



Журнал награжден медалями
"За заслуги
в области ветеринарии",
"За развитие биологической
науки и промышленности"

ВЕТЕРИНАРИЯ И КОРМЛЕНИЕ VETERINARIA I KORMLENIE

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ SCIENTIFIC PRODUCTION JOURNAL

№3-2017

МАЙ-ИЮНЬ

СЕГОДНЯ В НОМЕРЕ / IN THE ISSUE



Стр. 4

Юбилейная конференция по иммунологии



Стр. 104

Ветеринарный конгресс, о котором точно вспомнят через 70 лет

WWW.VETKORM.RU ISSN 1814-9588 ЖУРНАЛ ВКЛЮЧЕН В ВАК, AGRIS, РИНЦ

«Ветеринария и кормление» бесплатно!

Перечень библиотечно-информационных организаций, получающих из Российской книжной палаты обязательный бесплатный федеральный экземпляр изданий (утв. постановлением Правительства РФ от 3 декабря 2002 г. N 859)

- Российская государственная библиотека, г. Москва
- Российская национальная библиотека, г. Санкт-Петербург
- Государственная публичная научно-техническая библиотека Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск
- Дальневосточная государственная научная библиотека, г. Хабаровск
- Библиотека Российской академии наук, г. Санкт-Петербург
- Парламентская библиотека, г. Москва
- Администрация Президента Российской Федерации, библиотека, г. Москва
- Научная библиотека Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, г. Москва
- Государственная публичная научно-техническая библиотека России, г. Москва
- Всероссийская государственная библиотека иностранной литературы имени М.И. Рудомино, г. Москва
- Институт научной информации по общественным наукам Российской академии наук, г. Москва
- Библиотека по естественным наукам Российской академии наук, г. Москва
- Государственная публичная историческая библиотека России, г. Москва
- Всероссийский институт научной и технической информации Российской академии наук, г. Москва
- Государственная общественно-политическая библиотека, г. Москва
- Центральная научная сельскохозяйственная библиотека Российской академии сельскохозяйственных наук, г. Москва
- Политехнический музей, центральная политехническая библиотека, г. Москва
- Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова, центральная научная медицинская библиотека, г. Москва



Научно-производственный журнал
для ветврачей и зооинженеров
«Ветеринария и кормление»
Подписной индекс 42111

**Адрес редакции: 109428, Москва,
Рязанский проспект, д. 24, стр. 1, офис 916
(Институт ВИЭВ)**

Тел./факс редакции: 8-495 739-99-10
Тел. мобильный 8-916 819-48-13
WhatsApp +79263878063
Сайт: www.vetkorm.ru
E-mail: vetkorm@mail.ru

Учредитель – ООО «Агентство творческих технологий»
Свидетельство о регистрации ПИ № ФС77-18901 от 19.11.2004 г.
ISSN 1814-9588

Полное или частичное воспроизведение или размножение любым способом материалов, опубликованных в журнале, допускается только с письменного разрешения редакции и со ссылкой на журнал. Мнения авторов могут не совпадать с точкой зрения редакции. Ответственность за содержание и достоверность информации в публикациях, включая рекламные, полностью несет автор.

№ 3/2017 г. (май-июнь). Подписано в печать 14.05.2017
Отпечатано ООО "Издательский Дом Меркурий". Заказ . Тираж 2000

**Главный редактор
Владимир Александрович ХРАМЕНКОВ**

© Журнал «Ветеринария и кормление», 2016

Редакционная коллегия

М.И. ГУЛОКИН,
Россия, Москва
Директор
ФГБНУ ВИЭВ,
доктор ветеринарных наук,
профессор,
заслуженный деятель
науки РФ,
академик РАН



Луис ЕНХУАНЕС,
Испания, Мадрид
Зав. лабораторией
Национального центра
биотехнологии Испанского
национального
исследовательского совета
(CNB-CSIC),
профессор-исследователь



А.Н. ПАНИН,
Россия, Москва
Доктор ветеринарных наук,
профессор,
академик РАН



П.П. РАХМАНИН,
Россия, Москва
Генеральный директор
РОАО "Росагробиопром",
президент Российской
ветеринарной ассоциации,
доктор
биологических наук



А.М. СМІРНОВ,
Россия, Москва
Доктор ветеринарных наук,
профессор, заслуженный
деятель науки РФ,
академик РАН



Б.В. УША,
Россия, Москва
Директор
ФГБОУ ВПО МГУПП,
доктор ветеринарных наук,
профессор, заслуженный
деятель науки РФ,
академик РАН



А.Я. САМУЙЛЕНКО,
Россия, Щелково
Директор
ФГБНУ ВНИТИБП,
доктор ветеринарных наук,
профессор, заслуженный
деятель науки РФ,
академик РАН



В.И. ФИСИНИН,
Россия, Сергиев Посад,
доктор сельскохозяйственных
наук, профессор,
заслуженный деятель
науки РФ,
академик РАН



Содержание/Contents 3-2017

Актуальные вопросы ветеринарной иммунологии Actual questions of veterinary immunology	6
Применение растительно-тканевой композиции для профилактики острых респираторных вирусных инфекций КРС Алексеев А.Д., Петрова О.Г. / Alexeev A.D., Petrova O.G.	8
The use of a plant-tissue composition for the prophylaxis of acute respiratory viral infections in cattle	
Повышение эффективности иммунопрофилактики ассоциативных инфекций телят Андреева А.В., Николаева О.Н. / Andreyeva A. V., Nikolaeva O.N.	10
The increase in effectiveness of immunoprophylaxis of associative infections of calves	
Иммунологические показатели секрета вымени до и после лечения мастита коров Белкин Б.Л., Попкова Т.В., Комаров В.Ю.	11
Immunological parameters of udder secretion before and after treatment mastitis cows Belkin B.L., Popkova T.V., Komarov V. Yu.	
Специфика риск - ориентированного подхода в сфере ветеринарного контроля Бурлаков С.В. / Burlakov S. V.	13
Specificity of the risk - based approach in the sphere of veterinary control	
Диагностика Ig E - зависимых аллергий домашних животных Вальциферова С.В. / Valtsiferova S.V.	15
Diagnosis of Ig E - dependent allergies in domestic animals	
Трехмерное культивирование ранних половых клеток хряка in vitro. С.А.Васильева / S.A.Vasileva	17
Culturing of boar early germ cells into three-dimensional system in vitro	
Моноклональные антитела в ветеринарной иммунодиагностике Верховский О.А. / Verkhovskiy O.A.	20
Usage of monoclonal antibodies for the development of the immunoassays for the veterinary diagnostics	
Действие Эхинацеи пурпурной на иммунную систему Ветрова Л.Ю., Кузнецова М.И. / Vetrova L.Yu., Kuznetsova M.I.	22
Effect of Echinacea purpurea on the immune system	
Эпизоотологические данные по возбудителям гемотропных инфекций у кошек по г. Москве на 2015-2016 гг. Вирцер М.А., Огнева А.А. / Wirzer M.A., Ogneva A.A.	23
Epizootic data on pathogens of hemiotropic infections in cats in Moscow for 2015-2016	
Диагностика лямблиоза методом ПЦР в режиме реального времени Вирцер М.А., Зайцев В.С., Гордеева Т.Г. / Wirzer M.A., Zaitsev V.S., Gordeeva T.G.	24
Diagnosis of giardiasis using real-time PCR	
Оценка длительности иммунного ответа и защитного действия рекомбинантной гриппозной вакцины Унифлю на хорьках Воронин С.Е., Крышень К.Л., Макарова М.Н., Степанова Л.А., Шуклина М.А., Коротков А.В.	25
Duration of immune response and protective effects of recombinant influenza vaccine study in ferrets Voronin S.E., Kryshen K.L., Makarova M.N., Stepanova L.A., Shuklina M.A., Korotkov A.V.	
T. evansi антигены и сыворотки / T.evansi antigens and sera Георгиу Христофис / Georgiou Ch.	27
Эффективность различных схем использования ассоциированной вакцины против мастита коров Л.К. Семина, Е.В. Ремизова, З.А. Скулябина, Т.Г. Ворошилова, Н.Н. Авдеевская, А.В. Горбатов, Х.С. Горбатова	29
L.K. Semina, E.V. Remizova, Z.A. Skulyabina, T.G. Voroshilova, N.N. Avduevskaya, A.V. Gorbатов, Kh.S. Gorbatova	
Система мониторинга за эпизоотической обстановкой по бруцеллезу северных оленей и способы повышения его эффективности в современных условиях Гордиенко Л.Н., Куликова Е.В., Новиков А.Н. / Gordienko L.N., Kulikova E.V., Novikov A.N.	31
Monitoring system for epizootic situation on reindeer' brucellosis and methods for increasing its effectiveness in modern conditions	
Эволюция микроорганизмов / Evolution of microorganisms С.А. Гринь / S.A. Grin	33
Изменения в составе иммуноглобулинов крови служебных собак в результате антибиотикотерапии и применения пробиотика "Белолин" Грязнева Т. Н., Ласковец Р.С. / Grjazneva T. N., Laskovets R. S.	33
Changes in the composition of immunoglobulins in the blood of dogs as a result of antibiotic therapy and use of probiotic "Belolin"	
Роль клеток крови в становлении и развитии иммунного ответа (обзор литературы) М.И. Гулюкин, Т.В. Степанова / M.I. Guliukin, T.V. Stepanova	36
The role of blood cells in the formation and development of the immune response (literature review)	
Использование иммунологических маркеров в качестве возможных диагностических ориентиров определения состояния здоровья животных Ездакова И.Ю. / Ezdakova I.Yu.	40
Use immunological markers as a possible diagnostic guidelines determination of animal health	

Журнал «Ветеринария и кормление»:
оказываем услуги по верстке и печати книг, методичек, брошюр,
и другой полиграфической продукции.
Бюджетные цены, высокое качество, ответственное исполнение.
Доставка во все регионы России

Основные показатели гуморального иммунитета коров голштинской породы Еремина М.А., Ездакова И.Ю. / Eryomina M.A., Ezdakoval.Yu. -----	41
Major Indicators of Humoral Immunity in Holstein Cows	
Иммуноферментный анализ в диагностике вирусной геморрагической септицемии лососевых рыб (VHS) Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е. / Zavyalova E. A., Droshnev A. E. -----	43
ELISA - based diagnostics for VHS	
Разработка вакцины на основе протективного антигена бруцелл Искандаров М.И., Федоров А.И., Искандарова С.С., Альбертян М.П., Слепцов Е.С., Винокуров Н.В. -----	45
The development of a vaccine based on protective antigen of Brucella Iskandarov M.I., Fedorov A.I., Iskandarova S.S., Alertyan M.P. , Sleptsov E.S., Vinokurov N.V. Способы контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против инфекционных болезней крупного рогатого скота, вызванных различными видами бактерий рода Clostridium spp	
Капустин А.В. / Kapustin A.V. -----	47
Control methods of immunogenic activity associated vaccines against infectious diseases of cattle caused by various species of bacteria of the genus Clostridium Spp.	
Эритроцитарные диагностикумы и применение в ветеринарии Клюшинцева Н.С., Мельник Н.В., Мельник Р.Н., Гринь С.А., Крюкова Е.Н., Литенкова И.Ю., Клюшинцева Н.С., Федорова О.Ю., Дресвянникова С.Г., Самуйленко А.Я. -----	49
To formed elements of blood include erythrocytes, leukocytes and platelets (thrombocytes).	
Иммунный ответ у телят, вакцинированных вакциной "Виропаст" против вирусных и бактериальных инфекций Красочко П.А., Нестерович С.Г., Борисовец Д.С., Красочко И.А., Новикова О.Н. -----	52
Immune response at the calfs vaccinated by the vaccine "ViroPast" against viral and bacterial infections Krasochko P. A., Nesterovich S.G., Borisovets D.S., Krasochko I.A., Novikova O.N.	
Эффективность иммунокорректирующего препарата при профилактике вирусных и паразитарных болезней животных Красочко П.А., Якубовский М.В., Красочко И.А., Борисовец Д.С., Щемелева Н.Ю., Толяронок Г.Е., Василькова В.П. -----	54
The effectiveness of immunocorrective drug in the prevention of viral and parasitic diseases of animals Krasochko P.A., Jakubowski M.V., Krasochko I.A., Borisovez D.S., Shemeleva N.Yu., Toleronok G.E., Vasilkova V.P.	
Интенсивность антителообразования на введение рекомбинатных и вирусных белков вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота Красочко П.П., Яромчик Я.П., Красочко В.П. / Krasochko P.P , Yaromatchik Ya.P. , Krasochko V.P. -----	56
Antibody formation in cows for introduction of recombinate and viral proteins of a virus in infectious rinotraheitis of large cattle	
Роль аутоиммунных процессов в патогенезе заболеваний легких у свиней Крячко О.В. / Kryachko O.V. -----	58
The role of autoimmune processes in the patogenesis of lung disease in pigs	
Изменение белкового состава сыворотки крови лабораторных животных под влиянием диоксида кремния "Альфа-Кварц". Квантовая нелокальность Кулагин М.В., Ездакова И.Ю. / Kulagin M.V. , Ezdakova I.Yu -----	60
Change the protein composition of blood serum of laboratory animals under influence of silica "alpha-Quartz". Quantum nonlocality	
К вопросу об иммуномодулирующих свойствах меда Курманова А.Ю. / Kurmanova A.Yu. -----	62
To the question about the immunomodulatory properties of honey	
Обзор современных средств специфической профилактики пастереллёза и манхеймиоза сельскохозяйственных животных Лаишевцев А.И., Капустин А.В., Пименов Н.В. / Laishevtcev A.I., Kapustin A.V., Pimenov N.V. -----	64
The review of modern agents of specific prevention of pasteurellosis and mankheymiosis of farm animals	
Профилактическая иммунизация животных - важный элемент стратегии обеспечения благополучия страны по ящуру Лозовой Д.А. / Lozovoy D.A. -----	66
Preventive immunization of animals - significant element of the strategy for ensuring FMD freedom of the Russian federation	
Использование нагрузочных тестов для оценки иммунореактивности организма животных Лощинин М.Н., Ездакова И.Ю., Попова Е.В. / Loschinin M.N., Ezdakova I.Yu., Popova E.V. -----	68
The use of stress tests to assess the immunoreactivity of the animal body	
Изготовление и контроль сухого компонента для реакции связывания компонента при диагностике инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных Мельник Р.Н., Клюшинцева Н.С., Киш Л.К., Гринь С.А., Самуйленко А.Я., Савина Е.П., -----	70
Manufacture and control of dry complement for the complement fixation reaction in the diagnosis of infectious diseases of farm animals	
Использование вакцины в системе мероприятий по профилактике и борьбе с некробактериозом животных Мельник Н.В., Боровой В.Н., Самуйленко А.Я., Мельник Р.Н., Гринь С.А., Крюкова Е.Н., Винников М.Г., Федорова Н.В. -----	72
The use of the vaccine in the system of measures for prevention and control of animal necrobacillosis Melnik N.V., Borovoy V. N., Samoilenko A.Y., Melnik R. N., Grin S.A., Kryukova E.N., Vinnikov M.G., Fedorova N.V.	
Иммунопрофилактический метод реализации генетического потенциала в стаде красно-пестрой породы крупного рогатого скота Некрасов А.А., Попов Н.А., Федотова Е.Г., Моисеев А.Н., Семичев А.С. -----	74
The immunoprophylactic method of realization of the genetic potential in the herd of redmottley breed of cattle Nekrasov A.A., Popov N.A., Fedotova E.G., Moiseyev A.N., Semichev A.S.	

