifications.

Keywords: mastitis, mastitis, embryotoxic effect, teratogenic effect, irritating property, allergenic property, stability.

Поступила в редакцию 15.11.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Получение экологически безопасной продукции является одной из важных задач современного молочного скотоводства. Ухудшение таких показателей качества молока, как бактериальная обсемененность, уровень содержания соматических клеток, наличие антибиотиков и других ингибирующих веществ свидетельствует о присутствии в стаде коров, больных маститом. Воспалительные процессы в вымени являются устойчивой проблемой во многих странах с развитым молочным скотоводством [1, 2, 4, 11, 12, 13]. В результате заболевания коров маститом изменяется не только качественный состав молока, но и снижается молочная продуктивность (не

менее чем на 20 %), увеличиваются расходы на лечение [7, 9]. После длительного периода болезни многие животные утрачивают способность интенсивно лактировать вследствие атрофии одной или нескольких четвертей вымени [5].

Течение и форма мастита зависят от степени вирулентности микрофлоры, состояния местных и общих защитных систем организма животного, влияния неблагоприятных условий, эффективности и своевременности профилактических мероприятий [10]. Особую опасность представляют скрытые (субклинические) маститы, часто остающиеся незамеченными и регистрирующиеся в 5–10 раз чаще, чем клинически выраженные [8, 10].

Воспалительный процесс в молочной железе развивается, как правило, в ответ на действие неблагоприятных биологических, физических и химических факторов внешней среды [10]. Запущенный патологический механизм приводит к нарушению функционирования молочной железы, изменениям в работе других систем и органов животных. Исходя из этого лечение мастита должно быть комплексным, направленным не только на подавление размножения возбудителей, но и на купирование воспалительной реакции.

В отделе патологии размножения и ветеринарной санитарии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» разработан новый противомаститный препарат «Мастин», обладающий антибактериальным, противовоспалительным, анальгезирующим действием.

Целью наших исследований было изучение эмбриотоксического и тератогенного действия, раздражающих и аллергизирующих свойств, стабильности при хранении нового ветеринарного препарата «Мастин» для лечения мастита коров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение тератогенного и эмбриотоксического влияния экспериментального образца противомаститного препарата на организм лабораторных животных проводили согласно Методическим указаниям по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии (Минск, 2007).

Исследование препарата провели на 45 половозрелых белых крысах обоего пола массой тела 220–250 г. Самок разделили на четыре опытные и одну контрольную группы по 7 голов, в каждой группе – 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 крыс считали началом беременности. Препарат в токсической дозе, установленной при определении хронической токсичности (29000 мг/кг массы тела),

применили внутрь с кормом: крысам первой группы – с 1-го по 7-й день беременности (период эмбриогенеза), второй группы – с 8-го по 14-й день беременности (период органогенеза), третьей – с 15-го по 19-й день беременности (плодный период филогенеза), четвертой – с 1-го по 19-й день (в течение всего периода беременности). Крысам контрольной группы препарат не применяли. За животными велось клиническое наблюдение.

В опыте по определению местного раздражающего действия препарата на кожные покровы были использованы 3 кролика массой 2,0–2,5 кг. Препарат наносили на выстриженные участки боковой поверхности кожи 1,5×2,0 см (правая сторона) в разведениях 1:10, 1:50 и 1:100 на этаноле. Контролем служила противоположная (левая) сторона тела, куда наносили в этой же дозе этанол. Экспозиция составила 4 ч, после чего остатки вещества аккуратно смыли. Наблюдение вели первые 8 ч ежедневно, а затем – через 16 ч после экспозиции.

При определении раздражающего действия препарата на слизистые оболочки использовали метод конъюнктивальной пробы на 3 кроликах массой 2,0–2,5 кг.

Изучение сенсibilизирующей (аллергенной) способности препарата определяли методом накожных аппликаций на 5 морских свинок массой 320–350 г. Для этого препарат наносили путём многократных аппликаций на участок кожи подопытных свинок ежедневно в течение 15 дней в разведении 1:50 и 1:100 на этаноле. Контрольным животным наносили этанол по аналогичной методике. Затем после 14-дневного перерыва на свежестриженные участки кожи с противоположной стороны наносили аналогично разрешающую дозу испытуемого препарата. Реакцию учитывали в течение 72 ч.

Изучение стабильности препарата ветеринарного «Мастин» с целью подтверждения сохранения физико-химических показателей в течение заявленного срока годности проводили согласно мето-

дике изучения стабильности в условиях ускоренного старения МУ 09140.07-2004.

Установление срока годности препарата определяли путем его выдержки в потребительской упаковке в течение трех месяцев при температуре плюс 40 ± 2 °С.

Физико-химические и биологические характеристики препарата изучались согласно методике сразу после изготовления, через 3 и 6 месяцев.

Для хранения образцов использовали термостат суховоздушный с возможностью поддержания температуры плюс 40 ± 2 °С и влажности 75 ± 5 %.

Оценку качества препарата проводили по основным показателям, предусмотренным проектом ТУ ВУ 600049853.097.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для выявления эмбриотоксического эффекта по 5 самок из опытных и контрольной групп декапитировали на 20-й день беременности. После 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 суммарное количество живых плодов у самок первой группы – 53, второй группы – 52, третьей – 51, четвертой – 50, контрольной – 53. Количество мест имплантации совпадало с количеством живых плодов. Мертвых плодов не отмечали (таблица).

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 (анюфтальмия, микрофтальмия и др.), мозга (мозговая грыжа и др.), лицевого черепа (заячья губа, волчья пасть и др.), конечностей, пальцев, хвоста, позвоночника, передней брюшной стенки не выявлено, что подтверждает отсутствие эмбриотоксического и тератогенного действия препарата на эмбрионы крысят.

Таблица. – Результаты изучения эмбриотоксического действия противомаститного препарата при введении белым крысам

Показатели	Группа животных				
	1-я опытная (n=5)	2-я опытная (n=5)	3-я опытная (n=5)	4-я опытная (n=5)	контрольная (n=5)
Количество мест мплантаций в матке, в среднем у одной самки	10,6±0,51	10,4±0,81	10,2±0,86	10±0,71	10,9±0,60
Количество живых плодов, в среднем у одной самки	10,6±0,51	10,4±0,81	10,2±0,86	10±0,71	10,9±0,60
Количество погибших плодов, в среднем у одной самки	0	0	0	0	0
Аномалии развития внутренних органов и скелета	отсутствуют				
Уродства	отсутствуют				
Масса эмбрионов, г	3,10±0,02	3,14±0,02	3,13±0,03	3,15±0,02	3,16±0,02

Для выяснения органогенеза в постнатальном периоде было получено потомство от двух самок из каждой группы, за которым вели клиническое наблюдение в течение двух 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. Отмечали рождение 23 крысят в первой группе, 21 крысенок – во второй, 20 крысят – в третьей, 22 крысят – в четвертой и 21 кры-

сенка – в пятой группе. Двигательная активность крысят нарушена не была. Кожные покровы целостные, сосательный рефлекс хороший. Опушение начиналось в 1-й группе на 9–11-й день, глаза полностью открылись на 16–17-й день; во 2-й группе – на 10–12-й день, глаза полностью открылись на 16–18-й день; в 3-й группе – на 9–11-й, глаза полностью открылись на 15–17-й день; в 4-й группе – на 8–10-й, глаза полностью открылись на 15–17-й день; в 5-й группе – на 9–11-й и 16–18-й день соответственно. В период срока наблюдения отклонений в поведении крысят, их развитии и физиологическом состоянии отмечено не было. Аппетит был хороший, животные подвижные.

Таким образом, препарат, применяемый в токсической дозе в различные сроки беременности (периоды эмбриогенеза, органогенеза, плодный период филогенеза и в течение всего периода беременности), не вызывает патологических изменений течения беременности у крыс, а также отклонений в развитии потомства, что свидетельствует об отсутствии у препарата тератогенных, мутагенных и эмбриотоксических свойств (оформлен акт испытаний).

Провели оценку местного раздражающего действия экспериментального образца противомаститного препарата на кожные покровы, исследование раздражающего действия на слизистые оболочки глаз и алергизирующих свойств.

В опыте по определению местного раздражающего действия на кожные покровы установлено, что препарат не обладает местным раздражающим действием на кожу животных, так как на протяжении всего периода наблюдений не отмечено каких-либо покраснений, припухлостей, болезненности и других изменений в месте применения препарата.

При определении раздражающего действия на слизистые оболочки определили, что внесение препарата в дозе 50 мг однократно в конъюнктивальный мешок глаза кроликов вызывало незначительное слезотечение и покраснение слизистой оболочки глаза, которое проходило через 30–60 ми-

нут. При дальнейшем наблюдении через 24 и 48 ч каких-либо патологических изменений со стороны конъюнктивы и склеры не отмечалось. В результате опыта установлено, что препарат не обладает раздражающим действием на слизистые оболочки и органы зрения животных, так как покраснения, припухлости, болезненности, расчесов в области конъюнктивального мешка не отмечено.

Данные изучения сенсibiliзирующих (аллергенных) свойств препарата свидетельствуют о том, что он не обладает сенсibiliзирующим действием, так как не вызывает реакции при использовании после перерыва в длительном применении.

В ходе изучения стабильности препарата установлено, что за период наблюдения (6 месяцев) характеристики показателей (содержание цефкинома) не претерпевали существенных изменений. Препарат сохраняет первоначальный вид (суспензия от белого до желтого цвета, допускается расслоение при хранении). Массовая доля входящих в состав препарата ингредиентов оставалась в пределах значений, обозначенных техническими условиями.

Результаты исследований показали, что в условиях ускоренного старения при температуре плюс 40 ± 2 °C и влажности 75 ± 5 % в течение 6 месяцев качественный и количественный состав препарата сохраняется. Следовательно, срок годности препарата ветеринарного «Мастин» составляет 2 года от даты изготовления при соблюдении условий хранения.

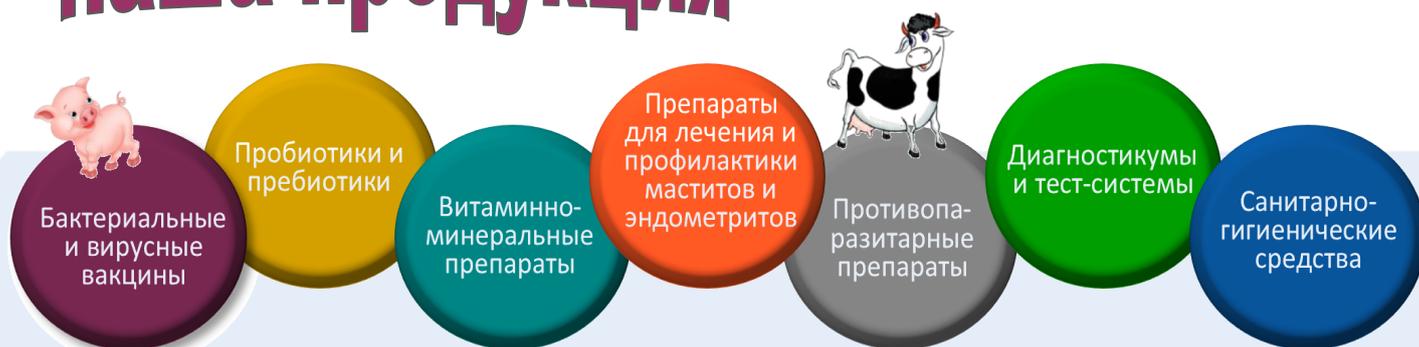
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные нами исследования подтверждают, что новый противомаститный препарат «Мастин» не обладает эмбриотоксическим и тератогенным действием, не имеет раздражающих и алергизирующих свойств. Препарат стабилен в течение 6 месяцев в условиях ускоренного старения, что соответствует сроку годности 2 года от даты изготовления при соблюдении условий хранения, а показатели качества отвечают требованиям ТУ ВУ 600049853.097.