Генетикиоиммунологическая обусловленность патологии особей высокопродуктивной черно-пестрой породы крупного рогатого скота - основа разработки ветеринарных препаратов Объедков Г.А. / Obedkov G.A. -----	77
Genetic-immunology conditionality pathology of productive animals of black-motley breed of cattle - the basis of the development of veterinary drugs Противовирусное действие препаратов фоспренил и гампрен в отношении флавивирусов	
Ожерелков С. В., Санин А.В., Наровлянский А. Н., Пронин А. В., Кожевникова Т. Н. -----	78
Phosphorilated polysoprenoids of natural origin exert antiviral effect against flaviviruses Ozherelkov S.V., Kozhevnikova T.N., Narovlyansky A.N., Pronin A.V., Sanin A.V. Фоспренил стимулирует иммуногенность вакцин против бешенства и клещевого энцефалита	
Ожерелков С. В., Санин А. В., Наровлянский А. Н., Пронин А. В., Кожевникова Т. Н. -----	80
Phosprenyl augments immunogenicity of rabies vaccine and tick-borne encephalitis vaccine Ozherelkov S.V., Kozhevnikova T.N., Narovlyansky A.N., Pronin A.V., Sanin A.V. Адьювантное действие фоспренила на иммуногенность антирабической вакцины у собак	
Ожерелков С. В., Санин А. В., Наровлянский А. Н., Пронин А. В., Кожевникова Т. Н. -----	81
Phosprenyl exerts adjuvant effect on immunogenicity of the rabies vaccine in dogs Ozherelkov S.V., Kozhevnikova T.N., Narovlyansky A.N., Pronin A.V., Sanin A.V.	
Принципы иммунометаболической коррекции вторичных иммунодефицитов у свиней Попов В.С., Самбуров Н.В. / Popov V.S., Samburov N.V. -----	83
Principles immunometabolic secondary immunodeficiency in pigs	
Гемоциты речных раков как элементы иммунной защиты Присный А.А. / Prisnyi A.A. -----	85
Hemocytes of crayfishes as an elements of the immune defense	
Системный подход в изучении иммуномодулирующих свойств продуктов пчеловодства Сайфутдинова З. Н., Васильева А.Н. -----	86
System approach in the study of immunomodulating properties of beekeeping products Sayfutdinova Z.N., Vasilyeva A.N.	
Иммунологические и биотехнологические аспекты вакцинопрофилактики стрептококкоза крупного рогатого скота Самуйленко А. Я., Школьников Е. Э., Сокорев Н.В., Еремец В. И., Раевский А.А., Анисимова Л. В., Соловьев Л.Б. -----	88
Vaccination of cow diseases streptococcaetiology Samujlenko A.Y., Shkolnikov E.E., Sokorev N.V., Eremets V. I., Raevsky A.A., Anisimova L.V., Solovjev L.B.	
Циркуляция вируса ящура серотипа А на территории Ближнего Востока Самуйленко А.Я., Мельник Н.В., Ельников В.В., Литенкова И.Ю., Крюкова Е.Н., Федорова Н.В., Левина А.В., Боровой В.А., Гринь С.А., Мельник Р.Н., Синковец С.М., Киш Л.К., Барсуков Ю.И., Андроник А.Н. -----	91
The circulation of FMD virus serotype A in the Middle East	
Участие ДНК клеток в иммуногенезе А.Я. Самуйленко, С.А. Гринь, Р.Н. Мельник, А.Н. Андроник, Е.И. Орел -----	94
Part of the DNA of cells in the immunogenesis A.J. Samujlenko, C.A. Grin , R.N. Miller, A.N. Andronic , E.I. Eagle	
Применение иммуномодуляторов при вирусных заболеваниях мелких домашних животных Санин А.В., Наровлянский А.Н., Пронин А.В. -----	95
Use of immune modulators for treatment of small animal viral diseases A.V.Sanin, A.N.Narovlyanskiy, A.V.Pronin	
Разнонаправленное действие MIF и фоспренила на течение экспериментальной вирусной инфекции Санин А.В. Ожерелков С.В., Кожевникова Т.Н. -----	97
Oppositely directed influence of MIF and phosprenyl (PP) upon the course of experimental viral infection in mice Sanin A.V., Kozhevnikova T.N., Ozherelkov S.V.	
Вакцинация глубокопестельных коров с гликопином с целью повышения резистентности новорожденных телят Устинова Г.И., Кучерук О.Д., Андронина Т.М., Ездакова И.Ю., Мникова Л.А., Ишкова Т.А., Лучкин А.Г., Ежгур С.А. -----	99
Vaccination of cows in late-term pregnancy with Glicopin to increase the resistance of newborn calves Ustinova G.I., Kucheruk O.D., Andronova T.M., Ezdakova I.Yu., Mnikova L.A., Ishkova T.A., Luchkin A.G., Yezhgur S.A.	
Влияние прививочной дозы сорбированной и эмульсионной противоящурных вакцин на формирование гуморального иммунитета у овец Шарыпов А.С., Лозовой Д.А. / Sharypov A.S., Lozovoy D.A. -----	100
Influence of FMD sorbate and emulsion vaccine inoculation doses on humoral immunity development in sheep	
Вопросы лечения и профилактики рожи свиней Школьников Е. Э., Глушенкова Ю.А., Гринь С.А., Коротеева Л.А. -----	102
Questions about treatment and prevention of swine erysipelas Shkolnikov E.E. Glushenkova U.A. Grin S. A., Koroteeva L.A.	
Функционирование и серологическая активность экстракта клеток и продуктов экспрессии <i>Mycobacterium bovis</i> Шуралев Э.А., Хаертынов К.С., Валеева А.Р., Александрова Н.М., Мукминов М.Н. -----	103
Fractionation and serological activity of <i>Mycobacterium bovis</i> cell extract and secondary metabolites Shuralev E.A., Khaertynov K.S., Valeeva A.R., Aleksandrova N.M., Mukminov M.N.	
Ветеринарный конгресс, о котором гарантированно вспомнят через 70 лет Храменков В.А. -----	106

Актуальные вопросы ветеринарной иммунологии

Actual questions of veterinary immunology

Конференция на тему: "Актуальные вопросы ветеринарной иммунологии" состоялась в середине мая во Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии имени Я. Р. Коваленко.

Это была и юбилейная иммунологическая конференция. 50 лет назад академик Я.Р.Коваленко впервые в России создал лабораторию иммунитета во ВИЭВ. Яков Романович по праву считается основоположником российской ветеринарной иммунологии. В 2016 году в России создано Российское научно-практическое общество ветеринарной иммунологии и иммунопатологии - РОВИ.

Иммунология как наука возникла из практической необходимости защиты человека и животных от инфекционных болезней. Первые прививки путем инокуляции содержимого оспенных пустул здоровым людям проводили за тысячу лет до нашей эры. В конце XVIII века английским врачом Э. Дженнером был разработан метод вакцинации (от лат. *vassa* - корова). Но появление иммунологии как науки связано с именем выдающегося французского ученого Луи Пастера. В 1880 г. Л.Пастер сформулировал принцип создания вакцин, а именно снижение вирулентности антигена при сохранении его иммуногенности. Проблема борьбы с инфекционными заболеваниями, снижение уровня их распространения стала основной задачей научно-исследовательских институтов, таких как, созданный в 1918 году Институт экспериментальной ветеринарии. Изучение иммунитета позволило разработать новые методы лечения и профилактики ряда бактериальных и вирусных заболеваний животных, таких как чума и рожа свиней, бруцеллез, туберкулез и др. В результате научных исследований был внедрен целый ряд ценных диагностических методов и



средств специфических профилактики.

Огромный вклад в ветеринарную иммунологию внес академик ВАСХНИЛ Яков Романович Коваленко, создавший в 1967 г. лабораторию иммунитета (впоследствии лаб.иммунологии). Уже в те годы стало очевидно, что для обеспечения эпизоотического благополучия в условиях высокой концентрации животных необходим постоянный мониторинг за состоянием иммунной системы, так как в данном случае изменяются процессы роста и развития патогенных микроорганизмов. Также на резистентность организма животного могут оказывать влияние различные факторы, такие как, например, кормление, условия содержания, физиологическое

состояние и др. Впервые в России, под руководством академика Я.Р.Коваленко, были проведены исследования по разработке методов диагностики и борьбы с африканской чумой свиней (Б.Г. Иванов, А.Г. Бахтин, Е.П. Исаенко, М.А. Сидоров, Л.Г. Бурба, В.К. Кретинин и др.), изучению и серологической характеристике микоплазм с целью разработки методов дифференциации (М.А. Сидоров, И.А. Яблонская, Э.А. Шегидевич и др.). По результатам этих исследований были изданы монографии "Африканская чума свиней" (1965, 1972 гг.) и "Микоплазмозы животных" (1976 г.).

Под руководством профессора Я.Р. Коваленко были проведены первые опыты по изучению формирования вакцинального иммунитета у молодняка, полученного от иммунных матерей (И.А. Яблонская). В результате проведенных экспериментов было установлено, что гамма-глобулины в сыворотке крови поросят от иммунных и неиммунных свиноматок до приема ими молозива отсутствуют. В реакции агглютинации с паратифозными антигенами сывороткой крови телят, также как и поросят, агглютининов и гамма-глобулинов не было обнаружено до приема молозива. Через сутки после рождения и приема молозива от иммунных к паратифу коров у телят титр агглютининов



сыворотки крови был наиболее высок, а к 30-дневному возрасту титр агглютининов становился незначительным. Таким образом, экспериментально было доказано, что у коров и свиней отсутствует трансплацентарная передача антител. При активной иммунизации телят и поросят, выращенных под иммунными прототипами паратифа матерями, колюстральный иммунитет задерживает у них образование специфических антител, а напряженность приобретен-



ного вакцинального иммунитета зависит от состояния у них пассивного колюстрального иммунитета.

Открыл конференцию Михаил Иванович Гулюкин - директор ФГБНУ ВИЭВ, академик РАН, доктор ветеринарных наук, профессор. С обзорным докладом выступила Ирина Юрьевна Ездакова - зав. лабораторией иммунологии ФГБНУ ВИЭВ, доктор биологических наук. Так же перед собравшимися выступили докладчики из институтов ВНИТИБП, ВИЖ, Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины". Федеральный центр охраны здоровья животных, Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", НИИ диагностики и профилактики болезней человека и животных". Статьи, посвященные этой тематике, вы можете увидеть на последующих страницах данного номера.

Р.С. После двух дней напряженной работы конференции, ее участники собрались в актовом зале на чаепитие. И эта не формальная часть официального мероприятия была для представителей науки и практики не менее значимой. С белой завистью сотрудники других институтов говорили об особой атмосфере гостеприимства и доброжелательности, всегда царящих в стенах ВИЭВ. При чем, для ее создания не нужны особые приготовления - бутерброды и куллер с горячей водой для чая создают непринужденную обстановку, которая положительной энергетикой сплачивает людей одного дела.

Владимир Храменков,
фото автора



УДК 619:616.988.5.636.2

Применение растительно-тканевой композиции для профилактики острых респираторных вирусных инфекций крупного рогатого скота

Алексеев А.Д. – кандидат ветеринарных наук, ассистент кафедры инфекционной и незаразной патологии ФГБОУ ВО УрГАУ, e-mail: alexeevbest@mail.ru

Петрова О.Г. – доктор ветеринарных наук, профессор кафедры инфекционной и незаразной патологии ФГБОУ ВО УрГАУ

ФГБОУ ВО "Уральский государственный аграрный университет", 620075, г. Екатеринбург, ул. К. Либкнехта, 42, тел/факс +7(343)221-40-24

Аннотация. Острые респираторные заболевания являются вторым по значимости фактором здоровья крупного рогатого скота после патологий пищеварительной системы. Острые респираторные вирусные инфекции негативно влияют на полноценный рост и формирование организма теленка, способствуют индукции секундарной инфекции, проявляются нарушением физиологических этапов формирования морфофункциональной организации иммунной системы. Патогенез ОРВИ КРС, тенденция к хронизации и рецидивированию, недостаточная эффективность традиционных профилактических мероприятий во многом обусловлены состоянием морфофункциональной недостаточности иммунной системы. Важное значение в комплексе мероприятий по предупреждению ОРВИ КРС играет специфическая профилактика. Вместе с тем, профилактическая иммунизация не всегда дает ожидаемый результат. Это связано с тем, что при промышленных методах содержания крупного рогатого скота, снижается общая резистентность организма животного, нарушаются обменные процессы и метаболизм, негативное влияние оказывают неблагоприятные экологические факторы. В связи с этим, повышение общей резистентности организма животных, на фоне применения иммуномодулирующих препаратов представляет определенную актуальность и востребованность. Нами разработана растительно-тканевая композиция, при применении которой отмечается выраженный противовоспалительный эффект.

Ключевые слова: острые респираторные вирусные инфекции, растительно-тканевая композиция, крупный рогатый скот, циркулирующие иммунные комплексы.

The use of a plant-tissue composition for the prophylaxis of acute respiratory viral infections in cattle

Alexeev A.D, Petrova O.G.

Acute respiratory infections are the second most important factor in the health of cattle after the pathologies of the digestive system. Acute respiratory viral infections have a negative impact on growth and the formation of a full calf of the body, promote the induction of secondary infections, manifest violation of the physiological stages of formation of the morphological and functional organization of the immune system. The pathogenesis of BRD in cattle, tendency to chronicity and recurrence, the lack of effectiveness of traditional preventive measures is largely due to the morphological and functional state of the immune system deficiency. The importance of the complex of measures to prevent SARS cattle plays a specific prevention. At the same time, preventive vaccination does not always produce the expected result. This is due to the fact that when the content of industrial methods of cattle, reduces the overall resistance of the animal organism, violated the metabolic processes and metabolism adversely affected by adverse environmental factors. In this regard, increasing the overall resistance of the organism of animals, on the background of the use of immunomodulatory drugs represents a certain urgency and relevance.

We have developed a plant-tissue composition, the application of which is pronounced anti-inflammatory effect.

Key words: acute respiratory viral infections, plant-tissue composition, cattle, circulating immune complexes

Цель исследований

Целью исследований явилось совершенствование профилактики ОРВИ КРС, с применением растительно-тканевой композиции.

Методология и методы исследования

Предметами исследования был крупный рогатый скот при промышленных технологиях содержания, сыворотка крови, кровь крупного рогатого скота, разработанная нами растительно-тканевая композиция. Изучение общетоксического действия растительно-тканевого препарата проводили в соответствии с "Правилами доклинических исследований безопасности и эффективности фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [5,6,9].

Исследование клеточного звена иммунитета включало определение CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺ – лимфоцитов методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител (BeckmanCoulter, США) на проточном цитометре CytomicsFC 500 (BeckmanCoulter, США). Функциональную активность фагоцитирующих клеток оценивали по показателям фагоцитарного индекса, спонтанного и стимулированного НСТ-теста. Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли методом опсоно-фагоцитарной реакции по методике В.С. Гостева [7], с использованием культуры золотистого стафилококка (штамм № 209). Для оценки циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови использовали метод иммунопреципитации в 4% растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000) с последующим фотометрированием на спектрофотометре СФ-2000 (Россия). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии на цитофлуориметре FacsCanto 11 (BectonDickinson).

Результаты исследований

Интенсификация животноводческого производства, скученность животных, несоответствие условий кормления и содержания современным требованиям, а также неблагоприятная экологическая обстановка, приводят к снижению общей резистентности организма коров. Особенно подвержен действию неблагоприятных факторов молодняк в возрасте до 6 месяцев, что вместе со снижением иммунологической реактивности организма, создает благоприятные условия для развития инфекционной патологии респираторного тракта [1,2,4]. Для коррекции иммунодефицитных состояний у крупного рогатого скота при промышленных технологиях содержания необходимо использовать иммуномоделирующие препараты.

Высокоэффективными и безопасными для животных показали себя иммуномодуляторы растительного происхождения и растительно-тканевые препараты [3,8].

При определении токсичности на лабораторных мышах ЛД₅₀ растительно-тканевой композиции при введении в желудок животным составила >6000 мг/кг, что позволяет отнести исследуемый препарат к 4 классу малоопасных веществ. При внутрибрюшинном введении препарата мышам показатель ЛД₅₀ составлял более 5000 мг/кг, что характерно для относительно безвредных веществ 6 класса токсичности (по К.К. Сидорову).

У исследованных нами коров и телят отмечались лимфоцитоз, лейкоцитоз и моноцитоз, СОЭ была выше уровня физиологической вариабельности, что свидетельствует о наличии в организме животных воспалительных процессов. Нами исследован иммунный комплекс крови коров и телят до и после введения растительно-тканевой композиции. Композиция вводилась подкожно, коровам в дозе 7,5 мл на голову, телятам – 2 мл (таблица 1).