ЛИТЕРАТУРА

1. Архипов, А. А. Адекватное лечение при острых маститах – залог благополучия стада / А. А. Архипов // *Ветеринария*. – 2008. – № 11. – С. 15–17.
2. Богуш, А. А. Мероприятия по профилактике, диагностике и лечению мастита у коров / А. А. Богуш, В. Е. Иванов, Л. М. Бородич // *Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария*. – 2008. – № 4. – С. 61–70.
3. Изучение стабильности и установление сроков годности новых субстанций и готовых лекарственных средств : метод. указания // М. Е. Пархач, А. В. Якимова, О. В. Сколубович ; утв. концерном «Белбиофарм» 21.01.2004, рег. № МУ 09140.07-2004, рег. ГКНТ № 20031459. – Минск : УП «ЛОТИОС», 2004. – 57 с.
4. Кузьмич, Р. Г. Проблемы маститов у коров в хозяйствах Республики Беларусь и пути их решения / Р. Г. Кузьмич, О. В. Кузьмич // *Ученые записки УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»*. – 2005. – Т. 41, вып. 2, ч. 3. – С. 29–31.
5. Максимович, Н. В. Взаимосвязь мастита коров с состоянием вымени / Н. В. Максимович, Н. А. Кузнецов // *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сб. науч. тр. / Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Главное управление образования, науки и кадров, УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»*. – Горки, 2012. – Вып. 15, ч. 2. – С. 233–239.
6. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии / НАН Беларуси, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского» ; сост. А. Э. Высоцкий [и др.]. – Минск, 2007. – 156 с.
7. Пониткин, Д. М. Предупреждение мастита у коров – основа повышения продуктивности и качества молока / Д. М. Пониткин, Н. Т. Климов, Н. В. Приткин // *Зоотехния*. – 2007. – № 7. – С. 21–22.
8. Соколова, Т. П. Изменение биохимического состава секрета молочных желез сухостойных коров при субклиническом мастите : сб. науч. тр. / ДонСХИ, 1990. – С. 13–14.
9. Филпот, В. Н. Как победить мастит / В. Н. Филпот, Ш. С. Никерсон. – М. : ГЕА Вестфалия Сердж, 2009. – 240 с.
10. Шахов, А. Г. Неотложные задачи профилактики мастита у коров / А. Г. Шахов, В. Д. Мисайлов // *Ветеринария*. – 2005. – № 8. – С. 3–7.
11. Hashemi, M. The prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy cows in the central region of Fars province, south of Iran / M. Hashemi, M. Kafi, M. Safdarian // *Iranian Journal of Veterinary Research*. – 2011. – Vol. 12, № 3. – P. 236–241.
12. Hogeveen, H. Economic aspects of mastitis: new developments / H. Hogeveen, K. Huijps, T. J. G. M. Lam // *New Zealand Veterinary Journal*. – 2011. – Vol. 59, № 1. – P. 16–23.
13. Occurrence, forms and etiologic agents of mastitis in Poland depending on size of farm. Występowanie, postacie i czynniki etiologiczne zapalen' wymienia w Polsce w zależności od wielkości gospodarstwa / S. Smulski [et al.] // *Medycyna Weterynaryjna*. – 2011. – Vol. 67, № 3. – P. 190–193.

наша продукция



УДК 619:616.995.1:636.39

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-64-70>

Радивил А.Н., младший научный сотрудник

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

ВЛИЯНИЕ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОБИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ОВЕЦ

Резюме

В статье представлены исследования по изучению влияния нового комплексного препарата на гематологические и иммунобиохимические показатели крови овец. В наших экспериментах по применению нового комплексного ветеринарного препарата «Вирококцид» в дозе 100 мг/кг живой массы, проведенных на овцах, спонтанно инвазированных паразитами, выявлены существенные положительные изменения в гематологических и иммунобиохимических показателях, что благоприятно отразилось на клиническом состоянии опытных животных. Побочных эффектов и токсического влияния не установлено.

Ключевые слова: овцы, паразитарные болезни, эритроциты, гемоглобин, аспаратаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, циркулирующие иммунные комплексы, общий белок, белковые фракции.

Summary

The article presents studies to study effect of a new complex drug on immunobiochemical parameters of sheep. In our experiments on use of a new complex veterinary drug virococcid at a dose of 100 mg / kg of live weight, carried out on sheep spontaneously infested with parasitosis, significant positive changes in hematological parameters of blood and in systems of cellular and humoral immunity were revealed, which made it possible to normalize processes of hematopoiesis, which favorably affected clinical state of experimental animals, toxic effect on hepatocytes was not established.

Keywords: sheep, parasitic diseases, erythrocytes, hemoglobin, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, circulating immune complexes, total protein, protein fractions.

Поступила в редакцию 16.11.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Ветеринарной практикой накоплен опыт по применению в животноводстве антгельминтных препаратов, относящихся к различным классам соединений. Количество антгельминтиков с каждым годом растет: создаются новые лекарственные средства с более широким спектром противопаразитарного действия, преимуществами в фармакокинетике и отсутствием побочного действия на организм животного [1, 3].

В создавшейся неблагоприятной эпизоотической ситуации по гельминтозам животных в Республике Беларусь плановые профилактические и вынужденные дегельминтизации остаются единственным эффективным способом противогельминтозных мероприятий при традиционных пастбищных технологиях содержания животных [2, 4]. Поэтому создание и испытание

новых противопаразитарных средств является актуальной задачей ветеринарной науки. Важно также совершенствование уже существующих антгельминтиков и поиск мер, направленных на снижение негативного действия препаратов на физиологические показатели организма животных.

Цель работы – изучить влияние нового комплексного препарата на гематологические и иммунобиохимические показатели крови овец.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в овцеводческом хозяйстве республики КФХ «Виляя-агро» Кобринского района на 60 овцах и в отделе паразитологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Изучение инвазирования овец ассоциациями паразитов желудочно-кишечного тракта проводили методами Г.А. Котельникова и В.М. Хренова (1974) для обнаружения яиц стронгилят, стронгилоид и ооцист эймерий.

Были сформированы две группы: 1-я группа – спонтанно инвазированные овцы, которым применили новый препарат, 2-я группа – интактные (свободные от паразитов) овцы, которым препарат не задавался, они служили контролем.

Изучение влияния комплексного препарата «Вирококцид» на организм животных проводили до начала применения препарата и на 7-е, 14-е и 21-е сутки.

Исследовали гематологические показатели крови (содержание эритроцитов, гемоглобина) с помощью гематологического анализатора Mythic 18, биохимические показатели сыворотки крови: циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) – по ме-

тоду Ю.А. Гриневича, А.А. Алферова (1981), общий белок, белковые фракции, включая белки системы комплемента С3 и иммуноглобулины, – методом иммуноэлектрофореза, а также проводили исследования уровня макро- и микроэлементов (кальция, фосфора и железа) в сыворотке крови с помощью биохимического анализатора «Dialab» (Австрия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакетов статистического анализа данных Excel (описательная статистика) и Statistica for Windows 10.0 («StatSoftInc.», Талса, США). Различия между изучаемыми параметрами признавались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Содержание эритроцитов в крови овец после применения виорококцида представлено в таблице 1.

Таблица 1. – Содержание эритроцитов в крови овец после применения виорококцида

Период исследований	Опытная группа	Контрольная группа
эритроциты, $10^{12}/л$		
До применения препарата	$5,37 \pm 0,54$	$6,93 \pm 0,25$
7-й день	$5,43 \pm 1,05^*$	$7,73 \pm 0,24$
14-й день	$6,85 \pm 0,14^{***}$	$6,02 \pm 0,06$
21-й день	$7,02 \pm 0,46^*$	$5,99 \pm 0,03$

Примечание – * $P < 0,05$

При анализе динамики эритроцитов установлена незначительная эритропения по сравнению с контрольной группой животных. На 14-й день наблюдалось повышение эритроцитов на 27,56 % ($P < 0,001$) по сравнению в показателем до лечения.

лечения. Следует отметить, что данный показатель приблизился к значениям группы контроля (здоровые животные).

На рисунке 1 отражены результаты исследований динамики гемоглобина в крови овец после применения виорококцида.



Рисунок 1. – Динамика количества гемоглобина в крови овец при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта после применения виорококцида

Содержание гемоглобина в крови зараженных овец до применения препарата было на 34,46 % ($P < 0,001$) ниже по сравнению с группой контроля. На 14-й день содержание гемоглобина в сыворотке крови достоверно увеличилось на 20,34 % ($P < 0,05$) по сравнению с таковым показателем до применения препарата. На конец опыта его количество достигло показателей

контрольной группы животных. Полученные данные свидетельствуют о благоприятном течении восстановительных процессов в организме овец после дегельминтизации.

Результаты исследований содержания ферментов печени после применения препарата показаны в таблице 2 и на рисунке 2.

Таблица 2. – Динамика активности аминотрансфераз в сыворотке крови при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта овец после применения вирококцида

Период исследований	Опытная группа	Контрольная группа
аспартатаминотрансфераза, ед/л		
До применения препарата	151,45±3,21	110,78±4,32
7-й день	143,27±4,17***	116,95±5,15
14-й день	124,32±3,34*	114,28±3,21
21-й день	116,12±4,74	114,39±4,46
аланинаминотрансфераза, ед/л		
До применения препарата	57,04±3,28	42,25±2,19
7-й день	54,66±3,41***	38,29±2,52
14-й день	45,71±2,34*	39,02±1,78
21-й день	41,66±3,27	42,89±2,39

Примечание – * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Уровень активности аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови овец через 14 дней после применения вирококцида снизился на 17,91 % ($P < 0,05$) в сравнении показателем до применения препарата. На 21-й день уровень активности АсАТ был ниже на 23,33 % ($P < 0,001$) по сравнению с первоначальным значением, что говорит об отсутствии токсического воздействия препарата на клетки печени.

Уровень активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) у инвазированных овец за период исследований составил 41,66–57,04 ед/л. Через 14 дней после применения вирококцида уровень активности АлАТ снизился на 14,6 % ($P < 0,05$) по отношению к показателю до лечения. Резких колебаний между опытной и контрольной группами к концу исследования не наблюдалось.

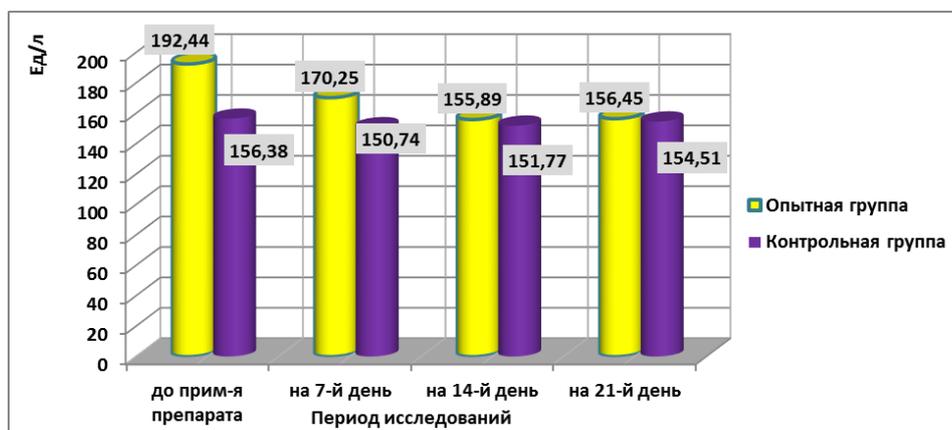


Рисунок 2. – Динамика содержания щелочной фосфатазы в сыворотке крови при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта овец после применения вирококцида, ед/л

На 7-й день после применения ви-рококцида уровень активности щелочной фосфатазы снизился на 11,53 % ($P<0,01$), на 14-й день – на 18,99 % ($P<0,05$), на 21-й день приблизился к показателям контрольной группы, где концентрация данного

фермента составляла 150,74–156,38 ед/л.

Содержание циркулирующих иммунных комплексов в крови овец после применения вирококцида представлено на рисунке 3.

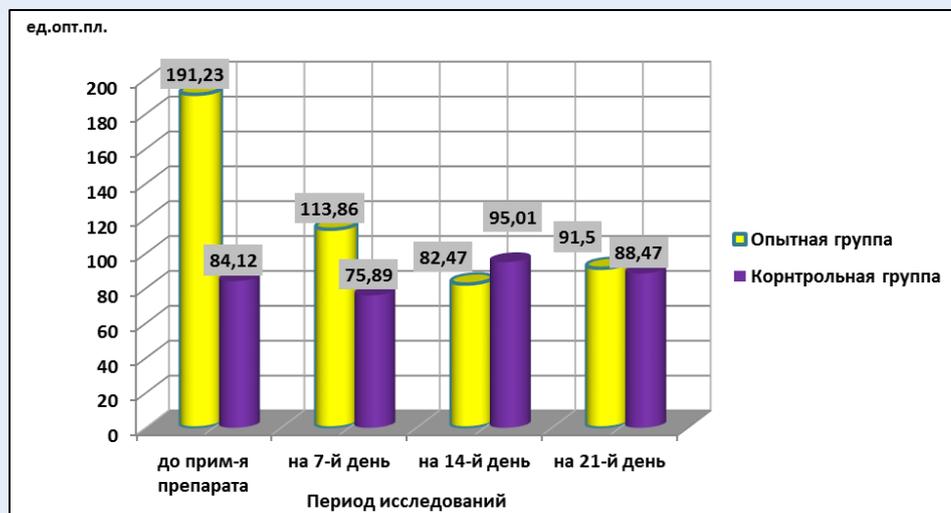


Рисунок 3. – Динамика циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта овец после применения вирококцида, ед.опт.пл.

Количество ЦИК в сыворотке крови инвазированных овец до применения препарата составляло 191,23 ед.опт.пл. Это в 2,27 раза выше, чем у животных интактной группы. На 7-й и 14-й дни исследования после применения препарата «Вирококцид» количество ЦИК в опытной группе уменьшилось в 1,67 раза ($P<0,01$) и в 2,31 раза ($P<0,001$) по сравнению с тако-

выми показателями до лечения. В этот же период показатели опытной группы животных достигли уровня свободных от паразитов желудочно-кишечного тракта овец.

В таблице 3 отражено содержание общего белка в сыворотке крови овец при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта.

Таблица 3. – Динамика общего белка в сыворотке крови овец при спонтанных ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта после применения вирококцида

Период исследований	Опытная группа	Контрольная группа
общий белок, г/л		
До применения препарата	52,67±2,58**	63,17±2,49
7-й день	54,14±2,61***	69,30±2,73
14-й день	62,03±1,19 ⁺⁺⁺	68,43±1,14
30-й день	61,38±1,45*	65,18±1,06

Примечание – ⁺⁺⁺ $P<0,001$ – по сравнению с показателем до лечения; * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ – по сравнению с показателями группы контроля

Содержание уровня общего белка в сыворотке крови инвазированных овец до применения препарата составляло $52,67 \pm 2,58$ %, что на $19,93$ % ($P < 0,01$) меньше по отношению к группе овец, свободных от паразитов. На 14-й день эксперимента количество общего белка у овец опытной группы достоверно увеличилось на $17,77$ % ($P < 0,001$) по сравнению с пока-

зателями до лечения. В этот же период у животных после применения виорокцида показатели достигли уровня неинвазированных овец. Это говорит о благоприятном воздействии препарата на иммунную систему животных.

Результаты исследований соотношения белковых фракций отражены в таблице 4.

Таблица 4. – Соотношение белковых фракций в сыворотке крови при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта овец после применения виорокцида

Период исследований	Опытная группа	Контрольная группа
альбумин, %		
До применения препарата	$31,89 \pm 2,45^{**}$	$43,29 \pm 2,58$
7-й день	$36,73 \pm 2,06^{**}$	$46,37 \pm 2,03$
14-й день	$43,38 \pm 1,15^{+}$	$47,26 \pm 1,39$
21-й день	$44,70 \pm 2,49$	$43,46 \pm 1,67$
α_1 -глобулины, %		
До применения препарата	$23,65 \pm 2,28^{**}$	$16,29 \pm 1,17$
7-й день	$21,50 \pm 0,47^{+}$	$18,93 \pm 0,84$
14-й день	$18,99 \pm 0,14^{++}$	$17,29 \pm 0,55$
21-й день	$18,21 \pm 2,63$	$17,62 \pm 1,46$
α_2 -глобулины, %		
До применения препарата	$14,23 \pm 1,37^{**}$	$8,63 \pm 1,29$
7-й день	$10,49 \pm 0,10^{++}$	$9,94 \pm 0,14$
14-й день	$9,37 \pm 0,21^{+++}$	$8,09 \pm 0,15$
21-й день	$8,52 \pm 1,28$	$9,88 \pm 1,56$
β -глобулины (белки системы комплемента C_3), %		
До применения препарата	$6,31 \pm 1,28^{**}$	$11,63 \pm 1,17$
7-й день	$9,23 \pm 0,62^{+++}$	$12,98 \pm 0,35$
14-й день	$11,94 \pm 0,18^{***}$	$10,61 \pm 0,22$
21-й день	$11,55 \pm 0,64$	$11,13 \pm 1,92$
γ -глобулины (иммуноглобулины), %		
До применения препарата	$21,33 \pm 1,63^{***}$	$30,28 \pm 1,52$
7-й день	$23,04 \pm 2,83$	$29,62 \pm 2,41$
14-й день	$29,43 \pm 0,32^{***}$	$31,26 \pm 0,27$
21-й день	$30,32 \pm 1,59$	$31,72 \pm 2,26$

Примечание – $^{+}P < 0,05$; $^{++}P < 0,01$; $^{+++}P < 0,001$ – по сравнению с показателем до лечения; $^{*}P < 0,05$; $^{**}P < 0,01$; $^{***}P < 0,001$ – по сравнению с показателями группы контроля

Уровень содержания альбумина в сыворотке крови свободных от паразитов овец имел значения от $43,29$ до $47,26$ %, у животных инвазированной группы показатели имели более низкие значения. До применения препарата количество альбумина в крови овец составляло $31,89$ %, что на $35,74$ % ($P < 0,01$) ниже, чем у животных

контрольной группы. На 14-й день после дегельминтизации препаратом уровень альбумина у инвазированных овец достоверно увеличился на $36,03$ % ($P < 0,05$) в сравнении с показателями до лечения. В этот период полученные данные опытной группы овец достигли показателей интактных животных.

У интактной группы овец уровень α_1 -глобулинов в сыворотке крови на протяжении всего периода исследования находился в пределах 16,29–18,93 %. Содержание данного показателя у инвазированных животных до лечения составляло 23,65 %, что на 31,12 % ($P<0,01$) выше, чем у овец, свободных от паразитов. На 7-й и 14-й дни эксперимента, после применения препарата, содержание α_1 -глобулинов в сыворотке крови достоверно уменьшилось на 9,09 % ($P<0,05$) и на 19,70 % ($P<0,01$) по сравнению с показателями до лечения. В этот период исследований содержание α_1 -глобулинов у обработанных овец приравнивалось к показателям животных, свободных от паразитов. Количество α_2 -глобулинов в сыворотке крови инвазированных овец до применения препарата составляло 14,23 %, что на 39,35 % ($P<0,01$) выше, чем у свободных от паразитов животных. На 7-й и 14-й дни исследований наблюдается достоверное уменьшение данных показателей на 26,28 % ($P<0,01$) и 34,15 % ($P<0,001$) по сравнению с группой контроля. В этот период результаты первой группы достигли

показателей интактных животных. На 7-й день после применения препарата у овец инвазированной группы уровень β -глобулинов в сыворотке крови достоверно увеличился на 46,27 % ($P<0,001$) по сравнению овцами, свободных от паразитов. На 14-й день исследования содержание β -глобулинов в крови обработанных вирококцидом овец приравнялась к показателям интактных животных – 10,61–12,98 %.

При исследовании фракции γ -глобулинов в сыворотке крови инвазированных овец на 14-й день достоверное изменение было на 37,97 % ($P<0,001$) выше по сравнению с таковым показателем до дегельминтизации. В этот же период показатели овец опытной группы достигли уровня незараженных животных, у которых содержание данной фракции варьировало в пределах 29,62–31,72 %.

Динамика изменения иммунобиохимических показателей (кальций, фосфор, железо) в сыворотке крови овец после применения вирококцида представлена в таблице 5.

Таблица 5. – Динамика иммунобиохимических показателей в сыворотке крови при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта овец после применения вирококцида

Дни исследования	Опытная группа	Контроль
кальций, мг/л		
До применения препарата	87,34±3,95***	113,91±3,67
7-й день	93,77±2,52 ⁺⁺	116,80±3,89
14-й день	112,41±1,12 ⁺⁺	117,07±1,16
21-й день	111,85±2,77	113,29±2,16
фосфор, мг/л		
До применения препарата	41,12±1,96***	62,37±2,47
7-й день	47,83±2,28***	63,81±1,52
14-й день	61,74±1,42 ⁺⁺	67,22±1,08
21-й день	60,58±2,96	65,17±2,54
железо, мкг/л		
До применения препарата	1839±146,31**	2638±149,50
7-й день	1970±48,10***	2534±55,26
14-й день	2413±33,29 ⁺⁺⁺	2617±39,14
21-й день	2391±55,23***	2499±42,75

Примечание – ⁺⁺ $P<0,01$; ⁺⁺⁺ $P<0,001$ – по сравнению с показателем до лечения; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ – по сравнению с показателями группы контроля

У овец опытной группы количество кальция в сыворотке крови до дегельминтизации составляло 87,34 мг/л, что в 1,30 раза ($P<0,001$) меньше, чем у животных, свободных от паразитов желудочно-кишечного тракта. На 7-й и 14-й дни после получения препарата уровень кальция в крови инвазированных овец достоверно увеличился в 1,07 раза ($P<0,001$) и в 1,28 раза ($P<0,01$) соответственно в сравнении с показателями до лечения. Уровень кальция у овец зараженной группы в этот период опыта был приближен к уровню овец контрольной группы.

Количество фосфора в сыворотке крови инвазированных овец до применения препарата составляло 41,12 мг/л, что в 1,51 раза ($P<0,001$) ниже, чем у интактных овец. На 14-й день после дегельминтизации препаратом содержание фосфора в сыворотке крови овец опытной группы достоверно увеличилось в 1,50 раза ($P<0,01$) в сравнении с показателем до лечения, тем самым был достигнут уровень свободных от паразитов желудочно-кишечного тракта животных.

Уровень железа в сыворотке крови инвазированных овец до применения препарата «Вирококцид» составлял 1839 мг/л,

что в 1,43 раза ($P<0,01$) ниже, чем у животных контрольной группы. На 14-й день после дегельминтизации количество железа в крови овец достоверно увеличилось в 1,31 раза ($P<0,001$) по сравнению с таковыми показателями до лечения, тем самым был достигнут уровень интактных животных.

ВЫВОДЫ

1. Применение вирококцида способствовало увеличению числа эритроцитов на 27,56 % ($P<0,001$), гемоглобина – на 20,34 % ($P<0,05$), общего белка – на 17,77 % ($P<0,001$), альбумина – на 36,03 % ($P<0,05$), β -глобулинов – на 46,27 % ($P<0,001$), γ -глобулинов – на 37,97 % ($P<0,001$), кальция – в 1,28 раза ($P<0,01$), фосфора – в 1,50 раза ($P<0,01$), железа – в 1,31 раза ($P<0,001$) по сравнению с показателями до применения препарата.

2. После дегельминтизации препаратом «Вирококцид» в крови овец уменьшилось количество α_1 -глобулинов на 19,70 % ($P<0,01$), α_2 -глобулинов – на 34,15 % ($P<0,001$), ЦИК – в 2,31 раза ($P<0,001$), АсАТ – на 23,33 % ($P<0,001$), АлАТ – на 14,6 % ($P<0,05$), щелочной фосфатазы – на 18,99 % ($P<0,05$) по отношению к показателям до лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Багманова, Н. Н. Комплексная терапия животных при гельминтозах с использованием антгельминтиков и иммуномодуляторов : дис. ... канд. ветеринар. наук : 03.00.19 ; 16.00.03 / Н. Н. Багманова. – Самара, 2003. – 130 л.
2. Иммуитет и его коррекция в ветеринарной медицине / П. А. Красочко [и др.] ; Белорус. науч.-исслед. ин-т эксперим. ветеринарии, Витеб. гос. акад. ветеринар. медицины ; под ред. П. А. Красочко. – Смоленск : [б. и.], 2001. – 340 с.
3. Кузьмин, А. А. Антгельминтики в ветеринарной медицине / А. А. Кузьмин. – М. : Аквариум, 2000. – 142 с.
4. Якубовский, М. В. Новые препараты против паразитарных болезней животных / М. В. Якубовский // Белорусское сельское хозяйство. – 2004. – № 5. – С. 23–24.

УДК 619:616.72-002:636.7

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-71-78>

Кучинский М.П., доктор ветеринарных наук, профессор

Сонов А.А., научный сотрудник

Кучинская Г.М., научный сотрудник

Макаревич В.К., аспирант

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

ЛЕЧЕБНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА «АКТИВЕТ МАКСИ» ПРИ АРТРИТАХ У СОБАК

Резюме

В статье приводятся данные научно-производственного опыта по изучению терапевтической эффективности комплексного препарата «АктивЕТ МАКСИ» при артрите у собак. Установлено, что при ежедневном его применении из расчета 1 таблетка на 12,5 кг массы тела выздоровление животных наблюдалось преимущественно на 25–30 дни лечения.

Ключевые слова: собаки, артриты, кровь, препарат, терапия, эффективность.

Summary

The article presents data from scientific and industrial experience on the study of the therapeutic effectiveness of the complex drug «Activet MAXI» for arthritis in dogs. It was found that with its daily use at the rate of 1 tablet per 12.5 kg of body weight, the recovery of animals was observed mainly on the 25–30 day of treatment.

Keywords: dogs, arthritis, blood, a drug, therapy, efficiency.