Под влиянием растительно-тканевой композиции сни-

жаются содержание в крови животных циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) на 1,7 – 1,9%, что свидетельствует о снижении воспалительных процессов в организме. Как истинный иммуномодулятор, разработанная нами композиция работает как в сторону увеличения НСТ спонтанного на 2,8%, НСТ стимулированного 4,6%, что является компенсаторным фактором иммунодефицитных состояний, так и в сторону снижения НСТ спонтанного на 5,9% и НСТ стимулированного на 7,2% соответственно, вследствие противовоспалительного действия в отношении аллергических, аутоиммунных, инфекционных и паразитарных агентов, а также устранения лейкоцитоза. Увеличение индекса завершенности фагоцитоза на 4,3%, свидетельствует об устранении лейкоцитоза, снижении воспаления, вызванного аллергическими, аутоиммунными, инфекционными и паразитарными агентами, повышении общей неспецифической резистентности организма. Снижение активности фагоцитоза на 2,2%, фагоцитарного индекса (Ф.И.) на 6%, фагоцитарного числа (Ф.Ч.) на 6,5 – 8,65%, эффективного фагоцитоза на 2,4 – 2,77%, указывает на уменьшение воспалительных реакций, вызванных аллергическими, аутоиммунными, инфекционными и паразитарными агентами, снижение количества лейкоцитов до уровня физиологической варибельности, что связано с противовоспалительным действием композиции. Нами проведены исследования иммунного статуса и субпопуляций Т-лимфоцитов крови коров и телят. (таблица 2)

При лимфоцитозах, разработанная нами растительно-тканевая композиция, снижает общий уровень лимфоцитов в крови коров и телят (1,3 – 9,3%), что свидетельствует о снижении нагрузки на клеточное звено иммунитета в результате снижения воспалительных реакций организма животных. Снижение под воздействием композиции уровня Т-лимфоцитов (CD3) на 2,7 – 4,8%, уровня Т-хелперов (CD4) на 8,7 – 10,56%, цитотоксических лимфоцитов (ЦТТЛ(CD8)) на 5,3 – 14,9%, свидетельствует о снижении нагрузки на клеточное звено иммунитета в результате устранения воспалительных реакций организма животных. Благодаря своим иммуномодулирующим свойствам, композиция вызывает как увеличение количества В-лимфоцитов (CD20) на 4,2%, и тем самым корректирует недостаточность гуморального иммунитета и увеличивает выработку организмом антител, так и уменьшение количества В-лимфоцитов (CD20) на 6,9%, что свидетельствуют о снижении воспалительных реакций в организме животных. Как иммуномодулятор, композиция увеличивает иммунорегулятор-

ный индекс (CD4/CD8) (3,3%), что указывает на устранение иммунодефицита у животных и снижение (3,6%), воспалительных реакций.

Список литературы:

- Алексеев, А.Д. Применение растительно-тканевого препарата для профилактики ОРВИ крупного рогатого скота./Алексеев А.Д., Петрова О.Г.// Сборник материалов Международной научно-практической конференции "Актуальные вопросы сохранения и развития биологических ресурсов" - Екатеринбург - 2015 - С. 18-19.
- Алексеев, А.Д. Эпизоотологические особенности, диагностика и профилактика респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота./Алексеев А.Д. Петрова О.Г.// Молодежь и наука. - 2014 - 2. (Электронный ресурс). URL: <http://min.usasa.ru/issues/8/articles/127> (дата обращения 20.10.2015 г.).
- Барашкин, М.И. Влияние различных факторов на иммунную систему крупного рогатого скота при промышленных технологиях содержания /Барашкин М.И.//Аграрный вестник Урала - 2015. - 2 - С.16-19
- Донник, И.М. Острые респираторные заболевания крупного рогатого скота и проблемы профилактики в современных условиях промышленного производства./Донник И.М., Петрова О.Г., Марковская С.А.//Аграрный вестник Урала. - 2013. - № 10 - С.25-27
- Методические рекомендации по изучению общетоксического действия фармакологических средств. /Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ./ Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Хабриева Р.У. - 2-е изд. - Москва. - 2005 - С.41-54.
- Методические указания МУК 2.3.2.721-98 "2.3.2. Пищевые продукты и пищевые добавки. Определение безопасности и эффективности биологических активных добавок к пище". Утверждены Главным Государственным санитарным врачом РФ 15.10.1998 г.
- Олейникова, Е.А. Иммунологические методы исследования./ Олейникова Е.А., Эберг Л.Я.- Саранск, - 1981.-54 с.
- Петрова, О.Г. Острые респираторные заболевания крупного рогатого скота и проблемы профилактики на региональном уровне/ Петрова О.Г., Барашкин М.И.//Аграрный вестник Урала. - 2014.- №6 - С.40-42
- Правила доклинических исследований безопасности и эффективности фармакологических веществ./Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ./Под ред. В.П. Фисенко//Москва. Ремедиум. - 2000 - С.7-18.

Таблица 1 – Иммунный комплекс крови коров и телят

№ п/п	Показатель	Коровы		Телята	
		До введения композиции	Через 14 дней	До введения композиции	Через 14 дней
1	ЦИК.%	212,40±0,65	208,88±2,03	234,46±5,91	229,92±6,81
2	НСТ спонт.%	6,27±0,09	5,90±0,22	7,91±0,45	8,13±0,39
3	НСТ стим.%	13,9±0,28	12,9±0,46	15,81±0,38	16,54±0,54
4	Акт. Фагц.%	91,80±0,96	89,80±0,96	92,20±1,56	90,20±1,56
5	Ф.И. у.е.	19,32±0,28	18,23±0,16	21,93±1,30	20,68±1,45
6	Ф.Ч. у.е.	14,02±0,23	13,17±0,23	15,37±0,46	14,15±0,65
7	Заверш.Фагоч. у.е.	0,31±0,01	0,27±0,01	0,46±0,02	0,48±0,03
8	Эфф. Фагоч. у.е.	413,32±6,92	403,66±6,01	423,48±4,29	412,06±4,49

Таблица 2 – Субпопуляции Т-лимфоцитов в крови коров и телят

№ п/п	Показатель	Норма	Коровы		Телята	
			До введения композиции	Через 14 дней	До введения композиции	Через 14 дней
1	Лимфоциты, %		82,14±0,63	81,08±0,60	88,00±1,22	79,78±1,62
2	Т-лимфоциты (CD3), % 10 ⁹ /л	45-53	34,64±0,36	33,04±0,55	36,87±1,25	35,89±1,59
3	Т-хелперы (CD4),%	8-31	38,14±0,54	35,08±1,28	39,98±1,70	36,16±1,16
4	ЦТТЛ (CD8),%	10-30	42,90±1,25	40,72±1,19	44,42±2,12	38,66±0,86
5	CD4/CD8	1,53	0,886±0,02	0,854±0,01	0,906±0,03	0,936±0,04
6	В-лимфоциты (CD20), % 10 ⁹ /л	16-21	9,36±0,39	9,75±2,09	8,87±0,91	8,26±0,69

УДК 619:616-097

Повышение эффективности иммунопрофилактики ассоциативных инфекций телят

Андреева А.В. – доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней, зоогиены и ветсанэкспертизы, alfia_andreeva@mail.ru

Николаева О.Н. – кандидат биологических наук, доцент кафедры инфекционных болезней, зоогиены и ветсанэкспертизы, oksananik83@mai.ru

ФГБОУ ВО "Башкирский государственный аграрный университет",
450501, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34

Аннотация. Статья посвящена изучению влияния рекомбинантного интерлейкина-2 ("Ронколейкин") на динамику циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) у телят при их вакцинации против ассоциативных инфекций. Телят контрольной и опытных групп вакцинировали против сальмонеллеза, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной болезни, вирусной диареи и пастереллеза. Телятам второй группы "Ронколейкин" вводили подкожно при вакцинации и ревакцинации в дозе 1000 МЕ/кг; телятам третьей группы "Ронколейкин" вводили при рождении подкожно в дозе 100000 МЕ и при вакцинации подкожно в дозе 1000 МЕ/кг; телятам четвертой группы "Ронколейкин" вводили при рождении подкожно в дозе 100000 МЕ. Взятие проб крови проводилось до начала опыта, на 25-й, 35-й, 65-й, 75-й дни опыта. Количество ЦИК определяли путем селективной преципитации в полиэтиленгликоле. Содержание ЦИК в сыворотке крови телят контрольной и опытных групп находилось на уровне $35,5 \pm 0,3$ опт. ед – $36,7 \pm 0,3$ опт. ед. На 25-й день опыта у телят отмечалось повышение количества ЦИК. Максимального увеличения оно достигло к 65-му дню исследований, превысив фоновые значения в контрольной, второй, третьей и четвертой группах на $4,0$ ($39,5 \pm 0,4$ опт. ед); $3,4$ ($39,3 \pm 0,1$ опт. ед); $2,6$ ($39,3 \pm 0,3$ опт. ед) и $3,2$ ($39,2 \pm 0,4$ опт. ед), соответственно. На 75-й день опыта увеличение ЦИК в сыворотке крови телят контрольной группы сохранилось, а у телят, получавших "Ронколейкин", регистрировалось снижение количества ЦИК. Таким образом, применение рекомбинантного интерлейкина-2 на фоне вакцинации против ассоциативных инфекций способствует коррекции уровня циркулирующих иммунных комплексов в крови.

Ключевые слова: рекомбинантный интерлейкин-2, иммунные комплексы, вакцина, ассоциативные инфекции, телята.

The increase in effectiveness of immunoprophylaxis of associative infections of calves

Andreyeva A. V., Nikolaev O. N

The article is devoted to studying of influence recombinant interleykina-2 (Ronkoleykin) on dynamics of the circulating immune complexes (CIC) at calves at their vaccination against associative infections. Calves control and experienced groups vaccinated against salmonellosis, an infectious rhinotracheitis, a parainfluenza-3, respiratory syncytial diseases, viral diarrhea and pasteurellosis. To calves of the second Ronkoleykin group entered subcutaneously at vaccination and a revaccination in a dose of 1000 ME/kg; to calves of the third Ronkoleykin group entered at the birth subcutaneously in a dose 100000 ME and at vaccination subcutaneously in a dose of 1000 ME/kg; to calves of the fourth Ronkoleykin group entered at the birth subcutaneously in a dose 100000 ME. Sampling of blood was carried out prior to experience, for the 25th, 35th, 65th, 75th days of experience. The number of the CEC defined by the selection precipitation in polyethylene glycol. The maintenance of the CEC control and experienced groups was in blood serum of calves at the level of $35,5 \pm 0,3$ wholesale. piece - $36,7 \pm 0,3$

wholesale. the piece For the 25th day of experience at calves noted increase in number of the CEC. It reached the maximal increase by 65th day of researches, having exceeded background values in control, second, third and fourth groups on $4,0$ ($39,5 \pm 0,4$ wholesale. piece); $3,4$ ($39,3 \pm 0,1$ wholesale. piece); $2,6$ ($39,3 \pm 0,3$ wholesale. piece) and $3,2$ ($39,2 \pm 0,4$ wholesale. piece), respectively. For the 75th day of experience increase in the CEC in blood serum of calves of control group remained, and at the calves receiving Ronkoleykin decrease in number of the CEC was registered. Thus, application recombinant interleykina-2 against the background of vaccination against associative infections promotes correction of level of the circulating immune complexes in blood.

Keywords: recombinant interleykina-2, immune complexes, associative infections, calves.

Ассоциативные инфекции молодняка сельскохозяйственных животных являются одной из наиболее острых проблем современного животноводства. Основной способ борьбы с данными инфекциями – специфическая вакцинация молодняка сельскохозяйственных животных. Однако, в последние годы многими исследователями отмечается снижение эффективности иммунизации [2, 3, 5]. Поэтому для повышения эффективности вакцинации необходимо повышение естественной резистентности и неспецифической иммуностимуляции с помощью средств, обладающих иммуномодулирующими свойствами.

Цель исследований – изучение влияния рекомбинантного интерлейкина-2 ("Ронколейкин") на динамику циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) у телят при их вакцинации против ассоциативных инфекций.

Материалы и методы

Телят контрольной и опытных групп вакцинировали против сальмонеллеза, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной болезни, вирусной диареи и пастереллеза. Телятам второй группы "Ронколейкин" вводили подкожно при вакцинации и ревакцинации в дозе 1000 МЕ/кг; телятам третьей группы "Ронколейкин" вводили при рождении подкожно в дозе 100000 МЕ и при вакцинации подкожно в дозе 1000 МЕ/кг; телятам четвертой группы "Ронколейкин" вводили при рождении подкожно в дозе 100000 МЕ.

Взятие проб крови проводилось до начала опыта, на 25-й, 35-й, 65-й, 75-й дни опыта. Количество циркулирующих иммунных комплексов определяли методом Ю. А. Гриневича, А. Н. Алферова (1981) путем селективной преципитации в полиэтиленгликоле [1]. Размер циркулирующих иммунных комплексов оценивали по методу П.В. Стручкова с соавт. (1985) [4]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием пакета статистического анализа для Microsoft Excel. Достоверность различий между группами оценивалась при помощи t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$ (Г. Ф. Лакин, 1973).

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что после вакцинации против сальмонеллеза (на 25-й день исследований) у телят отмечалась тенденция к увеличению количества циркулирующих иммунных комплексов. Так, у телят контрольной группы количество циркулирующих иммунных комплексов превысило фоновое значение на $0,8$ опт. ед ($37,6 \pm 0,5$ опт. ед.), у телят первой группы – на $1,2$ опт. ед ($37,8 \pm 0,4$ опт. ед.), у телят второй группы – на $1,3$ опт. ед ($37,9 \pm 0,6$ опт. ед.), у телят третьей группы – на $1,5$ опт. ед. ($37,8 \pm 0,6$ опт. ед.), у телят четвертой группы – на $1,2$ опт. ед. ($37,6 \pm 0,4$ опт. ед. На 35-й и 65-й дни исследований (после вакцинации и ревакцинации вакциной "Комбовак Р") у телят регистрировалось увеличение в сыворотке крови циркулирующих иммунных комплексов. Максимального увеличения оно достигло к 65-му дню исследований, превысив фоновые значения в контрольной, второй, третьей и четвертой группах на $4,0$ ($39,5 \pm 0,4$ опт. ед.); $3,4$ ($39,3 \pm 0,1$ опт. ед.); $2,6$ ($39,3 \pm 0,3$ опт. ед.) и $3,2$ ($39,2 \pm 0,4$ опт. ед.), соответственно. Однако, количество циркулирующих иммунных

комплексов в крови телят контрольной группы было выше опытных значений в вышеуказанные дни. На 75-й день исследований тенденция увеличения циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови телят контрольной группы сохранилась, а у телят, получавших "Ронколейкин", регистрировалось снижение количества циркулирующих иммунных комплексов. При изучении размера циркулирующих иммунных комплексов не выявлено в крови средне- и мелкодисперсных комплексов. Размер варьировал в пределах $1,0 \pm 0,01$ Кд - $1,0 \pm 0,02$ Кд.

Заключение

Таким образом, вакцинация вызывает в организме телят увеличение количества циркулирующих иммунных комплексов. Это связано с увеличением антигенной нагрузки на организм животных и формированием нормального иммунного ответа. Использование иммуномодулятора способствует снижению циркулирующих иммунных комплек-

сов и стабилизации изучаемого показателя в пределах нормативных значений. Кроме того, вакцинация и коррекция противомикробного иммунитета не вызывает образование патогенных средне- и мелкодисперсных комплексов.

Список литературы:

1. Гриневиц Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных. - Лабораторное дело. - 1981. - №8. - С. 493-495.
2. Долгих В.Т. Основы иммунопатологии. - Н.Новгород, - 1998. - 208 с.
3. Мищенко В.А. Особенности иммунодефицитов у крупного рогатого скота // Ветеринария. - 2006. - №11. - С. 17-19.
4. Стручков П. В. Скрининг-тест для оценки патогенных циркулирующих иммунных комплексов.// Лабораторное дело. - 1985. - №7. - С. 410-412.
5. Ярилин А.А. Иммунология // М.: ГЭОТАР.- Медиа.- 2010. - С. 39.

УДК 636:612.664+619:618.19

Иммунологические показатели секрета вымени до и после лечения мастита коров

Белкин Б.Л., доктор ветеринарных наук
Попкова Т.В., кандидат биологических наук
Комаров В.Ю., заведующий сектором НТР НИЦ
ФГБОУ ВО Орловский ГАУ

Аннотация. Проведены сравнительные исследования иммунологических показателей секрета вымени здоровых и больных различными формами мастита лактирующих коров. Установлены определенные закономерности изменения в молоке лактирующих коров количества соматических клеток, содержания циркулирующих иммунных комплексов, общего белка и его спектра на фоне повышения содержания иммуноглобулинов G, M, A.

Ключевые слова: лактирующие коровы, субклинический и клинический мастит, иммунологические показатели секрета вымени коров.

Immunological parameters of udder secretion before and after treatment mastitis cows

Belkin B.L., Popkova T.V., Komarov V. Yu.