Поступила в редакцию 30.11.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Артриты у собак диагностируются довольно часто, однако эффективность лечения при данной патологии оставляет желать лучшего. Неудовлетворительные результаты терапии связаны прежде всего с особенностями развития патологического процесса в таком сложном и функционально значимом анатомическом образовании, которым является сустав, и низкой эффективностью существующих ветеринарных препаратов [2, 5, 9]. Из всех типов артритов у собак чаще диагностируется остеоартроз, представляющий собой дегенеративное заболевание, при котором происходит постепенное замещение гиалинового суставного хряща на неполноценный в функциональном отношении волокнистый хрящ [9]. В суставе также возникает асептическое воспаление, но оно не имеет отношения ни к инфекционным, ни к ревматоидным процессам.

К основным причинам остеоартроза

у собак относят аномалии роста, нарушение формы конечностей, дефекты развития суставов, механическое воздействие, травмы, ожирение и повышенную активность. Дегенеративные изменения в суставном хряще, снижающие его амортизационную способность, могут отмечаться также на фоне естественного старения хряща, когда он теряет способность удерживать воду [3, 4, 10].

Острые артриты проявляются в виде внезапной хромоты, отека, повышения местной температуры и боли. В ответ на последнюю отмечается спазм сосудов. В результате ухудшается питание сустава, а продолжительная боль из физиологической переходит в патологическую, что еще более усиливает спазм сосудов и нарушает нормальное кровообращение сустава и околоуставных тканей [2, 6, 8].

В зависимости от этиологии, типа воспаления сустава и длительности процесса нарушения могут отмечаться со сто-

роны хряща, кости, синовиальной оболочки и связок.

По мнению ряда авторов, от момента начала заболевания до появления первых признаков деструкции суставного хряща проходит всего несколько суток [4, 9, 8].

Диагностика артритов традиционно включает клиническое обследование, пункцию полости сустава с последующей оценкой характера полученной синовиальной жидкости с помощью микробиологического и цитологического исследования, инструментальные и лабораторные методы исследования [1, 2, 3, 9]. Клиническая картина остеоартроза зависит от распространенности патологического процесса и объема пораженных тканей, а также от причины его возникновения. Внешне он проявляется прежде всего хромотой опирающегося типа. При ней после длительного покоя собака сильно хромает, но затем при движении хромота постепенно уменьшается. В периоды обострений болевого синдрома бывает хромота «висячей конечности». Если животное хромает длительно, то можно обнаружить атрофию мышц большой конечности. При тщательном осмотре иногда можно выявить увеличение сустава в объеме. С помощью пальпации обнаруживают ограничение подвижности в суставе, болезненность, а иногда и крепитацию [2, 3, 6, 9].

С учетом того, что первые рентгенологические изменения в суставе в виде расширения суставной щели, остеопороза сочленяющихся концов костей, деструктивных очагов в эпифизах костей можно обнаружить лишь спустя 10–20 дней от начала заболевания [8], то в качестве дополнительных методов обследования, кроме рентгенографии, применяют также компьютерную и магнитно-резонансную томографию. Однако существует мнение, что остеоартрит, в отличие от других форм воспаления сустава, можно диагностировать с помощью традиционных методов [2, 9].

Хирургические операции при асептических артритах собак в силу ряда причин выполняются редко, поэтому чаще назначается медикаментозное лечение. Оно базируется, как правило, на использовании

нестероидных и стероидных противовоспалительных средств, которые имеют противопоказания и не лишены побочного действия в виде язвенных поражений в желудке и кишечнике, крапивницы, бронхоспазма, усиления воспалительных процессов в суставе, нарушения работы собственной эндокринной системы, ослабления иммунной защиты организма и т.д. С учетом вышеизложенного, а также многофакторной этиологии и сложного патогенеза артритов в последнее время стали широко использоваться комплексные ветеринарные препараты, в том числе и на основе так называемых хондропротекторов, являющихся составными компонентами или предшественниками многих элементов сустава [2, 7].

Целью исследований явилась оценка лечебной эффективности нового комплексного препарата «АктиВЕТ МАКСИ» при асептических артритах собак.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Испытания по изучению терапевтической эффективности ветеринарного препарата «АктиВЕТ МАКСИ» (производитель ООО «Фарма ПЕТ ГИГИ», Латвия) проводились в клинике ООО «Кот и пес» (г. Витебск). Препарат (серия 8901) по внешнему виду представляет собой таблетки круглой формы массой 2400 мг серо-бежевого цвета с легким специфическим запахом, с разделительной бороздкой на одной из сторон.

В одной таблетке содержится: метилсульфонилметан (МСМ) – 385 мг; D-глюкозамин – 360 мг; коллаген – 360 мг; хондроитин – 80 мг; гиалуроновая кислота – 20 мг; кальция аскорбат – 96 мг; экстракт босвеллии – 24 мг и вспомогательные вещества – декстроза, кальция гидрогенфосфат, микрокристаллическая целлюлоза, улучшитель вкуса, стеарат магния.

Метилсульфонилметан (МСМ) – органическое серосодержащее соединение, которое является ключевым метаболитом диметилсульфоксида (ДМСО), содержит 34 % органической серы. МСМ входит в состав многих эндогенных белков, в том

числе белков соединительной ткани – коллагена, эластина, кератина, и других метаболически активных соединений. Оказывает противовоспалительное, обезболивающее и антиоксидантное действие.

Глюкозамин – моноаминосахарид, который является важным компонентом в биохимическом синтезе гликозилированных белков (предшественник гликозаминогликанов) и липидов. Присутствует во всех соединительных тканях, но в наибольшем количестве – в суставных элементах (хрящах и синовиальной жидкости). Питает хрящевую ткань, способствует её естественному обновлению, улучшает структурное состояние суставов и позвоночника, поддерживает их функциональную способность.

Хондроциты используют глюкозамин для построения и восстановления хрящевой ткани и для выработки гиалуроновой кислоты. Глюкозамин также необходим для построения молекулы хондроитина. Дополнительное введение глюкозамина приводит к увеличению способности хондроцитов синтезировать мукополисахариды, необходимые для нормального функционирования суставов.

Гиалуроновая кислота представляет собой несulfированный гликозаминогликан, полимер, состоящий из остатков D-глюкуроновой кислоты и D-N-ацетилглюкозамина, соединённых поочередно гликозидными связями. Входит в состав многих биологических жидкостей (слюна, синовия и др.), соединительной, эпителиальной и нервной тканей. Является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса. Принимает значительное участие в пролиферации и миграции клеток, а также участвует в ряде взаимодействий с их поверхностными рецепторами. Гиалуроновая кислота связывает воду в межклеточных пространствах, повышая тем самым сопротивление тканей сжатию, участвует в транспорте и распределении воды в тканях и в ионном обмене. В соединительной ткани при помощи белковых связей гиалуроновая кислота связывается с протеогликанами (сульфаты хонд-

роитина, глюкозамина и кератана). Именно такая структура обеспечивает эластичность хряща, его устойчивость к нагрузкам и компрессии.

Хондроитин – высокомолекулярный мукополисахарид, sulfатированный гликозаминогликан, содержащийся в хрящевой ткани, макромолекулы которого состоят из чередующихся мономерных звеньев N-ацетил-D-галактозамина и D-глюкуроновой кислоты. Линейные макромолекулы хондроитина делают хрящ более устойчивым к давлению, которое оказывает на него вес тела. Данный полисахарид принимает также участие в построении основного вещества костной ткани, в формировании связок, а также в поддержании упругости и эластичности суставной сумки и стенок кровеносных сосудов, в синтезе суставной жидкости.

Коллаген – полиморфный белок животного происхождения, синтезируемый разными клетками соединительной ткани (фибробластами, хондробластами, остеобластами), эпителиоцитами и эндотелиоцитами, а потому представлен довольно большой группой трехспиральных белковых молекул. В настоящее время известно около 20 типов коллагена, которые отличаются друг от друга первичной структурой пептидных цепей, функциями и локализацией в организме. Вариантов α -цепей, образующих тройную спираль, около 30. Общее для всех коллагенов – то, что они являются основным структурным белком межклеточного матрикса, который определяет механические свойства тканей животных и человека.

Абсолютное большинство (примерно 95 %) всего коллагена в организме животных и человека приходится на коллагены 1, 2 и 3-го типа, которые называют интерстициальными. Они образуют очень прочные фибриллы, являющиеся основными структурными компонентами органов и тканей, которые испытывают постоянную или периодическую механическую нагрузку (кости, сухожилия, хрящи, межпозвоночные диски, кровеносные сосуды), а также участвуют в образовании стромы паренхиматозных органов.

Аскорбат кальция – это активный метаболит витамина С, который обладает нейтральным рН и при попадании в желудок не разрушает его стенки. Способствует укреплению иммунной системы, снижению аллергических симптомов, заживлению ран и ускорению выработки коллагена, очищению организма от токсинов, поддерживает организм в стрессовых ситуациях.

Экстракт босвелии. Босвелия – тропическое растение, содержащее полисахариды, кислоты, терпены, эфирные масла и другие полезные вещества. Экстракт босвелии обладает противовоспалительными, анальгетическими, антисептическими, мочегонными, ранозаживляющими и другими свойствами. Механизм противовоспалительного действия босвелиевой кислоты основан на блокировании синтеза лейкотриенов и аналогичен действию нестероидных противовоспалительных препаратов. Кроме того, она препятствует высвобождению лизосомальных ферментов, снижает выведение структурных компонентов хрящевой ткани, таких как гидроксипролин, гексозамины и уроновая кислота, в результате чего замедляются процессы разрушения хряща и активизируются восстановительные процессы.

Для оценки лечебной эффективности препарата были сформированы опытная и контрольная группы по 6 особей в каждой из собак разных пород, поступавших на амбулаторный приём. Группы формировались по мере поступления в клинику собак с артритами. При постановке диагноза учитывали данные анамнеза, результаты общих и рентгенологических методов клинического исследования. Кроме того, в начале лечения, а затем через 30–35 дней отбирали пробы крови для определения биохимических показателей.

Исследование крови проводили в аккредитованной лаборатории ООО «Кот и пес», соответствующий требованиям iso/IEC 17025 (регистрационный № Ву/1122.4062) с использованием анализатора электролитов EASYLYTE CALCIUM NA/K/Ca/pH со стартовым комплектом (Medica Corp., США), биохимических анализато-

ров «Фотометр РМ 2111» (ЗАО «СОЛАР», Республика Беларусь, г. Минск) и Bio Systems A15 автомат («Biosystems S.A.», Испания), автоматического гематологического анализатора Mythic 18 серии 100416-009075 Tested by: CW («Orphee», Швейцария), а также портативного рентген-аппарата EcoRay 1040HF («EcoRay», Южная Корея) с системой компьютерной радиологии Carestream Directview Vita CR System.

Собакам опытной группы препарат «АктиВЕТ МАКСИ» применяли один раз в сутки из расчета 1 таблетка на 12,5 кг массы. При этом первые 7 дней препарат назначали в дозе, увеличенной в два раза.

Животным контрольной группы применяли препарат «Глюкогекстрон плюс» (производитель ООО «Полидэкс», РФ) в соответствии с инструкцией по применению.

Длительность лечения животных зависела от их состояния, оцененного по результатам основных методов клинического исследования, рентгенографии и лабораторного анализа проб крови, которые отбирались в начале и в конце испытаний.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клинические испытания ветеринарного препарата «АктиВЕТ МАКСИ» показали, что у собак опытной и контрольной групп выздоровление наблюдалось преимущественно на 25–30-й дни лечения, при этом существенных межгрупповых различий не установлено.

Результаты морфологического исследования крови собак контрольной и опытной групп представлены в таблице 1.

Анализ данных таблицы 1 показывает, что на фоне проведенной терапии у собак контрольной и опытной групп содержание в крови эритроцитов увеличилось на 5,8 и 13,9 %, гемоглобина – на 7,5 и 15,7 %, гематокрита – на 11,6 и 18,6 % и тромбоцитов – на 19,9 и 9,6 % соответственно.

В процессе лечения в отношении количества лейкоцитов наблюдалась противоположная динамика. Вместо наблюдаемого в начале лечения собак обеих групп

нейтрофильного лейкоцитоза в конце испытаний произошло значительное (на 39,9–42,5%) снижение количества лейкоцитов, при этом содержание сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов у животных обеих групп нормализовалось и соответ-

ствовало референтным значениям. Следует также отметить, что при повторном исследовании крови существенных межгрупповых различий по анализируемым морфологическим показателям не выявлено.

Таблица 1. – Морфологические показатели крови собак после применения препарата «АктиВЕТ МАКСИ»

Показатель и ед. измерения (референтные значения)	Начало испытаний		Конец испытаний	
	группа		группа	
	контрольная	опытная	контрольная	опытная
Эритроциты, $10^{12}/л$ (5,2–8,4)	7,75±0,73	7,28±0,42	8,20±0,48	8,29±0,49
Гемоглобин, г/л (120–180)	142,01±4,74	139,80±3,43	152,60±4,23	161,80±4,68
Гематокрит, % (38–57)	46,44±2,97	44,56±2,27	51,82±2,45	52,80±2,46
Тромбоциты, $10^9/л$ (149–460)	328,40±57,22	365,60±48,28	394,00±32,97	400,80±40,83
Лейкоциты, $10^9/л$ (6–17)	17,66±0,77	18,50±0,93	10,62±1,33	10,64±1,05
Сегментоядерные нейтрофилы, % (40–71)	81,86±4,71	82,74±2,84	65,26±4,27	62,20±2,56
Лимфоциты, % (21–40)	15,62±1,44	13,40±1,29	29,65±2,89	31,60±3,08

Данные биохимического исследования крови собак контрольной и опытной групп представлены в таблице 2.