The text under consideration deals with the comparative study of the immunological indexes of the secretion of the udder of both healthy cows and lactating cows with different forms of mastitis. There were established the certain regularities of somatic cells number changes in the milk of the lactating cows, circulating immune complexes content, total protein and its spectrum at increasing of immunoglobulin G, M, A.

Key words: lactating cows, subclinical and clinical mastitis, immunological indexes of the secretion.

Одной из важнейших задач отечественного животноводства является неуклонное повышение санитарного качества молока, которое оказывает непосредственное влияние, как на здоровье человека, так и на экономический потенциал животноводческих хозяйств и предприятий молочной промышленности [5, 7].

Основным источником загрязнения молока на первом этапе его получения являются коровы с дисфункцией молочной железы, возникающей при воспалении. Молоко от таких коров может иметь высокий уровень микробной обсемененности, повышенное содержание соматических клеток, остаточные количества моющих и дезинфицирующих средств, химиотерапевтических препаратов, применяемых для лечения, и в связи с отсутствием надлежащего контроля над выбраковкой молока от таких животных [2, 6].

Среди акушерско-гинекологических заболеваний коров, вызывающих дисфункцию молочной железы, наиболее часто встречается мастит, сопровождающийся воспалением вымени, при котором поражается его железистая часть

(альвеолы, выводные протоки) и соединительная ткань, а также молочные ходы и цистерны [3, 4].

Мастит – это полиэтиологическое заболевание, но основной причиной является проникновение в вымя патогенного возбудителя при нарушении физиологических функций [1, 5, 7].

При определении устойчивости коров к возбудителям мастита рекомендуется ориентироваться на количество соматических клеток. В молоке коров, заболевших маститом, количество соматических клеток может повышаться в 5–30 раз. Однако, одного определения показателя уровня соматических клеток недостаточно для диагностики мастита, так как при заболевании маститом в молоке коров повышается содержание белка.

Экзо- и эндогенные антигены могут образовывать с соответствующими антителами циркулирующие иммунные комплексы (ЦИКИ). В образовании этих комплексов участвует система комплемента. ЦИКИ являются показателями воспаления и тканевого повреждения.

В защите от инфекции важную роль играют иммуноглобулины, которые действуют одни или в комплексе с комплементом. Они являются компонентами специфической гуморальной защиты вымени, т.к. являясь опсонинами, активно воздействуют на возбудитель мастита, и тем самым способствуют улучшению фагоцитоза и непосредственно ингибируют рост микроорганизмов. Нет полной ясности об изменении защитной функции вымени при развитии воспалительного процесса, что и послужило изучить динамику иммунологических показателей секрета вымени коров при дисфункции молочной железы, возникающей при субклиническом и клиническом мастите.

Материалы и методика исследований

Биохимические и иммунологические исследования молока коров проведены на кафедре анатомии, физиологии и хирургии. Диагностическое исследование молока коров здоровых и больных различными формами мастита осуществлялись на комплексах и фермах по производству молока Орловской области. Определение заболеваемости коров маститом проводили в соответствии с утвержденным Департаментом ветеринарии Минсельхоза Российской Федерации "Наставлением по диагностике, терапии и профилактике мастита у коров, 2000" с помощью использования клинических методов, пробы отстаивания и использования быстрого маститного теста.

Изучалось состояние организма здоровых и больных коров субклиническим и клиническим маститом. Динамику изменения иммунологических показателей секрета вымени лактирующих коров больных субклиническим и клиническим маститом проводили в сравнении со здоровыми животными.

Под наблюдением находились 3 группы коров по 5 голов в каждой, отобранной по принципу аналогов, животные черно-пестрой породы в возрасте 5 лет с молочной продуктивностью 3400–3500 кг. В контрольную группу были отобраны здоровые животные, в первую опытную – больные субклиническим маститом и во вторую опытную – больные клиническим маститом.

Для определения естественной резистентности молочной железы коров исследовали молоко и его сыворотку от коров здоровых и больных различными формами мастита. Использовали морфологические методы – подсчет соматических клеток в молоке определяли камерным методом; биохимические методы: содержание общего белка – рефрактометрически, белковые фракции молока – электрофоретически; определение количества иммуноглобулинов G, M, A – методом иммунодиффузии; циркулирующие иммунные комплексы с помощью спектрофотометра.

Результаты и обсуждение

Развитие воспалительного процесса характеризуется существенными изменениями иммунологических показателей в секрете вымени, и дают объективную оценку состояния его защитной функции и способности организма животных противостоять внедрению и размножению возбудителей мастита. Из данных, приведенных в таблице 1, видно, что при воспалении молочной железы увеличилось содержание соматических клеток в 2,6–6,4 раза по сравнению со здоровыми коровами ($P < 0,001$). Содержание общего белка в секрете молочных желез у коров, больных субклиническим маститом, оказалось выше в 1,6 раза ($P < 0,001$), а при клинической форме воспаления – в 1,3 раза ($P < 0,01$). Из данных таблицы 2 видно, что одновременно снизилось количество сывороточных альбуминов, соответственно, на 28,2% ($P < 0,01$) и на 6,8%. Количество бета-лактоглобулинов было ниже у коров, больных субклинической формой мастита, на 22% ($P < 0,001$) и при клинической форме воспаления – на 17,5% ($P < 0,001$), в то время как содержание альфа-лактоглобулинов в первой группе было выше в 2,2 раза ($P < 0,001$), а во второй группе коров – ниже на 5,1% по сравнению с этими показателями у здоровых коров.

Необходимо отметить высокую достоверность различий в содержании иммунных глобулинов в сыворотке молока коров. Иммунные глобулины в сыворотке молока у здоровых коров составляли $16,8 \pm 0,15\%$, тогда как у коров, больных субклинической и клинической формами мастита, этот показатель был выше, соответственно, на 17,8% ($P < 0,001$) и 46,0% ($P < 0,001$). Неподвижная фракция белка сыворотки молока у коров в первой группе была ниже на 3,14%, и во второй группе животных – на 5,7%, чем у здоровых коров в контрольной группе. Таким образом, установлена зависимость между содержанием иммунных глобулинов, бета-глобулинов и заболеванием коров, особенно клинической формой мастита. Повышение иммунных глобулинов в сыворотке молока коров при различных формах мастита свидетельствует как о дальнейшем развитии воспалительного процесса в молочной железе, так и об активности в организме процессов иммунной защиты.

Таблица 1 - Морфологические и иммунологические показатели секрета молочных желез в зависимости от их состояния

Группа коров	Соматические клетки, млн/мл	Общий белок, г %	Циркулирующие иммунные комплексы, %
Контрольная	$0,368 \pm 0,013$	$3,4 \pm 0,14$	$90,56 \pm 2,27$
Первая опытная	$0,956 \pm 0,05^{xxx}$	$5,61 \pm 0,15^{xxx}$	$41,28 \pm 8,15^{xxx}$
Вторая опытная	$2,356 \pm 0,29^{xxx}$	$4,54 \pm 0,17^{xx}$	$22,3 \pm 6,59^{xxx}$

x - $P < 0$; Первая опытная, 05; xx - $P < 0,01$; xxx - $P < 0,001$.

Сравнение достоверности со здоровыми животными

Таблица 2 - Фракции белка молока коров здоровых и больных различными формами мастита

Группа коров	Фракции белка, %				
	Сывороточные альбумины	бета-лактоглобулины	альфа-лактоглобулины	иммунные глобулины	Неподвижная фракция
Контрольная	$34,24 \pm 0,62$	$17,96 \pm 0,32$	$15,0 \pm 0,15$	$16,08 \pm 0,15$	$14,7 \pm 1,03$
Первая опытная	$24,58 \pm 0,28^{xxx}$	$14,02 \pm 0,45^{xxx}$	$33,02 \pm 1,5^{xxx}$	$18,94 \pm 0,43^{xxx}$	$14,26 \pm 1,16$
Вторая опытная	$31,94 \pm 0,84$	$14,82 \pm 0,45^{xxx}$	$14,24 \pm 0,69$	$23,48 \pm 1,07^{xxx}$	$15,54 \pm 1,09$

x - $P < 0,05$; xx - $P < 0,01$; xxx - $P < 0,001$. Сравнение достоверности со здоровыми животными

Таблица 3- Содержание иммуноглобулинов в сыворотке молока коров

Группа коров	Имуноглобулины, мг/мл		
	G	M	A
Контрольная	$1,0 \pm 0,03$	$0,1 \pm 0,05$	$0,41 \pm 0,13$
Первая опытная	$1,17 \pm 0,21$	$0,16 \pm 0,08$	$1,15 \pm 0,07^{xx}$
Вторая опытная	$3,42 \pm 0,17^{xxx}$	$0,7 \pm 0,04^x$	$1,25 \pm 0,09^{xx}$

x - $P < 0,05$; xx - $P < 0,01$; xxx - $P < 0,001$, Сравнение достоверности

со здоровыми животными

У больных коров отмечено достоверное снижение в сыворотке молока количества циркулирующих иммунных комплексов: в первой группе – в 2,2 раза ($P < 0,001$), во второй группе – в 4,1 раза ($P < 0,001$). Таким образом, в наших опытах установлена достоверная зависимость между содержанием циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке молока и заболеванием коров различными формами мастита.

По мере развития воспалительного процесса, сформированные иммунные комплексы элиминируются клетками РЭС. Уровень содержания иммуноглобулинов в сыворотке молока здоровых и больных субклиническим и клиническим маститом коров представлен в таблице 3. Установлено, что у коров, больных маститом, содержание иммуноглобулина G в первой группе повышалось на 17%, а во второй группе животных – в 3,4 раза ($P < 0,001$).

Увеличение содержания иммуноглобулина M в первой опытной группе произошло на 60%, во второй группе – в 7 раз ($P < 0,05$) по сравнению со здоровыми животными контрольной группы.

Содержание иммуноглобулина A в первой группе коров повышалось в 2,8 раза ($P < 0,01$) и во второй группе в 3 раза по сравнению со здоровыми животными.

Таким образом, установлена зависимость между уровнем различных классов иммуноглобулинов в сыворотке молока и заболеванием коров различными формами мастита. Развитие воспалительного процесса при мастите сопровождалось закономерным увеличением в сыворотке молока коров содержания всех классов иммуноглобулинов, что, по-видимому, свидетельствует о формировании повышенной защитной реакции организма коров.

Выводы

1. Изучение изменения морфологических и иммунологических показателей молока позволяет выявить определенные закономерности в состоянии защитной функции вымени и способности организма животных противостоять неблагоприятным факторам внешней среды, внедрению и размножению в вымени возбудителей мастита.

2. Полученные показатели естественной резистентности и иммунологической реактивности позволяет разобраться в сложных процессах формирования в организме воспалительного процесса при мастите и выработать стратегию борьбы с этим заболеванием.

Список литературы

- Багиров, В.А. Генетические ресурсы животноводства // Животноводство России, 2008, 2, С. 10-12.
- Ивашура, А.И. Система мероприятий по борьбе с маститами коров / А.И. Ивашура.- М.: Росагропромиздат, 1991.- С.5.
- Зверев, А.А. Диагностика и лечение острого послеродового мастита / А.А. Зверев // Медицинская сестра.- 1990. - №4. - С.17.
- Канеев, А., Карликова, Г. Оздоровление дойного стада от мастита / А. Канеев, Г. Карликова // Молочное и мясное скотоводство. - 1997. - № 2. - С.31.
- Попкова, Т.В. Факторы резистентности организма коров при дисфункции молочной железы: автореф. дис. канд. биологических наук / Т.В. Попкова. - Орел: Изд-во ОрелГАУ, 2000. - С.3.
- Юрков, В.М. Антибиотики для лечения коров больных маститом / В.М. Юрков, Л.Д. Демидова // Ветеринария. - 1997. - № 10. - С. 30.
- Novoa R., Armenteros M., Abeledo M.A, Casanovas E., Valera R., Caballero C., Pulido J. Epizootiologikal and ekonomik impact of bovine mastitis in dairy herds of Cienfuegos provine // Rev. Salud. anim.. - 2004.- Vol. 26. - N 3. - P.173-178.

УДК 631.152

Специфика риск – ориентированного подхода в сфере ветеринарного контроля

Бурлаков С.В., начальник отдела оценки ветеринарных рисков и риск-ориентированного прогнозирования в области мониторинговых исследований ФГБУ "ВГНКИ", Москва; e-mail: sbourlak@yandex.ru.

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов" ФГБУ "ВГНКИ" Россия, 123022, Москва, Звенигородское шоссе д.5, +7 (499) 253-14-68.

Наиболее эффективным и рекомендуемым международными организациями способом планирования мониторинга качества и безопасности пищевой продукции является анализ рисков. Фундаментальным основанием для его построения является ранжирование показателей безопасности (микробиологических, химических, физических и т.д.) по наносимому ущербу. Применение анализа риска позволит снизить ущерб от опасных микроорганизмов (*Salmonella* spp., *Listeria* spp.), химических веществ и оптимизировать государственные контрольно-надзорные мероприятия.

Универсальность методов анализа риска позволяет применять их для различных целей: контроля на границе, внутреннего контроля, организации целевых программ и т.д. Унификация подходов по ранжированию показателей безопасности упрощает разработку всех перечисленных мер и оценку их объективности со стороны внешних наблюдателей, например, иностранных контрольно-надзорных органов и торговых партнеров.

Кроме универсальных задач создания ранжирования микроорганизмов и химических веществ перед контрольно-надзорными органами стоит задача применения риск-ориентированного подхода к распределению числа проверок, распределению числа отобранных проб и исследований между конкретными участниками оборота сельскохозяйственной продукции: странами-экспортерами, регионами РФ и хозяйствующими субъектами. Данная задача осуществляется по тому же принципу масштаба потенциального вреда, но его оценка ведется по иной методике, т.к. к опасным последствиям прибавляется характеристика распространения этого вреда на людей с продукцией хозяйствующего субъекта, определяемая количественными характеристиками деятельности хозяйствующих субъектов, преимущественно экономическими. Из суммарных характеристик хозяйствующих субъектов в конечном счете складываются и характеристики стран и отдельных территорий.

Развитие системы ранжирования хозяйствующих субъектов будет происходить в направлении интеграции экономических оценок ущерба и эпизоотических оценок вероятности и масштаба развития эпизоотических процессов. Представление научного обоснования позволяет надлежащим образом защитить безопасность агропромышленного комплекса и принять более верное решение для регулирования взаимовыгодной международной торговли, широкое участие в которой (теперь и с животноводческой продукцией) в ближайшем будущем обусловлено нынешними успехами.

Ключевые слова: анализ рисков, риск-ориентированный подход, ранжирование химических веществ, ранжирование микробиологических организмов, токсикоинфекций, *Salmonella* spp., *Listeria* spp., рейтинг хозяйствующих субъектов, риск-ориентированный мониторинг, ФАО, ВОЗ.

Specificity of the risk - based approach in the sphere of veterinary control

Burlakov S. V.,

Risk analysis is one of the most effective methods of food and feed quality and safety monitoring, recommended by international organizations. It is based on ranking of the safety indicators (biological, chemical, physical etc.) depending on the damage that they can cause. The application of the risk analysis method will allow to minimize the damage caused by foodborne infections (*Salmonella* spp., *Listeria* spp.), hazardous chemicals and to optimize the government supervisory measures.

The flexibility of risk analysis methods allows to apply them to divergent goals: border control, domestic market monitoring, targeted programmes organization etc. Regularization of safety indicators ranking approaches simplifies development of listed above measures and assessment of their objectivity by external auditors, for example, foreign supervisory authorities and trade partners. Besides universal problems of microorganisms and chemical ranking a challenge of risk-based approach applying to distribution of inspection audits, samples and tests among the economic agents (exporting countries, regions of Russian Federation, commercial entities) stands in front of supervisory authorities. The challenge is performed by the same principle of potential damage scale, but it's assessment is performed with other technique because propagation parameters of the damage with production of the commercial entities are added to the potential damage hazard effects. A quantity indicators of the potential damage scale are predominantly economic results. Countries and areas ratings could be finally established from summary of it's commercial entities quantity indicators.

The suggested ranking registers any scientific evidence of potential harm as opposed to the technique applied by international expert organizations. The ranking technique, developed in correlation with the international standards, was applied to the groups of microorganisms that must be monitored by Russian Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhoz nadzor).

The ranking development will be aimed at the integration of economic damage assessment and assessment of probability and scale of epizootic processes. The presentation of the scientific grounds allows us to protect the agricultural complex in an appropriate way and make better decisions concerning mutually profitable international trade regulation. Broad participation in the animal production trade in the near future is determined by the present-day success in the agricultural sector.

Key words: risk analysis, risk-based approach, ranking of hazardous chemicals, ranking of microorganisms, FAO, WHO, ranking of commercial entities, risk-based monitoring, *Salmonella* spp., *Listeria* spp., toxicoinfections.

Система анализа рисков

Внедрение системы анализа рисков при осуществлении внутренней и внешней государственной контрольно-надзорной деятельности. Актуальность системы анализа рисков объясняется необходимостью разработки и реализации полисистемного комплекса анализа рисков в государственной контрольно-надзорной деятельности в связи с изменением политических и экономических условий жизни страны, сопровождающихся как появлением новых рисков, игнорирование которых может нанести продовольственной безопасности России серьезный материальный урон, так и возникновением перспектив для увеличения экспортного потенциала в условиях импортозамещения [2, 4, 11].

Система позволит научно-обоснованно вводить меры (вводить научно-обоснованные меры), систематизировать информацию о структуре и полномочиях компетентного органа страны-торгового партнера, усовершенствовать уровень ветеринарного и фитосанитарного контроля внутри страны и на границе, проследиваемость потоков импорта и экспорта продукции, повысить качество мониторинга пищевой продукции, эпизоотической ситуации и т.д. [1, 3, 9].

Внедрение системы анализа рисков обеспечит повышение безопасности подконтрольной продукции, сокращение количества проверок и снижение нагрузки на добросовестный бизнес, а также достижение максимальной эффективности по результатам деятельности в части распределения финансовых и производственных ресурсов в целом. Применение риск-ориентированных подходов в контрольно-надзорной деятельности позволит существенно сократить уровень административного воздействия на бизнес без ущерба продовольственной безопасности и повысить эффективность превентивных мер по недопущению ввоза некачественной продукции на территорию Российской Федерации [6, 10].

Переход на риск-ориентированный подход в полной мере отражает практику развитых зарубежных стран, которые уже в течение многих лет его успешно применяют. Так, мировой опыт использования риск-ориентированного подхода свидетельствует о том, что, сохраняя и даже повышая уровень безопасности в контрольной сфере, его применение позволило сократить общее количество проверок на величину от 30 до 90 процентов от начального числа, а отдельные категории бизнеса и вовсе освободить от необходимости прохождения плановых проверок

Риск-ориентированный контроль на границе

Риск-ориентированный контроль на границе предназначен для обеспечения комплексной безопасности и качества поднадзорных грузов при перевозках, принятия оперативных решений и защиты от новых ветеринарных и фитосанитарных рисков, вызванных различными внешними факторами международной торговли, которые обуславливают необходимость усиления контроля импортируемой сельхозпродукции и создания комплексной системы, учитывающей возможные риски и одновременно проводить проверку исходя из принципа выборочности, осуществляя фактический досмотр подконтрольных товаров только в целях исполнения требований законодательства Российской Федерации и Евразийского экономического союза в сфере ветеринарии и области обеспечения карантина растений.

Риск-ориентированный контроль на границе позволит осуществлять проверки адресно и идентифицировать добросовестных производителей, в отношении которых рекомендуется более низкая частота проверок, повысить точность выборки партий продукции для проверки (повысит скорость обработки грузов), а также снизить нагрузку на пункты пограничного ветеринарного и фитосанитарного контроля [14, 15].

В рамках контроля на границе разрабатываются "досье стран", которые, в частности, содержат в себе ретроспективные данные торговых отношений экспортеров с Российской Федерацией, история выявления превышений максимально допустимых концентраций показателей безопасности в пищевой продукции и кормов, характеризует надежность страны-производителя (профиль страны-торгового партнера), ветеринарной службы страны, предприятия (рейтинг хозяйствующих субъектов) и безопасность производимой им продукции (результаты мониторинговых исследований), а также транспортной компании.

Риск-ориентированный государственный мониторинг.

В основе управляющих решений по обеспечению ветеринарной безопасности, основанных на риск-ориентированном мониторинге качества и безопасности пищевой продукции, на территории Российской Федерации лежат принципы предосторожности и научной оценки рисков.

Риск-ориентированный мониторинг разработан для оценки и прогнозирования рисков относительно продукции, производимой на территории РФ для внутреннего потребления, а также импортной и экспортной продукции [5, 7].

Риск-ориентированный государственный мониторинг состоит из двух основных блоков: химические и микробиологические риски. В рамках создания риск-ориентированного Государственного мониторинга были разработаны системы ранжирования химических и микробиологических показателей безопасности. Ранжирование химических по-

казателей безопасности основано на квалификации химических веществ по наличию генотоксичных и канцерогенных свойств. Более подробно данное ранжирование опубликовано в статье "Ранжирование химических рисков в пищевой продукции и кормах по степени опасности", 2016 год авторов А.С. Хишов, Е.В. Мельничук, С.В. Бурлаков. Ранжирование микробиологических показателей безопасности основано на свойстве микробиологических организмов вызывать летальность [12].

Международные организации, такие как Кодекс Алиментариус, ФАО, ВОЗ, специализирующиеся на обеспечении безопасности пищевой продукции, рекомендуют переходить на риск-ориентированный контроль безопасности пищевой продукции. Ранжирование микробиологических и химических показателей позволяет оценить опасность, наносимую микроорганизмами или химическими загрязнителями, в дальнейшем это позволит составить список приоритетных показателей для обеспечения биобезопасности. Микробиологические показатели и химические показатели имеют разные критерии оценки опасности, что вызвало необходимость создания двух разных подходов [13].

Рейтинг хозяйствующих субъектов

Согласно Федеральному закону № 294 "отнесение к определенному классу опасности осуществляется органом государственного контроля, методики такого расчета утверждаются федеральными органами исполнительной власти, осуществляющими функции по выработке государственной политики и нормативно-правовому регулированию в соответствующей сфере деятельности", соответственно методики по ранжированию хозяйствующих субъектов и присвоения класса опасности формируют органы исполнительной власти самостоятельно. Таким образом, на уровне Россельхознадзора ведутся разработки правила отнесения хозяйствующих субъектов к определенным категориям риска в рамках осуществления контрольно-надзорной деятельности в области сельского хозяйства.

Рейтинг хозяйствующих субъектов – один из основополагающих модулей системы "умного контроля", разработанный для оценки и прогнозирования рисков хозяйственной деятельности. Данный рейтинг включает следующие основные виды подсистем: оценка информационной насыщенности, оценка производственных показателей и подсистема профилей рисков.

"Умный контроль" посредством использования рейтинга хозяйствующих субъектов – это новое качество государственного контроля, комплексная система, разработанная в целях стимулирования замещения импорта продукцией, произведенной внутри страны, а также для конструктивного взаимодействия бизнеса и власти.

Данная система позволяет осуществлять эффективное управление и повысить его качество, обеспечивая лучшие условия для повышения экспортного потенциала в условиях нестабильности.

Переход на риск-ориентированный подход в полной мере отражает практику развитых зарубежных стран, которые уже в течение многих лет его успешно применяют. Так, мировой опыт использования риск-ориентированного подхода свидетельствует о том, что, сохраняя и даже повышая уровень безопасности в контрольной сфере, его применение позволило сократить общее количество проверок на величину от 30 до 90 процентов от начального числа, а отдельные категории бизнеса и вовсе освободить от необходимости прохождения плановых проверок.

Риск-категорирование хозяйствующих субъектов – выявление в ходе совершения операций с объектами ветеринарного и карантинного фитосанитарного контроля признаков рисков, а также использование сведений об уровне риска хозяйствующих субъектов при применении мер по минимизации рисков.

Риск-категорирование и актуализация категорий уровня риска хозяйствующих субъектов осуществляется на основе регулярного и всестороннего анализа находящихся в распоряжении уполномоченных органов сведений о дея-

тельности хозяйствующих субъектов, а также результатах совершения хозяйственных операций в отношении подконтрольных товаров, в том числе документов и сведений, самостоятельно представляемых хозяйствующими субъектами, а также находящимися в информационных ресурсах уполномоченных органов.

Для объективности результатов деятельности/решений контрольно-надзорных органов относительно добросовестности ведения бизнеса, безопасности производства продукции и соответствующего качества органы государственной власти должны располагать необходимой информацией относительно показателей деятельности организации, чтобы судить об окружающей, в которой находится организация, о ключевых процессах, которые могут влиять на результат деятельности (качество и безопасность производимой продукции), о роли факторов влияния и различных критериях к оценке рисков – все, что поможет выявить и оценить природу и сложность рисков.

Заинтересованность компании своевременно предоставлять достоверную информацию о своей деятельности объясняется тем, что от присвоения того или иного рейтинга хозяйствующего субъекта будет зависеть частота осуществления инспекций предприятий и отбора проб производимой им продукции [8]. В целях минимизации возможной погрешности и противостояния недостоверности сведений необходимо сотрудничество между частным и государственным секторами, которое поможет нарастить потенциал российских производителей, оказать содействие российским производителям продукции животного происхождения в получении доступа на рынки зарубежных стран (создание портала с обратной связью, возможность получения оперативной консультации и т.д.).

Список литературы

1. Belimenko, V.V. Prospects for the use of Geographic Information Systems for risk-based monitoring of natural focal diseases of animals and humans // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. -2016. -Vol. 56. -No. 8. -pp. 22-25.
2. Burlakov S.V. Tasks of veterinary service to ensure the biological safety of poultry products in the Russian federation: analysis and assessment of risks. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Т. 59. № 11. С. 181-185.
3. Pimenova V.V. The role of farming poultry's salmonella pathogens in infection and pathology of human disease. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017. Т. 62. № 2. С. 282-289.
4. Апалькин В.А. Бешенство животных в России. Особенности современной эпизоотической обстановки // Ветеринария. 2004. № 12. -С. 3-7.
5. Гулюкин М.И. Мониторинг эпизоотической ситуации

по протозойным кровепаразитарным болезням домашних животных в Российской Федерации (2007-2012). // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные, №4, 2013 -с. 36-40.

6. Гулюкин, М.И. Методические рекомендации по расчёту годовой потребности в биопрепаратах для проведения профилактических и противоэпизоотических мероприятий в хозяйствах всех форм собственности. / Рассмотрены и одобрены на секции "Инфекционная патология животных" отд. Ветеринарной медицины РАСХН. -Москва -2007. -24 с.

7. Жаров, А.В. Патологоанатомические и гистологические исследования в системе мониторинга патологических процессов в организме сельскохозяйственных животных, птиц и рыб // Ветеринарный консультант. -2007. -№ 9-10. -С. 4-50.

8. Колесникова Ю.Н. Методические рекомендации по профилактике и ликвидации сальмонеллёзов сельскохозяйственных животных, в том числе птиц. // Москва, 2016.

9. Практическое пособие по мониторингу бруцеллеза, туберкулеза, паратуберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота: организационно-хозяйственные, ветеринарно-санитарные и зооигиенические аспекты профилактики и ликвидации этих инфекций. / Под ред. Академика РАН Гулюкина М.И. -М.: ООО Агентство творческих технологий, 2014; 76 стр.

10. Самуйленко А.Я. Рекомендации по проведению ветеринарной дезинфекции на животноводческих комплексах и биопредприятиях. // Рассмотрены на заседании секции ветеринарии НТС Минсельхоза России (протокол №19 от 15 апреля 2014 г.) / Москва, 2014.

11. Хисматуллина Н.А. Контроль эффективности вакинопрофилактики бешенства дикой фауны на территории Калининградской области // Ветеринарный врач. -2012. -№6. -С.8-11.

12. Хишов А.С. Ранжирование химических рисков в пищевой продукции и кормах по степени опасности. // Ветеринария Кубани - 2016. - № 6 (6).

13. Шевелева, А.С. Анализ микробиологического риска как основа для совершенствования системы оценки безопасности и контроля пищевых продуктов: автореферат / А.С. Шевелева - М., 2007.

14. Южаков А.Г. Использование ГИС-технологий при оценке рисков в эпизоотологическом исследовании // "Научные перспективы XXI века. Достижения и перспективы нового столетия", Сборник трудов X международной практической конференции, Новосибирск, 17-18 апреля 2015 г. -С. 50-54.

15. Юров, К. П. Работа референтных лабораторий МЭБ во ВНИИ экспериментальной ветеринарии имени Я.П. Коваленко, направленная на мониторинг инфекционных болезней и содействие международной торговле животными // Материалы V международной научно-практической конференции "Проблемы коневодства", г. Новосибирск, 22 -23 ноября. - 2012. -С. 12 -16

УДК 619:616.514.16-01/099

Диагностика Ig E – зависимых аллергий домашних животных

Вальциферова С.В. – кандидат биологических наук, доцент.

Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.П. Коваленко (ВИЭВ), 109428, Москва, РФ, Рязанский проспект, 24, 1, тел. (495)970-03-69

Аннотация. Аллергические заболевания представляют собой одну из глобальных проблем здравоохранения, так как за последние 50 лет в индустриально развитых странах наблюдается их устойчивый подъем. Разработка новых реагентов и технологий для исследований в области ветеринарной аллергологии позволила идентифицировать новые аллергены и уточнить механизмы их воздействия на организм. Несмотря на значительные успехи в изучении аллергий человека, остается ряд серьезных проблем, тре-

бующих совершенствования методов иммунодиагностики и профилактики данных заболеваний у животных.

Ключевые слова: аллергия, домашние животные, иммуноглобулины класса E, тучные клетки.

Diagnosis of Ig E – dependent allergies in domestic animals

Valtsiferova S.V.

Allergic diseases are one of the global health problems, as in the last 50 years in industrially developed countries there has been a steady increase. The development of new reagents and technologies for research in the field of veterinary allergology made it possible to identify new allergens and clarify the mechanisms of their effect on the body. Despite significant success in studying human allergies, there remain a number of serious problems requiring the improvement of immunodiagnostic methods and prevention of these diseases in animals.

Key words: Allergies, domestic animals, immunoglobulins of class E, fat cells.

Понятие "аллергия" (греч. "другое действие") предложено К. Пирке в 1906 г. В современной иммунологии этим термином объединены несколько вариантов изменений иммунной системы, лежащих в основе аллергических заболеваний. Один из показателей такого состояния – повышенная продукция иммуноглобулина класса E (IgE). Эволюционно этот класс Ig предназначен для нейтрализации крупных антигенов, которые не могут быть фагоцитированы целиком [1,2]. Выработка IgE стимулируется такими аллергенами, как шерсть, пыль, пыльца растений, пища, лекарства, паразиты, дрожжи, простейшие и др. Клинические признаки, при которых иммунная система продуцирует повышенные количества IgE и его высокоаффинного рецептора FcεRI [5], получили название "IgE – зависимые аллергии".

Иммунные механизмы, участвующие в развитии аллергических реакций это: а) увеличение в крови уровня общего и специфического IgE в ответ на слабый антигенный стимул, не вызывающий реакций у здоровых организмов (дисбаланс в субпопуляции Th1–Th2 в сторону преобладания Th2, которые дифференцируют В-лимфоциты в клетки образующие IgE и активируют образование эозинофильных и базофильных гранулоцитов цитокинами: ИЛ4, ИЛ13, ИЛ5 и TNF-α. В результате идет формирование аллергического фенотипа с IgE опосредованными реакциями гиперчувствительности немедленного – I типа.); б) нарушение функции лимфоцитов (снижение CD8-лимфоцитов и увеличение CD4-клеток с последующей их дифференцировкой в Th2 под действием ИЛ4 и ИЛ10, снижение продукции ИЛ-2, гиперреактивность В-лимфоцитов и т.д.); в) ингибирование хемотаксиса моноцитов и нейтрофилов, что снижает эффективность фагоцитоза [4].

Важнейшей особенностью клинических проявлений при воздействии одного и того же аллергена является видовая специфичность [10,11]. Например, у человека пыльца различных растений вызывает преимущественно аллергический ринит, у собак – экзематозные поражения (атопический дерматит), у кошек – бронхиальную астму и кожно-реактивные паттерны (комплекс эозинофильной гранулемы, зуд головы и шеи, симметричные самоиндуцированные алопеции), у лошадей – рецидивирующие обструкции или hives, а также зудящие дерматиты. У лошадей наиболее характерными клиническими признаками являются кожные и респираторные проявления. Ветеринарными специалистами [6] описаны ряд синдромов поражения кожи это – уртикария, мультиформная эритема (EM), эксфолиативный дерматит, листовидная пузырчатка (PF), лекарственные сыпи сходные с красной волчанкой (SLE, DLE), васкулит, реакции на лекарства со смешанным гистопатологическим характером, контактный дерматит. Для аллергического заболевания характерно острое начало (от 3 до 48 часов). Поражение развивается чаще на туловище (живот, пах, ноги), на границе кожи и слизистых оболочек, особенно в области рта и ушей. Со стороны респираторного аппарата: фырканье, сухой кашель, двустороннее истечения из носа, слезотечение, затрудненное дыхание, непереносимость физических нагрузок. Видовой особенностью однокопытных является выведение из организма раздражителя (асептической и септической природы) посредством гнойного воспаления с серозным отеком в первой фазе. В результате в течение 8–12 дней развивается сенсibilизация к антигену, что не наблюдается у животных других видов. В настоящее время сенсibilизация к одному или нескольким широко распространенным антигенам выявлена у 60% исследованных кошек, 80% собак и 75% лошадей, все чаще встречается поливалентная сенсibilизация т.е. аллергия становится полиорганной.