Из анализа таблицы 2 видно, что в конце испытаний у собак опытной группы по сравнению с животными контрольной отмечались более высокие значения уровня общего белка (на 2,5 %) и альбумина (на 4,4 %), что может свидетельствовать об отсутствии негативного влияния испытуемого препарата на функцию гепатоцитов. Это подтверждается также результатами определения активности аминотрансфераз, особенно аланинаминотрансферазы, уровень которой у животных опытной группы снизился с 53,34±10,47 до 38,96±4,56 ЕД/л и был на 15,3 % ниже, чем у собак контрольной группы. Следует отметить, что на фоне лечения у животных обеих групп сущест-

венно снизилось содержание лактатдегидрогеназы, креатинкиназы и щелочной фосфатазы, однако достоверных межгрупповых различий не выявлено.

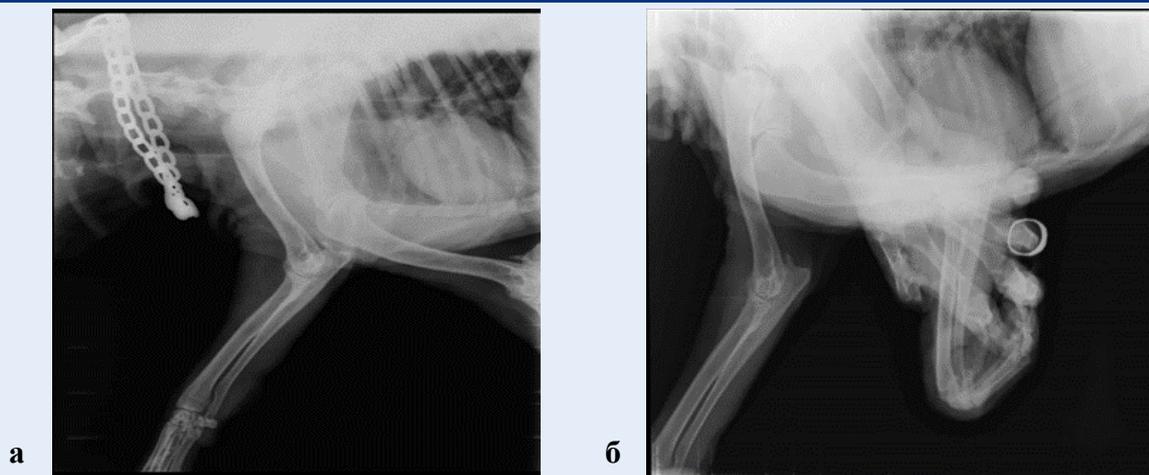
Что касается содержания макроэлементов в сыворотке крови, то существенных различий по ним между контрольной и опытной группами не обнаружено. Тем не менее, отмечалась тенденция более значимого их повышения у собак, которым применяли препарат «АктиВЕТ МАКСИ». Следует отметить также положительное влияние обоих препаратов на уровень ионизированного кальция, но достоверных различий по данному показателю у собак контрольной и опытной групп также не выявлено.

Таблица 2. – Биохимические показатели сыворотки крови собак после применения препарата «АктиВЕТ МАКСИ»

Показатель и ед. измерения (референтные значения)	Начало испытаний		Конец испытаний	
	группа		группа	
	контрольная	опытная	контрольная	опытная
Белок общий, г/л (40–73)	70,28±2,58	70,92±2,69	70,94±1,47	72,74±1,49
Альбумин, г/л (22–39)	34,32±0,63	33,94±1,20	35,04±0,93	36,58±1,01
Глюкоза, моль/л (4,3–7,3)	5,37±0,14	5,45±0,17	5,56±0,19	5,54±0,09
Креатинин, мкмоль/л (26–120)	113,25±7,30	110,80±9,77	119,20±3,92	115,80±3,67
Мочевина, моль/л (3,5–9,2)	5,87±0,34	5,74±0,54	7,02±0,36	7,16±0,55
Аланинаминотрансфераза, ЕД/л (4–60)	52,32±7,99	53,34±10,47	46,00±4,42	38,96±4,56
Аспаратаминотрансфераза, ЕД/л (10–75)	33,04±3,78	32,22±4,35	32,90±2,71	31,86±6,01
Лактатдегидрогеназа, ЕД/л (23–164)	162,41±19,59	150,80±34,83	94,20±11,89	96,00±16,15
Креатинкиназа, ЕД/л (32–157)	187,48±33,08	188,40±43,38	137,00±24,40	138,40±35,20
Щелочная фосфатаза, ЕД/л (18–75)	161,80±16,28	158,36±19,85	62,40±5,58	60,40±8,00
Хлориды, ммоль/л (96–118)	110,14±5,37	107,18±5,65	108,96±2,69	109,34±3,36
Кальций, ммоль/л (2,3–3,3)	2,52±0,06	2,59±0,09	2,90±0,06	2,91±0,05
Фосфор, ммоль/л (1,1–3,0)	1,21±0,09	1,17±0,10	1,14±0,03	1,21±0,04
Магний, ммоль/л (0,8–1,4)	0,93±0,05	0,91±0,07	0,92±0,05	0,94±0,06
Калий, ммоль/л (3,5–5,1)	3,89±0,18	3,93±0,23	4,10±0,14	4,11±0,12
Кальций ионизированный, ммоль/л (1,1–1,4)	1,19±0,02	1,21±0,01	1,39±0,02	1,38±0,02

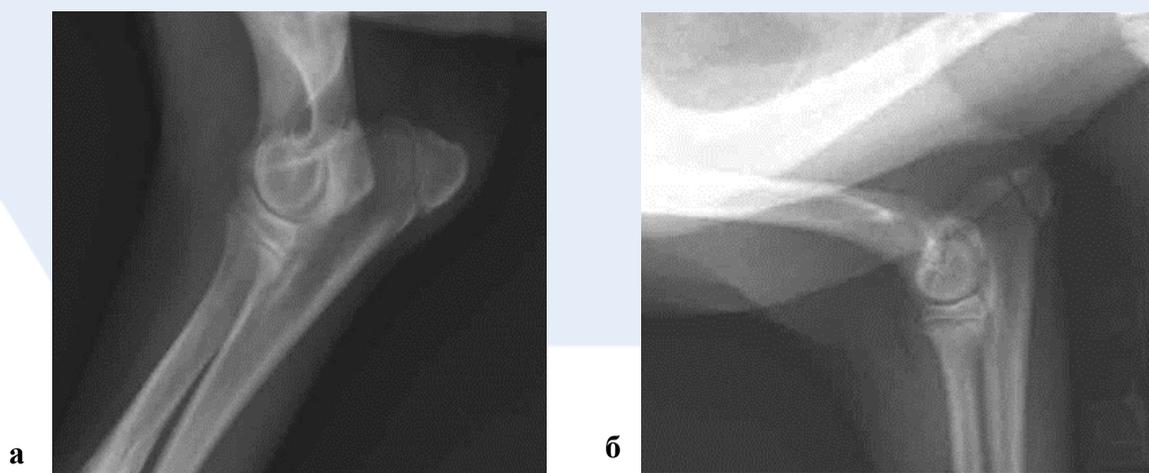
В качестве примера представляем рентгеновские снимки локтевых суставов одного из животных опытной (рисунок 1)

и контрольной (рисунок 2) групп, сделанные в начале и в конце терапии.



а – до лечения; б – после лечения

Рисунок 1. – Локтевой сустав собаки опытной группы



а – до лечения; б – после лечения

Рисунок 2. – Локтевой сустав собаки контрольной группы

Из рисунков 1 и 2 видно, что у собак опытной и контрольной групп в конце лечения произошло уменьшение контрастности мягкотканых структур, окружающих локтевой сустав, что свидетельствует о снижении воспалительного процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Артриты животных относятся к широко распространенным воспалительным заболеваниям суставов, поражающих их синовиальную оболочку, капсулу (суставную сумку) и суставной хрящ. Имеется много заболеваний суставов или патологических процессов, при которых артрит является частым, а порой ведущим их проявлением. В зависимости от причины заболевания артриты подразделя-

ются на инфекционные и неинфекционные. Причиной инфекционных артритов могут быть различные возбудители – бактерии, вирусы и грибы. Неинфекционные артриты обусловлены травмами, заболеваниями крови, печени, кожи, аутоиммунными процессами, нарушениями обмена веществ и эндокринных органов.

Большинство исследователей считает, что пусковыми моментами в развитии артритов, особенно хронических, является наследственность в сочетании с воздействием многочисленных предрасполагающих факторов, к которым также относят эндокринные и метаболические нарушения.

Представленный для клинических испытаний комплексный ветеринарный препарат «АктиВЕТ МАКСИ» (производитель ООО «Фарма ПЕТ ГИГИ», Латвия) содержит в своем составе ряд действующих веществ (метилсульфонилметан, глюкозамин, хондроитин, гиалуроновая кисло-

та, коллаген, кальция аскорбат, экстракт босвеллии), способных оказывать влияние на проявление и основные механизмы воспалительных заболеваний суставов. Анализ полученных данных позволяет заключить, что он безопасен для собак и эффективен при неинфекционных артритах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берёзкин, А. Г. Синовиальная жидкость суставов конечностей млекопитающих / А. Г. Берёзкин. – Киев : Наукова думка, 1987. – 164 с.
2. Борисов, М. С. Диагностика, лечение, профилактика закрытых и открытых повреждений суставов и сухожилий у животных : автореф. дисс. д-ра ветеринар. наук : 16.00.05 / М. С. Борисов // МГАВМиБ им. К.И. Скрябина. – М., 2001. – 41 с.
3. Карлсон, Д. Дж. Домашний ветеринарный справочник для владельцев собак / Д. Дж. Карлсон, Дж. М. Гиффон ; пер. с англ. – М. : ЗАО «Изд-во Центрполиграф», 2002. – 572 с.
4. Кашин, А. С. Оказание хирургической помощи собакам / А. С. Кашин, Н. И. Левченко // Ветеринария. – 1994. – № 3. – С. 50–54.
5. Колесниченко, И. С. Применение лазерного излучения в послеоперационный период у собак / И. С. Колесниченко, С. В. Тимофеев, Т. В. Супрунова // Ветеринария. – № 7. – 2002. – С. 53–54.
6. Коротков, А. В. Патогенетическая терапия асептического и гнойного артрита у собак и телят : автореф. дис... канд. биол. наук : 06.02.03 / А. В. Коротков. – Казань, 2013. – 18 с.
7. Лаврова, Н. А. Эффективность гиалуроновой кислоты при лечении артритов у собак / Н. А. Лаврова // Ветеринарная клиника. – 2004. – № 7. – С. 13–15.
8. Рентгенологическая оценка артрозов и артритов локтевого сустава у собак / И. В. Шабалаев [и др.] // Вопросы общей биологии в ветеринарии : сб. науч. тр. МГАВМиБ им. К.И. Скрябина. – М., 2000. – С. 23–25.
9. Сотников, В. В. Диагностика и лечение артритов у собак / В. В. Сотников, И. В. Марцинковская // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2010. – № 2 (6). – С. 38–41.
10. Эффективность применения димексида на фоне патогенетической терапии при асептическом синовите у собак / А. В. Коротков [и др.] // Вестник научных трудов молодых ученых Горского государственного аграрного университета. – Владикавказ, 2012. – Вып. 49. – С. 45–47.

препарат ветеринарный

ХРОМАРЦИН



ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГИПОМИКРОЭЛЕМЕНТОЗОВ,
ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА МОЛОДНЯКА
И ЕГО СОХРАННОСТИ



наночастицы железа, цинка, марганца

- стимулируют синтез металлозависимых ферментов, которые улучшают работу сердечной мышцы;
- ускоряют ключевые биохимические процессы;
- повышают обмен веществ

УДК 636.2.083.3:631.223.2

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-79-88>Шамонина А.И., научный сотрудник¹Шамонина А.И., кандидат сельскохозяйственных наук²¹РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», г. Жодино²УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно

НОРМЫ ВНЕСЕНИЯ СОЛОМЕННОЙ ПОДСТИЛКИ В СЕКЦИИ ДЛЯ СОДЕРЖАНИЯ СУХОСТОЙНЫХ ЖИВОТНЫХ

Резюме

В статье представлены результаты исследовательской деятельности по установлению оптимальной нормы внесения соломенной подстилки в секции для сухостойных животных, дана экономическая оценка. С этой целью изучены этологические реакции животных, комфортность их содержания и термометрические показатели соломенной подстилки.

Экспериментальные исследования проводили в филиале агрофирмы «Лебедево» РУП «Минскэнерго» Молодечненского района. Объектом исследований были сухостойные коровы и нетели голштинизированной белорусской черно-пестрой породы, распределенные по четырем группам (1 контрольная и 3 опытных) по 30 голов в каждой. Различия между группами состояли в количестве вносимой соломенной подстилки. В результате исследований установлено, что для животных, содержащихся в секциях 8×15 м, оптимальным является внесение подстилки из расчета 4,5 кг/гол., в секциях с разделением на зоны кормления (3×18 м) и отдыха (4,5×18 м) – не менее 3,0 кг/гол.

Ключевые слова: сухостойные коровы, секции, соломенная подстилка, комфортность условий содержания, нормы внесения подстилки, этологические реакции, экономическая эффективность.

Summary

The article presents the results of research activities to establish the optimal rate of straw bedding in sections for dry animals, an economic assessment is given. For this purpose, the ethological reactions of animals, the comfort of keeping animals and thermometric indicators of the straw bedding were studied.

Experimental studies were carried out in the branch of the Agrofirma «Lebedevo» RUE «Minskenergo» Mladetchno region. The objects of research were dry cows and heifers of the Holsteinized Belarusian Black-and-White breed, divided into four groups (1 control and 3 experimental), 30 heads each. The differences between the groups consisted in the amount of straw bedding applied. As a result of the research, it was found that for animals in sections 8×15 m, 4.5 kg/head is optimal, in sections with a division into a feeding zone (3×18 m) and rest (4.5×18 m) – at least 3.0 kg/head.

Keywords: dry cows, sections, straw bedding, comfort of keeping conditions, bedding rates, ethological reactions, economic efficiency.

Поступила в редакцию 19.11.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

От того, насколько высок уровень содержания животных, зависит, будет ли крупный рогатый скот здоровым и продуктивным. Качественного кормления недостаточно, большую роль играет уход за коровами, особенно соблюдение санитарно-гигиенических требований [1]. К таким требованиям следует отнести качественную подстилку. В настоящее время для изготовления подстилки используются различные материалы: песок, опилки, струж-

ка, солома, резиновые маты и др. Каждый из них имеет как свои достоинства, так и недостатки. Вместе с тем, подстилочный материал должен отвечать ряду требований: быть всегда в наличии, обеспечивать мягкое и удобное лежание животных, обладать низкой теплопроводностью для отдыха коров в осенне-зимний период, не прилипать к коровам, но легко впитывать в себя влагу, навоз. В зимний период подстилка не должна замерзать и становиться скользкой. Коровы должны легко вставать

и передвигаться. Подстилка не должна содержать травмоопасных включений (каменей, металла и т.д.), должна быть удобной для дальнейшей переработки [2]. Большую роль играет и экономическая сторона вопроса: производство подстилочного материала должно быть рентабельным.

Производители и поставщики оборудования для животноводческих помещений продолжают спорить, какой вид подстилки для крупного рогатого скота является самым эффективным и рациональным. Однако основным фактором, влияющим на выбор подстилки, является технология содержания, продуктивное направление поголовья и финансовые возможности предприятия. Сейчас самым распространенным видом органической подстилки является солома. Для ее широкого использования в качестве подстилки существует много причин. Прежде всего, на многих предприятиях, которые объединяют производство продукции растительного и животного происхождения, солома – побочный продукт выращивания зерновых. К тому же благодаря высокому содержанию питательных веществ после использования в животноводческих помещениях солома с навозом успешно вносится на поля в качестве органического удобрения высокого качества, богатого калием, азотом и фосфором [3].

Качественная подстилка продлевает срок продуктивного использования коров. Так, специалист по молочному направлению фирмы «Матрикс Агритех» Йохан Белсма [4] (цит. по М. Гумерову) считает, что именно «благодаря комфортному содержанию высокопродуктивные коровы могут быть задействованы в производственном процессе на молочно-товарной ферме в среднем не менее пяти лактаций при максимальном уровне производства молока в течение всего продуктивного периода».

Подстилочный материал оказывает влияние и на здоровье животных. Так, при исследовании подстилочного материала, проведенного Van Gastelen, было установлено, что при содержании животных на поролоновых матрасах процент коров со

здоровыми скакательными суставами был ниже ($20,5 \pm 6,7$), а степень повреждения скакательного сустава – выше ($2,32 \pm 0,17$) по сравнению с животными, содержащимися на соломенной подстилке, компосте или навозе [5].

Исследователи Юп Дриссен (Нидерланды) и Кристиан Мансер (Швейцария) [6] пришли к выводу, что самый лучший вариант подстилочного материала – это компост или соломенная подстилка вволю для всех коров. В большинстве стран это довольно дорого. Поэтому они рекомендуют помещения с глубокой соломенной подстилкой для 5–10 % животных из группы высокого риска (зона отела – коровы в период за 3 недели до отела и в течение 3 недель после). Для остальной части стада – подстилка с толстым слоем песка, соломы или высушенного навоза.

Европейские фермеры часто смешивают солому, мел и известь и выкладывают из этой массы слой толщиной 20 см, а затем только подбрасывают свежую измельченную солому. По мнению экспертов, такая подстилка коровам нравится больше, чем резиновые маты. Стоит она примерно столько же, сколько и солома, но экологичнее, однако требуется больше времени на уход [3].

В настоящий момент высокую актуальность имеет вопрос об оптимальном количестве вносимой соломенной подстилки. Мнения ученых на этот счет разделились. Так, в результате биоэнергетической оценки различных вариантов внесения соломенной подстилки Трофимов А.Ф. с соавт. установили, что оптимальной нормой внесения при содержании коров в индивидуальных боксах является 1 кг/гол., при групповом содержании на глубокой подстилке – 8 кг/гол. и при периодически сменяемой соломенной подстилке – 4,5 кг/гол. [7].

В «Нормах технологического проектирования предприятий крупного рогатого скота (30045)» (Украина) для коров на привязном содержании норма внесения подстилки составляет 1,5 кг/гол., при боксовом и комбибоксовом содержании – 0,5 кг/гол., при беспривязном содержании

на глубокой подстилке – 5,0 кг/гол. [8]. Первый слой подстилки должен составлять не менее 5 см.

В «Комплексных нормах технологического проектирования новых, реконструкции и технического перевооружения существующих животноводческих объектов» (Республика Беларусь) нормы внесения подстилки следующие: при привязном содержании – 1,5 кг на голову в сутки, при боксовом и комбикоксовом – 0,5 кг, при беспривязном содержании на периодически сменяемой соломенной подстилке – 4,5 кг и беспривязном содержании на глубокой подстилке – 8 кг [9]. Первоначальный слой подстилки должен составлять 5,0; 5,0; 20,0 и 50,0 кг соответственно.

Не секрет, что подстилочный материал является значительной статьей расходов для сельскохозяйственного предприятия. Однако важно экономить без ущерба для коров: секции для содержания сухо-

стойных животных должны быть комфортными.

Целью нашего исследования является определение оптимальной нормы внесения соломенной подстилки в различных секциях для содержания сухостойных коров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Научные опыты проходили в филиале агрофирмы «Лебедево» РУП «Минскэнерго» Молодечненского района. Объектом исследований были сухостойные коровы и нетели голштинизированной белорусской черно-пестрой породы.

Для каждого этапа эксперимента было сформировано 4 группы коров: 1 контрольная и 3 опытных по 30 голов в каждой. Группы формировали методом накопления. Эксперимент проходил в 2 этапа. Схема опыта представлена в таблице 1.

Таблица 1. – Схема опыта по технологическому зонированию и определению оптимальных норм внесения соломенной подстилки в секциях для содержания сухостойных животных

Параметры формирования технологических групп сухостойных животных		
группа	n	внесение подстилки в зону отдыха, кг/гол.
содержание в секции 8×15 м		
I контрольная	30	8,00 (по РНТП-1-2004)
II опытная	30	5,00
III опытная	30	4,50
IV опытная	30	4,00
разделение на зоны кормления (3×18 м) и отдыха (4,5×18 м)		
I контрольная	30	8,00 (по РНТП-1-2004)
II опытная	30	5,00
III опытная	30	4,50
IV опытная	30	3,00

Комфортность условий содержания скота определялась методом балльной оценки и набора контролируемых факторов, предложенным В.Д. Степурой: поведение, загрязненность животных, травмы конечностей и вымени. Наличие отрицательных явлений оценивали как нулевую комфортность, частичное их присутствие – в 0,5 балла, отсутствие отрицательных явлений – 1 балл. Наивысшая сумма баллов

свидетельствует о комфортности и предпочтительности использования [10].

Поведение животных оценивалось по отдельным действиям или положениям тела через определенные промежутки времени согласно методическим рекомендациям Е.И. Админа [11].

Чистоту кожи и шерстного покрова животных оценивали визуально в течение двух смежных дней каждого месяца. По

степени загрязнения телок разделяли на три категории: чистые (загрязнения только на запястном и скакательном суставах), среднезагрязненные (грязные места с одной стороны бедра) и грязные (загрязнены тазовые конечности и живот).

Состояние здоровья животных определяли в течение всего периода исследований путем учета случаев заболеваний органов дыхания, пищеварения, конечностей и вымени.

Кормление подопытных животных было организовано в соответствии с нормами, предложенными в справочнике «Нормы кормления крупного рогатого скота» [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для определения оптимальной нормы внесения соломенной подстилки в секцию размером 8×15 м и в секцию с разделением на зоны кормления (3×18 м) и отдыха (4,5×18 м) проведена следующая работа: изучены этологические реакции животных путем хронометражных наблюдений, дана оценка комфортности их содержания, проведена термометрия соломенной подстилки и дана экономическая оценка различных норм внесения соломенной подстилки.

Этологические реакции животных. Для определения максимально комфортных условий содержания при экономической целесообразности изучено влияние различных норм внесения соломенной подстилки в секции для содержания сухостойных животных. Различные нормы внесения оказали влияние на поведенческие реакции подопытных коров. Животные контрольной и опытных групп вели себя активно, значительную часть времени проводили у кормового стола или стояли. Время, проведенное сухостойными животными стоя, не имело существенных различий во всех группах и составило 7,69 ч в I контрольной группе, 7,58 ч – во II опытной группе, 7,55 ч – в III опытной и 7,58 ч – в IV опытной группе. Данная тенденция прослеживается и по отношению ко времени, проведенному животными у кормового стола.

Так, I контрольная и II опытная группы провели у кормового стола 5,45 ч, III опытная – 5,50 ч, IV опытная – 5,48 ч.

Двигательная активность подопытных животных имела свои различия. Активнее всего проявили себя коровы II опытной группы: они провели в движении 4,43 ч. Наблюдаемые различия статистически достоверны ($P \geq 0,001$). Животные I контрольной и IV опытной групп были в движении 4,11 и 4,20 ч соответственно. Самыми пассивными были коровы III опытной группы, которые провели в движении 3,91 ч.

Время, проведенное коровами лежа, во многом характеризует комфортность мест для отдыха. Больше времени лежа провели животные III опытной группы. Они отдыхали 7,04 ч. Данные различия являются статистически достоверными при $P \geq 0,001$. Меньше всего времени затратили на отдых в положении лежа коровы II опытной группы (6,53 ч). В I контрольной и IV опытной группах коровы лежали 6,75 и 6,73 ч соответственно. Различия между группами составили 1,26–2,10 %.

Следует отметить, что на расстоянии 1,2–1,8 м вдоль кормового стола возникает зона повышенной загрязненности (животные чаще всего испражняются во время потребления корма). Загрязненная подстилка переносилась по всей секции, что могло оказать отрицательное влияние на здоровье и продуктивность коров.

Второй этап исследований был проведен также на сухостойных животных, но в секциях с разделением на зону кормления (3×18 м) и зону отдыха (4,5×18 м). Хронометражные наблюдения позволили выявить ряд особенностей в поведении подопытных животных. Разделение площади секции на зоны отдыха и кормления позволило животным меньше времени стоять и двигаться и больше отдыхать. Двигательная активность подопытных животных составила 3,76–4,05 ч в сутки. Больше всего двигались животные II опытной группы (4,05 ч). Данные, полученные в результате наблюдений, статистически достоверны ($P > 0,01$).

Время отдыха в положении стоя у подопытных животных составило 6,51–6,78 ч. Существенных различий в поведенческих реакциях в III (6,62 ч) и IV (6,63 ч) опытных группах не выявлено.