Современными исследованиями определены породы животных с высоким генетически обусловленным риском развития аллергий: 8 пород лошадей, 25 пород собак, 2 породы кошек [10,11,12]. Установлено наследование по доминантному типу. Для иппологии актуальной является

гиперчувствительность лошадей к укусам насекомых (insect bite hypersensitivity – IBH). Распространенность IBH варьирует от 3 до 60% в зависимости от окружающей среды и генотипа лошади. Аллергия на яд перепончатокрылых – это широко распространенное явление, которое представляет собой обширную локальную или системную аллергическую реакцию на жалящий укус. Клиническая симптоматика определяется тем, какие ткани находятся под кожей в месте укуса, диаметр локального ответа более 10 см, длительность более 24 часов. Системные реакции вызывают генерализованные проявления – от незначительных до угрожающих жизни. Слабо выраженные реакции могут ограничиваться кожными покровами (гиперемия, крапивница, ангионевротический отек). Более тяжелые сопровождаются бронхоспазмом, отеком гортани и гипотензией. Этот вид аллергии может спровоцировать анафилаксию с летальным исходом. Одни авторы [9] связывают с IBH респираторные проявления (атопический ринит и астма). Другие [10], наиболее характерной аллергической реакцией на укусы насекомых у лошадей считают IgE-опосредованный дерматит. Данное заболевание получило название летняя экзема или Квинсленд зуд. В качестве аллергенов для IBH были выделены белки слюнной железы насекомых из рода Culicoides: Cul p 4 – 7, Cul p 10, Cul o 5 и Cul o 7, вызывающие реакции немедленного типа с высвобождением сульфидолеикотриенов и гистамина при положительном внутрикожном тесте [7].

Серьезной проблемой сегодня стали нежелательные реакции на воздействие лекарственных средств – ADR (Adverse Drug Reaction), распространенность которых, по данным дерматологической службы США у лошадей составляет 9,8% от всех случаев заболеваний, у собак – 2%, у кошек – 1,6 % [10]. Различают иммуно-опосредованные и неиммуно-опосредованные реакции (ADR). Для неиммунных реакций кожные проявления не характерны. Иммуно-опосредованными формами являются крапивница и диффузный шелушащийся дерматит с алопециями – в 26,3% случаев. Для них характерны все 4 типа реакций гиперчувствительности [6].

Общепризнано, что для диагностики IgE-зависимых аллергических заболеваний требуется комплекс мероприятий [1,3] т.к. обнаружение аллерген специфического IgE еще не доказывает, что именно этот антиген ответственен за клиническую симптоматику. Окончательное заключение и интерпретация результатов могут быть сделаны только после сопоставления клинической картины с данными аллергологического анамнеза и подтверждены лабораторными методами. Причем при постановке диагноза аллергии недостаточно констатация повышения общего IgE в крови. Для поиска причинного аллергена необходимо выявлять специфические антитела класса IgE, хотя их отсутствие в сыворотке крови не исключает возможности участия в патогенезе заболевания IgE-зависимого механизма. Это обусловлено тем, что местный синтез IgE и сенсibilизация тучных клеток могут происходить при отсутствии специфического IgE в кровотоке, например, при аллергическом рините [5,8]. Важную информацию можно получить при анализе лейкоформулы, при прямой микроскопической оценке дегрануляции базофилов по окраске щелочными красителями или определению концентрации освобожденного гистамина из базофилов после стимуляции. Для больных с атопическим синдромом характерен повышенный уровень сывороточного эозинофильного катионного белка (ECP) даже при нормальном содержании эозинофилов в крови. Уровень сывороточного ECP превышает нормальный как при IgE - зависимых, так и при IgE - независимых атопических состояниях. Перечисленные методы имеют ряд ограничений, препятствующих их широкому распространению (воспроизводимость, специфичность, чувствительность) [4]. В настоящее время разработаны тесты: ELISA с поликлональным видоспецифичным IgE, радиоиммуносорбентный анализ [7,12], метод иммуоферментного определения цитокинов. При использовании последнего следует учитывать короткий период жизни медиаторов и преимущественно паракринный механизм влияния на клетки-мише-

ни, поэтому не все варианты изменения синтеза цитокинов могут быть зафиксированы при анализе образцов периферической крови. В научной литературе называют около 1000 разнообразных иммунологических методов, примерно 100 из которых использует для диагностики в медицинской аллергологии.

Новые реагенты и технологии для исследований в области ветеринарной аллергологии, позволили идентифицировать ряд аллергенов и уточнить механизмы их воздействия на организм для более глубокого понимания патогенеза аллергий. Однако в ветеринарии считают [10,11], что на сегодня недостаточно изучены достоверные ранние маркеры IgE-опосредованных заболеваний животных и видовые различия механизмов развития аллергии и воспаления. Кроме того, для высоко технологичных методов требуется производство видоспецифических компонентов. Поэтому в ветеринарной практике предпочитают использовать внутрикожные тесты, признанные экономически более целесообразными [8,9,11,12].

Таким образом, несмотря на значительные успехи в изучении аллергий, остается ряд серьезных проблем, требующих совершенствования методов иммунодиагностики данных заболеваний у животных.

Список литературы.

1. Аллергология. Федеральные клинические рекомендации. / под ред. акад. РАН Хаитова Р.М., проф. Ильиной Н.И. -М.: "Фармарус Принт Медиа".-2014. -126 с.
2. Гуцин И.С. IgE опосредованная гиперчувствительность как ответ на нарушение барьерной функции тканей. //Иммунология.-2015.-Т.36.-№1.-С.45-50

3. Ездакова И.Ю. Диагностический алгоритм определения иммунопатологий животных //Труды ВИЭВ.-Т.79.-С.181-189

4. Киническая иммунология и аллергология /под ред. А.В. Караулова.- М.: Мед. информ. Агентство. -2002.-651с.

5. Кубанов А.А., Абрамова Т.В. Распознающие рецепторы врожденного иммунитета (толл-подобные рецепторы) в патогенезе заболеваний кожи //Цитокины и воспаление.-2015.- Т.14. -№ 1.- С. 11-17

6. Робинсон Н.Э., Уилсон М. Р. Болезни лошадей Современные методы лечения/ М.Аквариум.- 2007.- С.211-258

7. Baselgia S, Doherr MG, Mellor P, Torsteinsdottir S, Jermann T, Zurbriggen A et al. Evaluation of an *in vitro* sulphidoleukotriene release test for diagnosis of insect bite hypersensitivity in horses. //Equine Vet J.- 2006.-V.38.-P.40-46

8. Jensen-Jarolim E., Einhorn L., Herrmann I., Thalhammer J. G, Panakova L. Pollen Allergies in Humans and their Dogs, Cats and Horses: Differences and Similarities.// Clinical and Translational Allergy.- 2015. -Vol.5-P.15

9. Janda J, Jensen-Jarolim E, Rhyner C, Marti E. Allergens in veterinary medicine.//Allergy European Journal of allergy and clinical immunology.- 2016.- Vol.71.- P. 27-35

10. Fadok VA. Update on equine allergies. //Vet Clin North Am Equine Pract.- 2013.-Vol.29.-P.541-550

11. Mueller RS, Janda J, Jensen-Jarolim E, Rhyner C, Marti E. Allergens in veterinary medicine. //Allergy - 2016. -Vol.71. - P. 27-35

12. Schaffartzik A, Hamza E, Janda J, Cramer R, Marti E, Rhyner C. Equine insect bite hypersensitivity: what do we know? //Vet Immunol Immunopath.- 2012.-Vol.147.- P.113-126.

УДК 576.54

Трехмерное культивирование ранних половых клеток хряка *in vitro*.

С.А.Васильева, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории стволовой клетки ФГБНУ ВИЭВ им. Я.Р.-Коваленко, Москва, s.vasileva89@yandex.ru.

Резюме: В последнее время разрабатываются методы культивирования сперматогониевых стволовых клеток в трехмерной культуре. Возможность культивировать ранние мужские половые клетки и подвергать их дифференцировке с целью получения зрелых гамет *in vitro*, является актуальной задачей как для биологии, так и для ветеринарной и регенеративной медицины. К настоящему моменту разрабатывается несколько подходов для решения данного вопроса, однако полного цикла развития сперматогенеза из ранних мужских половых клеток *in vitro* получить не удалось. Основываясь на том, что *in vivo* сперматогенез происходит в трехмерной структуре, в извитых семенных канальцах мужских половых желез, можно предположить, что для получения сперматозоидов из сперматогоний *in vitro* необходимо создать поддерживающую структуру, которая бы напоминала нативную. В своем исследовании мы проанализировали возможность культивирования ранних половых клеток хряка в матриксах, представленных 2,5 % раствором метилцеллюлозы, коллагеновыми губками, 2 % и 5 % растворами желатина и альгинатом натрия. Оценивали результат по скорости пролиферации, витальности, степени и наличию дифференцировки. На основании полученных данных установили, что в матрицах, представленных коллагеновыми губками и альгинатом натрия, наблюдается пролиферация ранних половых клеток хряка, однако они имеют ряд недостатков, которые сдерживают их использование. Анализ желатиновых гелей показал их не термостабильность, вследствие чего экспериментальные клетки во время культивирования выпадали в осадок, однако при этом оставались жизнеспособными. По результатам исследования выявили преимущества использования в качестве матрицы 2,5 % раствора метилцеллюлозы, который позволяет создавать и комбинировать различные градиенты.

Установлено, что совместное культивирование ранних половых клеток хряка и соматических клеток в трехмерной системе, представленной метилцеллюлозой, способствует формированию структуры, подобной ткани семенника 3Д *in vitro*, что свидетельствует о влиянии микроокружения на половые клетки.

Ключевые слова: ранние половые клетки, сперматогонии, хряк, трехмерное культивирование.

Culturing of boar early germ cells into three-dimensional system *in vitro*

S.A.Vasileva

In recent years, methods of culturing of spermatogonial stem cells in three-dimensional culture have been developed. The possibility to cultivate early male gametes and to subject them to differentiation in order to produce mature gametes *in vitro* is an urgent task for biology, veterinary and regenerative medicine. Nowadays, there are several developing approaches to address this issue; however, scientists have failed to obtain a full cycle of spermatogenesis from early male germ cells *in vitro*. Based on the fact that spermatogenesis occurs *in vivo* in a three-dimensional structure (i.e. in the convoluted seminiferous tubules of the android glands), it can be assumed that in order to obtain mature male germ cells from spermatogonia *in vitro*, it is necessary to create a supportive structure that resembles the native one. This study analyzes the possibility of growing boar's early germ cells in the matrixes including 2.5% solution of methyl cellulose, collagen sponges, 2% and 5%, solutions of gelatin and sodium alginate. The results were evaluated by the rate of proliferation, vitality, presence and degree of differentiation. Based on the obtained data, it was found that in the matrixes with collagen sponges and sodium alginate, proliferation of boar's early male germ cells does occur, but they have several drawbacks that hinder their use. An analysis of gelatin gels showed lack of their thermal stability, because of which the experimental cells precipitated during the cultivation; however, the cells remained viable. The study revealed the benefits of using a 2.5% methyl cellulose solution as a matrix – it allows creating and combining various gradients. It has been

established that conjoint cultivation of boar's early male germ cells and somatic cells in a three-dimensional system with methylcellulose promotes the formation of a structure similar the testis tissue obtained in 3D in vitro, which indicates the influence of the microenvironment on reproductive cells.

Keywords: early germ cells, spermatogonia, boar, three-dimensional culture.

Введение

Сперматогенез млекопитающих, в том числе сельскохозяйственных животных, – это важный и сложный процесс, который изучается достаточно давно. Проведено множество исследований, позволивших выявить условия необходимые для регуляции, пролиферации и дифференцировки ранних половых клеток in vitro (Савченкова И.П., 2012, 2015) [4,6]. К настоящему моменту полного цикла развития сперматогенеза с-х животных из сперматогониевых стволовых клеток in vitro получить не удалось, несмотря на разработки различных подходов для решения этой задачи (Gadella B.M. et al., 2015) [9]. В последние годы предпринимаются попытки адаптировать трёхмерное культивирование (3Д) для сперматогенных клеток с целью получения половых клеток на разных стадиях своего развития в культуре (Васильева С.А. Савченкова И.П., 2014) [1,2]. Преимущества 3Д по сравнению с двухмерным культивированием (2Д) очевидны и состоят в том, что исследователь может точнее воспроизвести окружающую среду для стволовых клеток (ниши) семенного канальца и архитектуру расположения клеточных популяций по отношению друг к другу. Установлено, что использование трёхмерного культивирования позволило добиться некоторого успеха и продвинуться в вопросах культивирования сперматогоний млекопитающих. Имеются сообщения об использовании для этих целей матриц, представленных коллагеном, желатином, агаром и биоактивными полимерами. Было показано, что в такой системе клетки могут преодолевать мейоз и формировать удлинённые сперматиды (Lee J.H. et al., 2006, 2007; Stukenborg J.B. et al., 2008, 2009; Abu Elhija M. et al., 2012; Reuter K. et al., 2014) [7,9,10,11,12,13]. Создание трехмерных систем для культивирования способствовало расширению знаний о взаимосвязи соматических клеток с половыми клетками, а половых клеток с внеклеточным матрик-

сом (ВКМ), что позволило значительно продвинуться в понимании роли этих взаимодействий в процессе сперматогенеза (Lee J.H. et al., 2006) [10]. Однако все предпринятые на сегодняшний день попытки воспроизвести полный сперматогенез в 3Д структуре, оказались unsuccessful, несмотря на очевидные преимущества 3Д культивирования над 2Д.

Цель работы

В связи с этим целью нашей работы было изучить возможность трехмерного культивирования ранних половых клеток хряка in vitro.

Материалы и методы

Исследование проводили на базе лаборатории стволовой клетки ФГБНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко. В качестве объекта использовали ранние половые клетки, выделенные из тестикул неполовозрелых помесных 40 – 60 сут хряков, выращенные в КФХ Корнево Истринского района Московской области. При кастрации животных для инфильтрационной анестезии подкожной клетчатки использовали 0,5%-ный раствор новокаина в область мошонки, для проводниковой анестезии 2%-ный раствор новокаина в каждый семенной канатик. В лабораторию материал был доставлен в термосе на льду при температуре от 0 до +4 °С. Вес яичек с придатком составлял 15–18 г.