Важными поведенческими актами сухостойных животных являются кормление и отдых в положении лежа. Значительных различий по времени, проведенному у кормового стола, среди подопытных животных не установлено: в среднем они потребляли корм от 5,20 до 5,24 ч. Данная закономерность прослеживается и по отношению ко времени, проведенному животными в положении лежа. На отдых в положении лежа животными было затрачено 8,21–8,22 ч.

Важно отметить, что отделение зоны кормления позволило избежать беспокойства животных в зоне отдыха. Это позволяет им более полно реализовывать свои биологические потребности.

Оценка комфортности содержания животных. Кроме поведенческих реакций, определена комфортность условий содержания подопытных животных (таблица 2).

Вследствие загрязнения соломенной подстилки все подопытные животные в

секции 8×15 м имели загрязнения бедра, скакательных и запястных суставов, которые были оценены в 0,5 балла.

Проводя оценку травмирования конечностей и вымени подопытных животных, установили, что параметры технологического оборудования секции соответствовали биологическим особенностям сухостойных животных. Следовательно, за период исследований заболеваний конечностей и вымени не выявлено, животные всех групп оценены в 1 балл.

Таким образом, при содержании в общей секции на соломенной подстилке подопытные животные наиболее комфортно чувствовали себя при норме ее внесения в количестве 8,0; 5,0 и 4,5 кг/гол. При близких показателях оценки комфортности животных, на наш взгляд, более выгодным является норма внесения соломенной подстилки в количестве 4,5 кг/гол.

Следует отметить, что животные всех групп значительную часть времени (11,79–11,46 ч) проводили в движении или стоя. Это способствовало затаптыванию соломы у кормового стола с последующим загрязнением подстилки во всей секции.

Таблица 2. – Суммарная оценка комфортности (в баллах)

Группа животных	Внесение подстилки, кг/гол.	Факторы оценки			
		поведение	загрязненность животных	травмы конечностей и вымени	итого
содержание в секции 8×15 м					
I контрольная	8 (согласно РНТП-1-2004)	0,5	0,5	1	2,0
II опытная	5	1	0,5	1	2,5
III опытная	4,5	1	0,5	1	2,5
IV опытная	4	0,5	0,5	1	2,0
содержание в секциях с разделением на зоны кормления (3×18 м) и отдыха (4,5×18 м)					
I контрольная	8 (согласно РНТП-1-2004)	1	1	1	3
II опытная	5	1	1	1	3
III опытная	4,5	1	1	1	3
IV опытная	3	1	1	1	3

При оценке общей комфортности условий содержания при разделении секции на зоны кормления и отдыха выявлено, что все подопытные животные демонстрировали комфортное поведение. Существенных различий в этологических реакциях сухостойных животных выявлено не было.

Вторым контрольным показателем оценки явилась загрязненность тела подопытных животных. В результате проведенных исследований было выявлено, что разделение секции на зоны кормления и отдыха способствовало более комфортному пребыванию животных, что характеризовалось отсутствием загрязнений на теле.

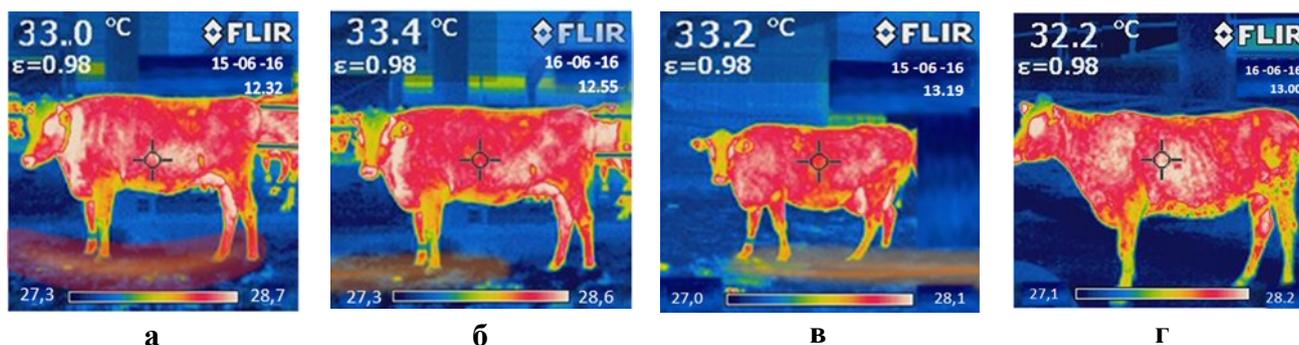
Следует отметить, что наличие ограждающих конструкций, разделяющих секцию на зоны отдыха и кормления, позволило снизить загрязненность соломенной подстилки в зоне отдыха. Как следствие, все подопытные животные относились к категории чистых. Все нормы внесения подстилки были оценены в 1 балл.

В процессе исследования важно фиксировать случаи травмирования животных, так как недостатки в организации беспривязного содержания скота могут привести к массовому травматизму и нанести хозяйству значительный экономический ущерб. Нужно учитывать, что корова не имеет мышц, обеспечивающих плавное приседание. А поскольку вес среднего животного составляет 600 кг, то при падении на твердую поверхность с высоты 30 см корова получает ссадины и ушибы, приводящие впоследствии к болезням ног и суставов [13]. Применение подстилочного

материала обеспечивает сухое, мягкое и теплое место отдыха и позволяет поддерживать чистоту кожных покровов. В результате исследований технологического зонирования в секциях для содержания сухостойных животных не было выявлено случаев травмирования вымени и конечностей.

Таким образом, разделение секции на зоны кормления и отдыха позволило создать комфортные условия содержания подопытным животным. Об этом свидетельствуют поведенческие реакции сухостойных коров, отсутствие травм и загрязнений на теле. Различия во внесении соломенной подстилки не оказали существенного влияния на подопытных животных. Следовательно, оптимальной нормой внесения соломенной подстилки в секции с разделением на зоны кормления и отдыха является 4,5 кг/гол.

Температурные показатели соломенной подстилки. Изменение количества вносимой соломенной подстилки не должно оказывать отрицательного влияния на комфортность содержания скота ввиду снижения теплозащиты. В связи с этим нами проанализированы температурные режимы логова в течение года. Замер температуры подстилки проводили после вставания животных. В секции размером 8×15 м в теплый период года при внесении соломы в количестве 8 кг/гол. температура колебалась в пределах плюс 27,3–28,7 °С. С сокращением количества подстилочного материала до 4 кг температура снизилась на 0,2–0,5 °С и составила плюс 27,1–28,2 °С (рисунок 1).

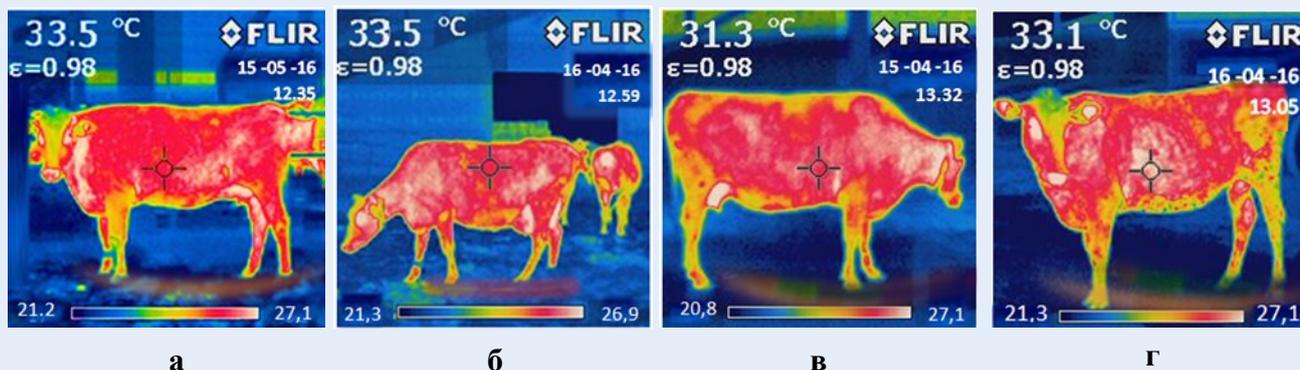


а – I контрольная группа; б – II опытная группа; в – III опытная группа; г – IV опытная группа

Рисунок 1. – Температурные показатели соломенной подстилки в теплый период года

В переходной период максимальная температура поверхностей логова I, II, III и IV групп не имела существенных различий

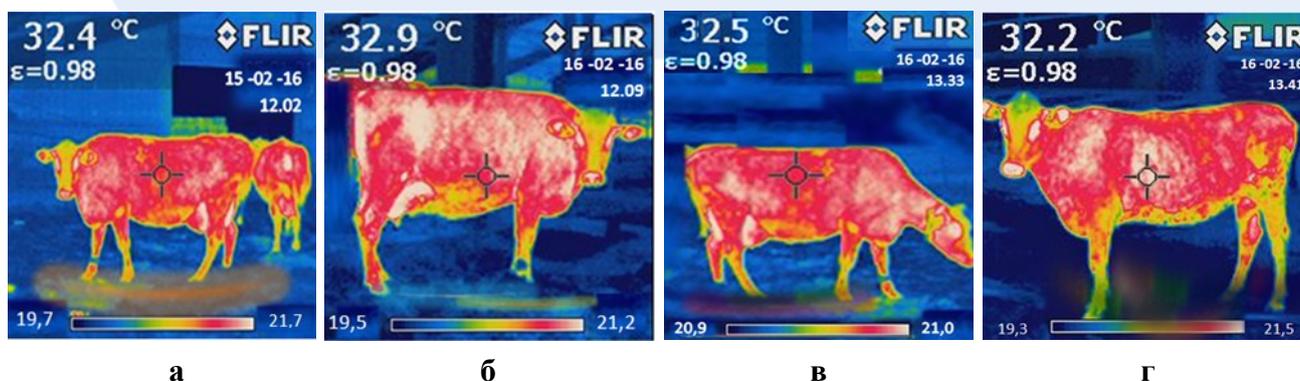
и варьировалась от плюс 21,2; 21,3; 20,8 и 21,3 °С до плюс 27,1; 26,9; 27,1 и 27,1 °С соответственно (рисунок 2).



а – I контрольная группа; б – II опытная группа; в – III опытная группа; г – IV опытная группа
Рисунок 2. – Температурные показатели соломенной подстилки в переходной период

В холодный период температурные показатели логова после вставания колебались от плюс 19,7 до 21,7 °С (рисунок 3). Следует отметить, что в опытных группах температура не имела значительных различий. Так, во II опытной группе она изменя-

лась с плюс 19,5 до 21,2 °С, в III группе – с плюс 20,9 до 21,0 °С и в IV группе – с плюс 19,3 до 21,5 °С. Результаты замеров температуры логова в I контрольной группе были выше в среднем на 0,2–0,3 °С в сравнении с замерами в опытных группах.



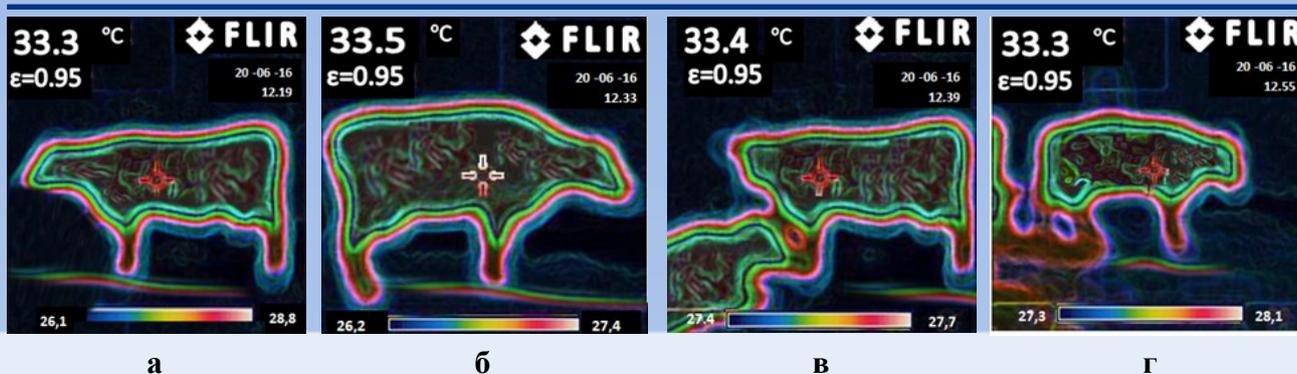
а – I контрольная группа; б – II опытная группа; в – III опытная группа; г – IV опытная группа
Рисунок 3. – Температурные показатели соломенной подстилки в холодный период года

Температура поверхности кожи животных в теплый период года составила плюс 33,2–33,4 °С, в переходной период – плюс 31,3–33,5 °С, в холодное время года – плюс 32,2–32,9 °С. Существенных колебаний температуры между группами подопытных животных не выявлено, что указывает на умеренную отдачу тепла и оптимальную теплорегуляцию.