Тестикулы были отделены от мошонки и декапсулированы. Далее ткань измельчили и подвергли ферментативной обработке коллагеназой 1-го типа при $t = 37^{\circ}\text{C}$, периодически помешивая. Через 40 мин клеточную суспензию центрифугировали (15 мин, 500g) и пропускали через нейлоновые ситечки с размером пор 40 мкм для удаления соматических клеток. Очистку сперматогоний от других клеточных типов проводили, используя прерывистые градиенты Перколла с последующим разделением по адгезии, по описанной нами ранее методике (Савченкова И.П. и др. Цитология, 2016) [3]. В качестве матрикса были использованы: альгинат натрия, 2% и 5% растворы желатина, коллагеновые губки, а также 2,5% раствор метилцеллюлозы, приготовленный на основе среды ДМЕМ, содержащей 4,5 г/л глюкозы, 15% сыворотки крови плодов коров (СкПК), 2 мМ аланил-глутамин, 0,1 мМ заменимых аминокислот, 50 Ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Загрузку ран-

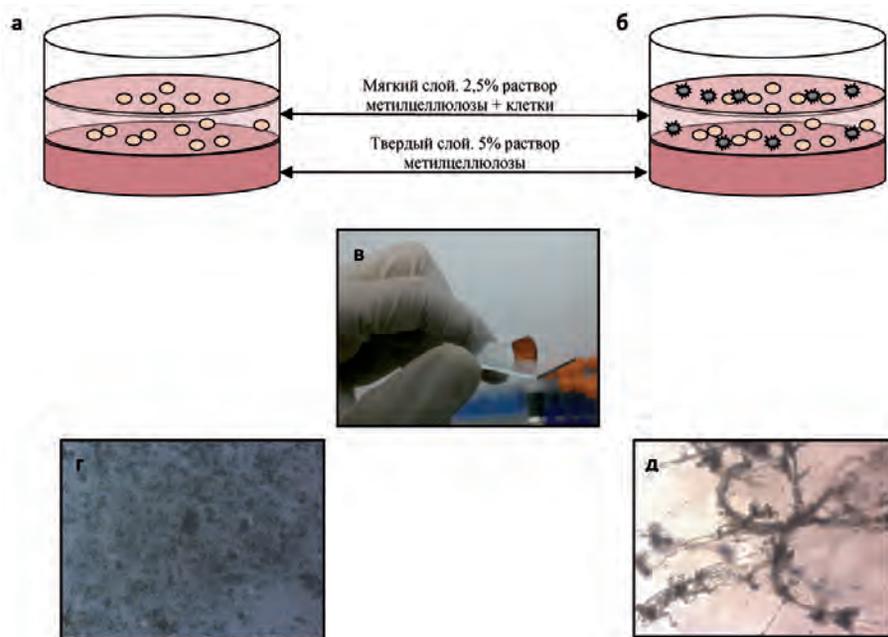


Рис. 1. Культивирование ранних половых клеток в матриксе на основе метилцеллюлозы, состоящего из двух слоев: твердый нижний слой и мягкий верхний слой.

- а) 1ая экспериментальная группа - ранние половые клетки хряка, очищенные от соматических клеток;
 б) 2ая экспериментальная группа - смесь ранних половых и соматических клеток хряка;
 в) формирование гелеподобной структуры;
 г) пролиферация очищенных ранних половых клеток хряка, 21 сут культивирования. Ув.: ок. $\times 10$, об. $\times 20$.
 д) формирование тяжей, подобных семенным канальцам хряка, на 21 сут культивирования неочищенных ранних половых клеток хряка. Ув.: ок. $\times 10$, об. $\times 10$.

них половых клеток в трёхмерные матриксы (альгинат натрия, коллагеновые губки и желатиновые губки) осуществляли с помощью метода статического насыщения, описанного нами ранее (Савченкова И.П. и др. 2014) [5]. При культивировании клеток в жидких и полужидких гелях использовали метод "простого сэндвича", в каждом матриксе сформированы две испытательные группы: в первой группе в 3Д матрикс загружали чистую культуру сперматогоний, а во второй группе – смесь сперматогоний и соматических клеток (1?105кл) (клетки Сертоли, клетки Лейдига). Чашки экспериментальных групп культивировали при 37°C и 5% CO_2 . Анализ проводили на 7-е, 14-е и 21-е сут.

Степень дифференцировки оценивали визуально по морфологии как в нативных препаратах, так и в окрашенных по Гимза гистологических срезах, с помощью микроскопа Carl Zeiss и программы Axio Vision Rel 4.8. Уровень пролиферации определяли по приросту клеток. Используя окраску трипановым синим (0,1%-ый раствор) анализировали клеточную витальность.

Результаты исследований

В результате проведённых экспериментов было установлено, что в матриксах, представленных коллагеном и альгинатом натрия, в обеих группах

наблюдалась пролиферация ранних половых клеток без признаков дифференцировки в течение 21 сут. Однако они имели недостатки, которые могут сдерживать их использование. Так, матриксы, представленные альгинатом натрия, оказались хрупкими, что затрудняло загрузку клеток в них и приготовление гистологических срезов. Коллагеновые матриксы характеризовались наличием крупных пор, что затрудняло адгезию клеток, так как основная масса оказывалась на дне чашки Петри. Так, было установлено, что при загрузке клеток в концентрации 3×10^6 клеток на $10 \times 10 \times 3$ мм матрикса, $2,5 \times 10^6$ клеток были обнаружены на дне чашки после 2 ч насыщения. Таким образом, эффективность заселения сперматогониевых клеток коллагеновых матриксов составляла 15 %. Все желатиновые гели оказались не термостабильными и экспериментальные клетки во время культивирования выпадали в осадок, однако при этом оставались жизнеспособными.

Выявлены преимущества использования в качестве матрикса метилцеллюлозы, которая позволяет создавать и комбинировать различные градиенты (Рис. 1 а, б, в). Установлено, что сперматогонии в 2,5 % растворе метилцеллюлозы остаются жизнеспособными вплоть до 21 сут. Предварительно очищенные от соматических клеток сперматогонии размножались без признаков дифференцировки и к 21 сут их численность увеличилась в 2,5 раза (Рис. 1г). У неочищенных сперматогоний наряду с увеличением общего числа клеток, наблюдали процесс дифференцировки, который сопровождался на 7 сут образованием цепочек клеток, тяжей и формированием семенных канальцев на 21 сут (Рис 1д). Совместное культивирование сперматогоний и соматических клеток в трехмерной системе, представленной метилцеллюлозой, способствует образованию ткани семенника в 3Д in vitro.

В результате анализа полученных данных установлено, что ранние половые клетки в обеих экспериментальных группах оставались жизнеспособными вплоть до 21 сут, однако при дальнейшем культивировании было отмечено подсыхание матрицы, которое не позволило удлинить сроки эксперимента. Гистологический анализ показал в обеих группах равномерное распределение клеток по верхнему слою матрицы. Однако при сравнительном анализе были выявлены и значительные различия.

Заключение

Получены научные знания об использовании в качестве матрикса для трёхмерного культивирования ранних половых клеток хряка различных материалов, представленных коллагеновыми губками, желатиновыми гелями, метилцеллюлозой и альгинатом натрия. Показано, что в матриксах, представленных коллагеном и альгинатом натрия, наблюдается пролиферация ранних половых клеток, однако они имеют недостатки, которые сдерживают их использование. Выявлены преимущества использования в качестве матрикса метилцеллюлозы, которая позволяет

создавать и комбинировать различные градиенты. Установлено, что совместное культивирование сперматогоний и соматических клеток в трехмерной системе, представленной метилцеллюлозой, способствует формированию структуры, подобной ткани семенника в 3Д.

Литература

1. Васильева С.А., Савченкова И.П. Культивирование сперматогоний хряка в метилцеллюлозе // 2-й Национальный конгресс по Регенеративной медицине. Материалы конгресса. М.: "МЕДИ Экспо". - 2015. - С. 36.
2. Васильева С.А. Савченкова И.П. Культивирование сперматогониевых клеток в трёхмерной системе in vitro // VIII Московский международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития". Материалы конгресса. Москва. - 2014. - С. 105.
3. Савченкова И.П., Васильева С.А. Культивирование сперматогоний хряка на клетках Сертоли // Цитология. СПб.: "Наука" РАН. - 2016. - Т. 58. № 2. - С. 135-142.
4. Савченкова И.П., Васильева С.А. Наставления по поддержанию половых клеток хряка in vitro для получения новых клеточных систем в биотехнологии, медицине и ветеринарии. М.: "Спутник+". - 2015. - 16 с.
5. Савченкова, И.П., Коровина Д.Г., Васильева С.А. Гулюкин М.И. Методические наставления по трехмерному культивированию мультипотентных мезенхимных стволовых клеток сельскохозяйственных животных in vitro. М.: "Спутник +". - 2014. - 12 с.
6. Савченкова И.П. Сперматогонии хряка в культуре. М.: ООО Агентство творческих технологий. - 2012. - 124 с.
7. Abu Elhija M., Lunenfeld E., Schlatt S., Huleihel M. Differentiation of murine male germ cells to spermatozoa in a soft agar culture system // Asian J Androl. - 2012. - 14(2). - P. 285-293.
8. Gadella B.M., Ferraz M.A. A Review of New Technologies that may Become Useful for in vitro Production of Boar Sperm // Reprod Domest Anim. - 2015. - Vol. 50. - P. 61-70.
9. Lee J.H., Gye M.C., Choi K.W., Hong J.Y., Lee Y.B., Park D.W., Lee S.J., Min C.K. In vitro differentiation of germ cells from nonobstructive azoospermic patients using three-dimensional culture in a collagen gel matrix // Fertility and Sterility. - 2007. - Vol. 87. - P. 824-833.
10. Lee J.H., Kim H.J., Kim H., Lee S.J., Gye M.C. In vitro spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix // Biomaterials. - 2006. - Vol. 27. - P. 2845-2853.
11. Reuter K., Ehmcke J., Stukenborg J.B., Simoni M., Damm O.S., Redmann K., Schlatt S., Wistuba J. Reassembly of somatic cells and testicular organogenesis in vitro // Tissue Cell. - 2014. - Vol. 46(1). - P. 86-96.
12. Stukenborg J.B. Coculture of spermatogonia with somatic cells three-dimensional soft-agar-culture-system // Journal of Andrology. - 2008. - Vol. 29, N 3. - P. 312-329.
13. Stukenborg J.B., Schlatt S., Simoni M., Yeung C.H., Elhija M.A. et al. New horizons for in vitro spermatogenesis? An update on novel three-dimensional culture systems as tools for meiotic and post-meiotic differentiation of testicular germ cells // Mol. Hum. Reprod. - 2009. - Vol. 15. - P. 521-529.

Подписной индекс журнала
«Ветеринария и кормление» в объединенном зеленом каталоге

«Пресса России» –

4 2 1 1 1

Подписка – обязательное условие для бесплатной публикации научных статей

УДК 619: 616.937.5

Моноклональные антитела в ветеринарной иммунодиагностике

Верховский О.А. – доктор биологических наук, профессор

АНО "Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных", г. Москва, Россия

Аннотация. В статье приведена информация о разработке и применении современных иммунодиагностических методов с использованием моноклональных антител (МкА). Представлены данные о значительной роли гибридомной технологии и МкА в иммуноферментном анализе и иммунохроматографическом методе, являющихся одними из самых эффективных и востребованных практикой методов диагностики инфекционных болезней животных. Показана практическая эффективность нового варианта ИФА для дифференцирования IgM- и IgG-антител к цирковирусу свиней 2 типа и обсужден вопрос о дальнейших перспективах такого подхода для вируса африканской чумы свиней и других вирусов животных.

Ключевые слова: моноклональные антитела, иммунодиагностические методы, ИФА, диагноз, иммунный ответ.

Usage of monoclonal antibodies for the development of the immunoassays for the veterinary diagnostics

Verkhovsky O.A.

In article the information on development of applied directions of modern immunoassays using monoclonal antibodies (Mabs) is resulted. The practical contribution of hybridoma technology and Mabs production is shown, to working out of new methods and approaches including different variants of ELISA and immunochromatography test to diagnostics of infectious diseases of animals. The efficacy of a new type of ELISA for the differentiation of IgM- and IgG- antibodies to porcine circovirus type 2 in serum samples was shown. Further development of different types of immunoassays which practical results for African swine fever virus and other viruses of animals is discussed.

Key words: monoclonal antibodies, immunoassays, ELISA, diagnosis, immune responses.

Введение

Ведущее место в структуре лабораторных исследований занимают иммунологические (иммунодиагностические) методы количественной оценки прямого взаимодействия в системе антиген (эпитоп) – антитело (паратоп) *in vitro*, позволяющие диагностировать то или иное заболевание посредством выявления возбудителя и/или специфических антител в биологическом материале. Одними из самых эффективных и востребованных практикой методов диагностики и эпизоотологического мониторинга инфекционных болезней животных являются иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохроматографический метод (ИХМ), иммуноблоттинг (ИБ), реакция иммунофлюоресценции (РИФ), иммуногистохимический метод (ИГХ), при постановке которых в качестве основных реагентов применяются поликлональные антисыворотки (ПА) или моноклональные антитела (МкА). При своей ценности использование ПА в иммунологических тестах ограничено, поскольку они представляют собой смесь антител, образующихся в результате функционирования многочисленных клеточных клонов и, следовательно, гетерогенных на самых разных уровнях: по изотипу, специфичности, активности и аффинности. Поэтому, очистка ПА до той степени специфичности, которая необходима для выявления отдельных структур и антигенных различий между молекулами на уровне индивидуального эпитопа, представляется практически невозможной задачей. Разработанный в 1975 г. Г.Келлером (George

Kohler) и С. Мильштейном (Cesar Milstein) метод получения гибридом, продуцирующих МкА заданной специфичности, открыл новую эру в биологической науке (Нобелевская премия по физиологии и медицине в 1984 г. за "открытие и разработку принципов выработки моноклональных антител с помощью гибридом"). Особая ценность МкА предопределяет их использование для проведения исследований различных антигенов, где их чувствительность и специфичность способствуют решению множества проблем, которые не могут быть решены с помощью ПА. Являясь реагентами направленного действия, МкА позволяют идентифицировать отдельные эпитопы в сложных композициях антигенных структур, способны значительно упростить многие тесты и значительно расширить число выявляемых молекул. Таким образом, применение МкА решает главную задачу при разработке любой иммунодиагностической тест-системы – обеспечение высокой чувствительности и специфичности анализа, наряду с высокой воспроизводимостью результатов, стабильностью и стандартизацией реагентов. В нашей стране первые гибридомы, МкА которых использовались в диагностических целях, были получены в начале 80-х годов прошлого столетия в медицине, а в середине-конце 80-х годов – в ветеринарии (ВИЭВ им.Я.Р. Коваленко, г. Москва, ВНИИВВиМ, г. Покров и др.). Специалисты НПО НАРВАК впервые внедрили в ветеринарную практику нашей страны готовые ИФА-наборы на основе МкА, которые уже много лет используются в лабораториях для диагностики чумы, парвовирусного энтерита и аденовирусной инфекции собак, трансмиссивного гастроэнтерита свиней и других инфекционных заболеваний животных [2, 4, 9, 13]. На сегодняшний день гибридомная технология, основные принципы которой достаточно подробно изложены в нашем раннем обзоре [10], позволяет получать МАТ практически на любой существующий антиген и по своим масштабам не имеет конкуренции в биотехнологической индустрии, являясь лидером по коммерческому обороту.

Использование МкА в ИФА, ИХМ, РИФ, ИГХ для выявления антигенов возбудителей инфекционных болезней животных.

"Сэндвич" – ИФА. Такой вариант анализа предопределяет использование МкА, направленных к разным эпитопам структурного белка соответствующего патогена. Для этого по результатам эпитопного картирования отбирали МкА, секретируемые независимыми гибридомами, распознающие структурно различающиеся и/или топографически удаленные эпитопы структурной субъединицы патогена. При использовании одних МкА в качестве иммуноферментного конъюгата, находящегося в жидкой фазе, а вторых – в качестве фиксирующих антител, иммобилизованных на поверхности пластика, происходит одновременное связывание антигена и отсутствует конкуренция между конъюгатом и иммуносорбентом за общие центры связывания. При высокой аффинности используемых МкА практическая эффективность метода очень высока [3]. Кроме прикладного использования в диагностических тест-системах МкА эффективно используют для субтипирования штаммов вирусов, контроля вирусосодержащего сырья на различных этапах производства биологических препаратов, что и было нами продемонстрировано на модели инъекционных антирабических вакцин для собак и кошек [7].

ИХМ. Предназначен для проведения исследований не только в лабораторных, но и в полевых условиях с целью оперативного принятия решения в неотложных или подострых случаях. Относится к новым иммунохимическим аналитическим платформам, позволяющим с высокой чувствительностью регистрировать минимальные количества образовавшихся в результате реакции иммунных комплексов и в течение нескольких минут визуально определить и оценить содержание антигенов, антител, и других диагностически важных белков в организме человека и животных. Метод прост при применении, подходит для быстрого и одностадийного выявления вирусного антигена или антител; на принципе ИХМ основаны иммунохроматографические тест-системы (ИХТС) для диагностики инфек-

ционных болезней человека и животных, многие из которых уже производят в виде коммерческих наборов для определения разных возбудителей и антител к ним. Разработку ИХТС обычно предваряет разработка "сэндвич"-ИФА, являющегося ее прототипом, поскольку иммунологические принципы и основные специфические компоненты одинаковы для обоих методов. Так при производстве ИХТС для выявления вирусного антигена обычно используют два МкА к одному из структурных белков вируса и антивидовые МкА, предназначенные для контроля эффективности прохождения реакции. Более детально о принципах разработки, методах испытания и практической значимости "сэндвич"-ИФА, ИХТС, РИФ и ИГХ для диагностики инфекционных болезней животных и человека можно ознакомиться в наших опубликованных работах на примере африканской чумы свиней (АЧС) [5, 11, 12].