Таким образом, существенных различий в температурных показателях соломенной подстилки выявлено не было. Следует отметить, что с уменьшением количества вносимой подстилки (с 8 до 4 кг) тем-

пература снижалась на 0,2–0,5 °С в теплый и переходной периоды года и на 0,5–1,6 °С – в холодный период.

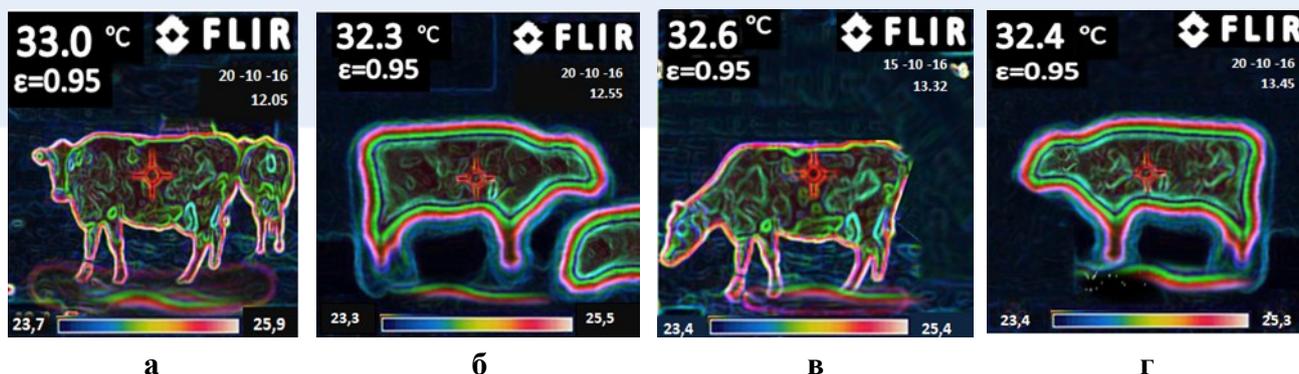
Температурные показатели соломенной подстилки при разделении секции на зоны отдыха и кормления имели свои особенности. В теплый период температура в I контрольной группе составила плюс 26,1–28,8 °С, во II опытной – плюс 26,2–27,4 °С, в III опытной – плюс 27,4–27,7 °С и в IV опытной – плюс 27,3–28,1 °С (рисунок 4). Разница температур между результатами измерений в I контрольной и опытных группах не превышала 0,7–1,4 °С.



а – I контрольная группа; б – II опытная группа; в – III опытная группа; г – IV опытная группа
Рисунок 4. – Температурные показатели соломенной подстилки в теплый период года

В осенний и весенний периоды температурные колебания достигали 23,3–25,9 °С (рисунок 5). Максимальная температура подстилки была зафиксирована в I

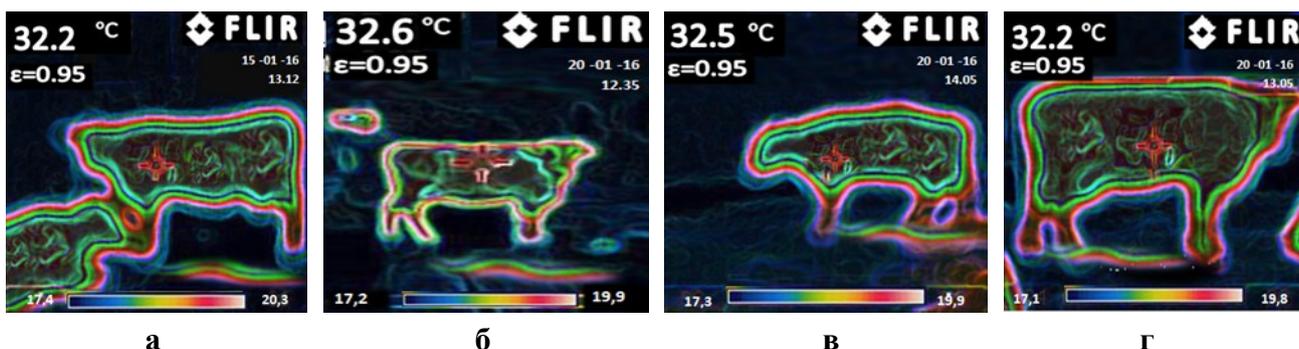
контрольной группе, минимальная – во II опытной. Различия в температуре логова между опытными и контрольной группами составили 0,3–0,6 °С.



а – I контрольная группа; б – II опытная группа; в – III опытная группа; г – IV опытная группа
Рисунок 5. – Температурные показатели соломенной подстилки в переходной период

В холодный период года температура логова уменьшалась при снижении нормы внесения соломенной подстилки (рисунок 6). Так, в I контрольной группе логово после вставания коровы имело температуру плюс 17,4–20,3 °С, что выше на 0,2–0,4 °С, чем во II опытной группе, на 0,1–0,4 °С, чем в III опытной, и на 0,3–0,5 °С,

чем в IV опытной группе. Следует отметить, что при температуре соломенной подстилки плюс 17,1–19,8 °С этологические реакции подопытных коров не имели отличий по сравнению с контрольной группой. Травм или загрязнений кожных покровов также выявлено не было.



а – I контрольная группа; б – II опытная группа; в – III опытная группа; г – IV опытная группа
Рисунок 6. – Температурные показатели соломенной подстилки в холодный период года

Температура поверхности кожи животных в теплый период года составила 33,3–33,5 °С, в переходной период – 31,2–33,0 °С, в холодное время года – 32,2–32,6 °С. Существенных колебаний температуры между группами подопытных животных выявлено не было, следовательно, интенсивность отдачи тепла в окружающую среду была оптимальной.

Таким образом, уменьшение нормы внесения соломенной подстилки в секции с

разделением на зону кормления и зону отдыха с 8 до 3 кг не ухудшило комфортность содержания сухостойных коров.

Экономическая эффективность применения различных норм внесения соломенной подстилки. Подстилочные материалы на основе соломы составляют значительную часть общих расходов на содержание молочно-товарного комплекса (таблица 3).

Таблица 3. – Экономическая эффективность различных норм внесения соломы при беспривязном содержании сухостойных животных (на голову)

Показатели	I контрольная, 8 кг	II опытная, 5 кг	III опытная, 4,5 кг	IV опытная, 4 кг	I контрольная, 8 кг	II опытная, 5 кг	III опытная, 4,5 кг	IV опытная, 3 кг
	содержание в секции 8×15 м				разделение зон кормления (3×18 м) и отдыха (4,5×18 м)			
Расход соломы за 60 дней, т	0,48	0,30	0,27	0,24	0,48	0,30	0,27	0,18
Расход соломы на поголовье животных в секции (30 гол.), т	14,40	9,00	8,10	7,20	14,40	9,00	8,10	5,40
Стоимость соломы, долл. США	198	123,75	111,38	99	198	123,75	111,38	74,25
Экономический эффект за 60 дней, долл. США	-	74,25	86,62	99	-	74,25	86,62	123,75

В результате экспериментальных исследований было установлено, что при беспривязном содержании в секции 8×15 м расход соломы составил от 0,24 до 0,48 т/гол. Максимальный расход соломы отмечен в I контрольной группе (14,40 т/гол.), что больше на 5,40 т, чем при внесении подстилки в количестве 5 кг/гол. (II опытная группа), и на 6,30 т – чем при внесении в количестве 4,5 кг/гол. (III опытная группа), вследствие чего стоимость соломы в I контрольной группе была выше на 86,62 и 99,00 долл. США по сравнению с III и IV опытными группами соответственно. Цена реализации 1 т озимой соломы составляет 13,75 долл. США.

При содержании сухостойных животных в секции с разделением на зоны кормления и отдыха расход соломы был ниже – от 0,18 до 0,48 т. Минимальный расход соломы был отмечен в IV опытной

группе – 5,40 т/гол., что ниже на 37,50 % по сравнению с I контрольной группой, на 60,00 % – по сравнению с II опытной и на 66,67 % – с III опытной группой. Стоимость соломы в исследуемых группах колебалась от 198 долл. США в I контрольной группе до 74,25 долл. США в IV опытной.

Экономический эффект при внесении соломенной подстилки в течение 60 дней в III опытной группе с нормой 4,5 кг/гол. составил 99,00 долл. США. В секции с разделением на зоны кормления и отдыха экономический эффект в IV опытной группе при внесении 3 кг соломы составил 123,75 долл. США. Таким образом, внесение соломенной подстилки в количестве 3 кг на голову в секции с разделением на зоны кормления и отдыха обеспечивает комфортное пребывание животных и позволяет сэкономить часть расходов на содержание молочно-товарного комплекса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разделение секции на зоны кормления и отдыха позволяет длительное время поддерживать чистоту и сухость подстилочного материала, что ведет к более рациональному его использованию и способствует более продолжительному отдыху животных.

Оптимальными нормами внесения соломы в качестве подстилочного материала при беспривязном групповом содержании сухостойных коров в секции 8×15 м в расчете на одно животное является 4,5 кг, при содержании с разделением на зоны кормления (3×18 м) и отдыха (4,5×18 м) – 3 кг.

Экономия денежных средств на обеспечение соломенной подстилкой за пери-

од экспериментальных исследований составила 99,00 долл. США/гол. при содержании животных в секции и 123,75 долл. США – при содержании сухостойных животных с разделением на зоны кормления (3×18 м) и отдыха (4,5×18 м).

Данные исследования показывают, что уменьшение количества вносимой соломенной подстилки позволяет снизить затраты хозяйства без ущерба для условий содержания коров.

Дальнейшие исследования будут проводиться в направлении обеспечения комфортных условий содержания сухостойных животных и улучшения качественных свойств подстилочного материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Солома на подстилку для животных // *Semka-dreva.ru* [Электронный ресурс]. – 2020. – Режим доступа: <https://semka-dreva.ru/soloma/soloma-na-podstilku-dlya-zhivotnyh.html>.
2. Подстилка для коров. Сравнение различных типов // *EcoStar* [Электронный ресурс]. – 2020. – Режим доступа: <https://www.ecostar.by/index.php/articles.html?id=108:podstilka-dlya-korov-sravnenie&catid=1>.
3. Ярошко, М. Роль подстилки в содержании крупного рогатого скота / М. Ярошко // *Dairy Global Experts* [Электронный ресурс]. – 2021. – Режим доступа: <https://dairyglobalexperts.com/ru/posts/rol-podstilki-v-soderzanii-krupnogo-rogatogo-skota>.
4. Гумеров, М. Хорошая подстилка обеспечивает корове комфорт / М. Гумеров // *Животноводство России*. – 2008. – № 6. – С. 37.
5. A study on cow comfort and risk for lameness and mastitis in relation to different types of bedding materials / S. Van Gastelen [et al.] // *Journal of dairy science*. – 2011. – Vol. 94(10). – P. 4878–4888. DOI 10.3168/jds.2010-4019.
6. Друссен, Ю. Оптимальный дизайн боксов / Ю. Друссен, К. Мансер // *DairyNews.ru* [Электронный ресурс]. – 2020. – Режим доступа: <https://www.dairynews.ru/news/optimalnyy-dizayn-boksov.html>.
7. Нормы внесения соломенной подстилки при беспривязном содержании коров / А. Ф. Трофимов [и др.] // *Аграрная наука*. – 2005. – № 9. – С. 21–22.
8. Нормы технологического проектирования предприятий крупного рогатого скота (30045) // ДНАОП. Законодавча база [Электронный ресурс]. – 2021. – Режим доступа: https://dnaop.com/html/30045_6.html НТП 1-99.
9. Комплексные нормы технологического проектирования новых, реконструкции и технического перевооружения существующих животноводческих объектов по производству молока, говядины и свинины : КНТП – 1 – 2020 / Национальная академия наук Беларуси, Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь ; разработ. : И. В. Брыло [и др.]. – Минск, 2021. – 121 с.
10. Степура, В. Д. Определение комфортности в условиях привязного содержания молочного скота / В. Д. Степура // *Производство молока в Сибири : науч.-техн. бюл.* – Новосибирск, 1983. – Вып. 9. – С. 42–47.
11. Изучение поведения сельскохозяйственных животных в больших группах / Е. И. Админ [и др.] // *Науч.-техн. бюл. / НИИЖ Лесостепи и Полесья УССР*. – Харьков, 1971. – № 2. – С. 44–50.
12. Нормы кормления крупного рогатого скота : справочник / Н. А. Попков [и др.] – Жодино, 2011. – 260 с.
13. Колмакова, Е. А. Подстилка для коровы / Е. А. Колмакова // *АгроПост: технологии, инновации, опыт* [Электронный ресурс]. – 2009–2021. – Режим доступа: <http://agropost.ru/skotovodstvo/tehnologii-skotovodstva/postel-dlya-korovi.html>. – Дата доступа: 1.12.2011.