Использование МкА в ИФА для выявления специфических антител и оценки напряженности иммунитета. Тремя основными целями проведения подобных исследований являются: 1) ретроспективная диагностика болезни; 2) оценка формирования поствакцинального иммунного ответа и напряженности иммунитета; 3) оценка материнского иммунитета у молодняка в ранний постнатальный период. Для этих целей наиболее эффективными являются тест-системы на основе непрямого или конкурентного вариантов ИФА, при конструировании которых МкА используют в качестве: 1) реагентов, сенсибилизирующих антиген на твердой фазе; 2) антивидового конъюгата; 3) конъюгата антител, специфических искомого антигену. В этих случаях повышается специфичность метода за счет отсутствия адсорбции примесных белков антигенного препарата и предотвращения появления неспецифического взаимодействия между компонентами реакции. В ряде случаев используют несколько подходов одновременно. Так нами впервые в РФ был разработан ИФА для дифференцирования IgM- и IgG-антител к цирковирусу свиней 2 типа (ЦВС-2). Выбранный формат ИФА с использованием МкА к IgG и IgM в качестве "захватывающих" антител на твердой фазе, рекомбинантного белка С ЦВС-2 и ЦВС-2-специфических МкА в качестве "детектирующих" антител, позволил достичь высокой чувствительности и специфичности выявления ЦВС-2-специфических IgG- и IgM- антител [1, 6]. Полученные результаты могут использоваться для оптимизации сроков вакцинации и/или выявления инфицированных животных. Так, выявление IgM-антител к ЦВС-2 у серонегативных животных в свиноводческих хозяйствах является маркерным показателем недавнего (10–20 суток) заноса возбудителя в стадо и однозначно свидетельствует об инфекционном процессе в организме. При наличии антител обеих изотипов, можно говорить о более поздних сроках контакта с вирусом – до 5 недель. Следовательно, перед применением вакцин в хозяйстве, ветеринарным специалистам можно рекомендовать проводить выборочное серологическое обследование поголовья на наличие или отсутствие IgM-, IgG-антител для объективного анализа эпизоотической ситуации и последующей оценки эффективности специфической профилактики цирковирозных болезней свиней [8]. Подобный подход сейчас апробируется в отношении таких патогенов как вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней, вирус АЧС и др.

Заключение

В ветеринарии использование хорошо охарактеризованных МкА, обладающих строгой специфичностью и высокой степенью аффинности, позволило расширить спектр анализируемых патогенов, значительно улучшить параметры иммунодиагностических методов и усовершенствовать технологию производства коммерчески доступных диагностических наборов, предназначенных для выявления сверхмалых количеств биологических и химических веществ в организме животных, продуктах животноводства и окружающей среде. Эти простые и надежные тесты становятся основой лабораторных исследований. В частности, в состав большинства ИФА-наборов, предназначенных для

диагностики инфекционных болезней животных, внедренных в ветеринарную лабораторную практику нашей страны специалистами нашей организации, входят МкА.

Список литературы:

1. Арутюнова, М.А. Иммуноферментный метод выявления специфических антител классов IgG и IgM к цирковирусу свиней второго типа (ЦВС-2) / М.А.Арутюнова, В.В.Цибезов, С.А.Раев, М.И.Мусиенко, К.П.Алексеев, О.А.Верховский. Т.И.Алипер // Ветеринария. - 2014. - №8 - С.55-59.
2. Баландина, М.В. Иммуноферментная тест-система для выявления анти-тел к вирусу ТГС / М.В.Баландина, В.В.Цибезов, О.А.Верховский, И.В.Непоклонова, Т.И.Алипер // Ветеринария. - 2004. - № 4. - С.20-23.
3. Верховский, О.А. Иммунохимическая характеристика моноклональных антител к структурным белкам аденовируса собак серотипа 1 (CAV-1) и их использование для диагностики инфекционного гепатита плотоядных / О.А.Верховский, Л.В.Верховская, Ю.Н.Федоров, Е.Д.Захарова, В.И.Уласов // Сельскохозяйственная биология, 1996, №2- С.87-94.
4. Верховский, О.А. Разработка и совершенствование иммуноферментных тест-систем на основе моноклональных антител, предназначенных для диагностики инфекционных болезней животных / О.А. Верховский, В.В. Цибезов, Т.А.Чеботарева, М.В.Баландина, М.А.Смагина, И.В.Непоклонова, Т.И.Алипер // Ветеринарная патология, 2003, №1 (5). - С.107-109.
5. Жуков, И.Ю. Выявление клинико-анатомических, гистологических изменений при АЧС и локализации вируса в органах инфицированных животных / И.Ю. Жуков, И.В. Шевченко, А.С. Иголкин, А.В. Борисова, А.А. Егоров, В.В. Цибезов, О.А. Верховский, Н.Н. Власова // Российский Ветеринарный Журнал, серия "Сельскохозяйственные животные". - 2015. - №3. - С.36-39.
6. Козлов, А.Ю. Получение моноклональных антител к цирковирусу свиней второго типа (ЦВС-2) и их применение для диагностики цирковирозной инфекции / А.Ю. Козлов, Л.В.Костина, К.П.Алексеев, М.А.Арутюнова, Ю.О.Терехова, В.В.Цибезов, Т.И.Алипер, О.А. Верховский // Российский ветеринарный журнал, серия "Сельскохозяйственные животные". - 2013. - №2. - С.20-22.
7. Лосич, М.А. Разработка и использование ИФА для оценки содержания гликопротеина (G-белка) вируса бешенства / М.А.Лосич, И.В.Непоклонова, О.А. Верховский, С.В.Грибенча, М.В.Баландина, А.Н.Мухин, С.А.Раев, Т.И. Алипер // Ветеринария, 2012, №7. - С.30-35.
8. Раев С.А. Влияние колострального иммунитета на антигенную активность вакцины "ВЕРРЕС-ЦИРКО" и распределение изотип-специфических антител в иммунном ответе к цирковирусу свиней второго типа / С.А.Раев, М.А.Арутюнова, В.В.Цибезов, К.П.Алексеев, А.Д.Булгаков, М.М.Мусиенко, О.А.Верховский, А.Д.Забережный Т.И. Алипер // Ветеринария. - 2015. - №11. - С. 26-31
9. Сологуб, В.К. Оптимальный диагностический иммуноферментный набор для детекции парвовирусного энтерита собак / Сологуб В.К., Коромылова И.А., Чеботарева Т.А., Дудников Л.А., Непоклонова И.В., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А. // Материалы 8-го Международного конгресса по проблемам ветеринарной медицины мелких домашних животных, 2000, С. 216.
10. Федоров, Ю.Н. Моноклональные антитела - новый путь в иммунодиагностике и иммунопрофилактике инфекционных болезней животных / Ю.Н.Федоров, О.А.Верховский, Т.А.Феоктистова // Сельскохозяйственная биология. - 1990. - №2. - С. 22-38.
11. Цибезов, В.В. Разработка иммуноферментных методов диагностики африканской чумы свиней / В.В.Цибезов, Ю.О.Терехова, М.В. Баландина, О.Е.Латышев, Т.В.Гребенникова, О.А.Верховский, Т.И.Алипер, В.Н.Шевкопляс // Ветеринария Кубани. - 2012. - №1. - С.20-24.
12. Цибезов, В.В. Эффективность иммунохроматографической тест-системы для быстрого выявления вируса африканской чумы свиней / В.В.Цибезов, Ю.О.Терехова, О.А.Верховский, А.С.Першин, Н.Н.Власова, А.С.Иголкин, О.Ю.Черных, Т.И.Алипер, Е.А.Непоклонов // Ветеринария, 2015, №5. - С.58-64.
13. Шкаева, М.А. ИФА для выявления антител к цирковирусу свиней второго типа / М.А.Шкаева, В.В.Цибезов, О.А.Верховский, Б.Г.Орлянкин, Т.И.Алипер // Ветеринария, 2005, №9. - С.20-23.

УДК 619:616.5-085.322

Действие Эхинацеи пурпурной на иммунную систему

Ветрова Л.Ю. – кандидат биологических наук, доцент
Кузнецова М.И. – кандидат биологических наук, доцент,
 ФГБОУ ВО "Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина", кафедра физиологии, фармакологии и токсикологии им. А.Н. Голикова и И.Е. Мозгова, 109472 Москва, ул. Академика Скрябина д.23, тел. 8-495-377-97-50 E-mail: kmi.58@mail.ru

Аннотация. Лекарственные растения находят широкое применение в ветеринарной медицине для профилактики и лечения различных заболеваний. Род Эхинацея включает в себя несколько видов растений, которые можно использовать для профилактики и комплексного лечения различных заболеваний, связанных со снижением иммунитета.

Ключевые слова: фитотерапия, *Echinacea purpurea*, иммунокорректирующие средства.

Effect of *Echinacea purpurea* on the immune system

Vetrova L.Yu., Kuznetsova M.I.

Medicinal plants are widely used in veterinary medicine for the prevention and treatment of various diseases. The genus *Echinacea* includes several plant species that can be used for the prevention and comprehensive treatment of various diseases associated with a decrease in immunity.

Keywords: Phytotherapy, *Echinacea purpurea*, immunocorrective agents.

Фитотерапия – один из древнейших, но не утративших актуальность способов лечения. В России лекарственные средства растительного происхождения составляют около половины от общего арсенала медикаментов. Они находят широкое применение в ветеринарной медицине для профилактики и лечения, различных заболеваний сельскохозяйственных животных и используются как в виде лекарственного растительного сырья, так и в форме лекарственных препаратов.

Эхинацея пурпурная (лат. *Echinacea purpurea*) – многолетнее растение из семейства Астровые, или Сложноцветные (*Asteraceae*). Родина растения – Северная Америка. В России его стали выращивать в начале XIX в. В промышленных масштабах заготавливается в Самарской области и на Северном Кавказе. Используется в виде стандартизированных препаратов, полученных из разных частей растения, включая сок, экстракты, настойки, отвары и др.

В настоящее время известны не только Эхинацея пурпурная, но и другие виды – Эхинацея бледная (*E. pallida*), парадоксальная (*E. paradoxa*), стимулирующая (*E. simulata*), теннесийская (*E. tennesseensis*) и темно-красная (*E. atropurpurea*). Различные виды эхинацеи отличаются друг от друга разнообразным составом биологически активных веществ.

Химический состав растения довольно разнообразен. Наиболее изучены в экспериментальных и клинических исследованиях гидрофильные соединения: полисахариды, гемицеллюлоза, целлюлоза, инулин, пектин, крахмал, арабиногалактан, гетероксилан, олигосахариды (сахароза), простые сахара, фенольные соединения, производные кофейной кислоты, алкалоиды, аскорбиновая кислота.

Водорастворимый полисахаридный комплекс Эхинацеи оказывает выборочное регулирующее влияние на иммунную систему: активизирует фагоциты, макрофаги, стимулирует синтез интерферона, увеличивает количество и функциональную активность Т-супрессоров. Фенольные соединения (флавоноиды) эхинацеи представлены апиге-

нином, изорамнетином, кверцетином, кемпферол-3-рутозидом, лютеолином, рутином и другими, содержание которых в перерасчете на кверцетин составляет 0,48%. Флавоноиды проявляют антиоксидантное, желчегонное, гипохолестеринемическое, мембраностабилизирующее, противоаллергическое, противодиабетическое, противовоспалительное, противоопухолевое, радиозащитное, спазмолитическое действие, а также повышают устойчивость организма к внешним отрицательным факторам. Флавоноиды могут также усиливать иммуномодулирующее действие полисахаридов. Дубильные вещества пирокатехиновой группы (5–11%) обладают противомикробным и противовоспалительным эффектом. Производные кофейной и цикориевой кислот обладают антиоксидантным, иммуностимулирующим, мембраностабилизирующим, антибактериальным, и противовирусным действием. Среди гидрофильных соединений следует выделить бетаин-глицин. Это вещество нормализует функцию печени, регулирует обмен липидов и белков. Эхинацея пурпурная содержит сапонины, проявляющие противовирусную и иммуностимулирующую активность. В корнях и надземной части растения содержатся витамины (аскорбиновая кислота, каротин) и гликопротеины, влияющие на функцию иммунной системы.

Липофильные соединения: эфирное масло, алкиламида ненасыщенных жирных кислот, фитостеролы, смолы и др. Количество эфирного масла в разных видах и разных частях растения колеблется от 0,01 до 0,6%. В эфирном масле Эхинацеи пурпурной выявлены ванилин, борнеол, борнилацетат, гермакрен Д, кариофилен, а-пинен, b-пинен, мирцен, лимонен, карвоментен и другие соединения с выраженным влиянием на иммунную систему. Алкиламида ненасыщенных жирных кислот обладают противовоспалительным действием, а также стимулируют фагоцитоз. Среди других липофильных веществ, Эхинацея пурпурная содержит фитостеролы (ситостерин, стигмастерин и др.), ненасыщенные жирные кислоты (миристиновая, линолевая, льняная, олеиновая, пальмитиновая, церотиновая), цианиды, смолы, а также кумарины.

Биометаллы: макроэлементы (алюминий, железо, калий, кальций, магний) и микроэлементы (барий, бериллий, ванадий, кобальт, марганец, молибден, никель, селен, серебро, цинк). Известно, что биометаллы оказывают иммуномодулирующее влияние на организм. Особенно это характерно для селена, цинка, меди, марганца, железа, кобальта.

Такой состав физиологически активных веществ Эхинацеи пурпурной обуславливает фармакологические свойства препаратов, полученных из растения. В лечебной практике Эхинацея используется как иммуномодулятор естественного происхождения, стимулирует преимущественно клеточный иммунитет, увеличивает количество Т-лимфоцитов, повышает фагоцитарную активность лейкоцитов и хемотаксис гранулоцитов, содействует высвобождению цитокининов, то есть активизирует неспецифическую резистентность организма.

Кроме регулирующего влияния на функцию иммунной системы Эхинацея проявляет противомикробное, противовирусное, фунгицидное, противовоспалительное, антиоксидантное. Регенерирующее действие связано со способностью эхинацеина препятствовать разрушению в организме гиалуроновой кислоты за счет подавления активности фермента гиалуронидазы, что и обуславливает специфическое для растения противовоспалительное и анальгезирующее действие. Противовоспалительный и антимикробный эффект усиливается содержащимися оксикоричными кислотами.

В России для получения лекарственных форм, используют растения, выращенные на станции Всероссийского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР). В ВИЛАРе из Эхинацеи пурпурной получен препарат "Эстифан". Он применяется в качестве иммуностимулирующего средства для лечения и профилактики заболеваний, связанных с иммунодефицитом. Препарат Эстифан, представляет собой сухой экстракт, получаемый из травы Эхи-

нацеи пурпурной, собранной в фазу начала цветения. Эстифан содержит около 7–12% оксикоричных кислот, основным компонентом которых является цикориевая кислота. Кроме того, в препарате обнаружено наличие следов изобутиламидов, а также полисахариды (представлены сложными разветвленными системами, в составе которых имеются рамноза, арабиноза, ксилоза, манноза, глюкоза и галактуроновая кислота). Эстифан – иммуностимулирующее средство, повышающее активность клеточного и гуморального звена иммунной системы, а также фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов. Потенцирует продукцию интерлейкина-1 макрофагами, индуцирует трансформацию В-лимфоцитов в плазматические клетки, усиливает образование антител, кооперацию В и Т-лимфоцитов, Т-хелперную активность. Интерлейкин-1 один из факторов запускающих процесс дифференцировки стволовых кроветворных клеток. Первый этап дифференцировки дает начало либо клетке предшественнице всех линий кроветворения, воспроизводимых костным мозгом – колониобразующей клетке гранулоцитарно-моноцитарной, мегакариоцитарно – эритроцитарной, либо клетке-предшественнице лимфоидной ткани - лимфоидной колониобразующей клетке. Доказано, что стволовая кроветворная клетка способна дифференцироваться в 12 линий кроветворения. Интерлейкин-1- влияет на колониобразующую клетку селезенки у мышей стимулирует продукцию колониестимулирующего гранулоцитарного и гранулоцитарно-моноцитарного факторов фибробластами и эндотелиальными клетками "острофазных" белков печени, индуцирует дыхательный взрыв в нейтрофилах и макрофагах. Активизирует естественные Т-киллеры. Эстифан назначают в качестве иммунокорректирующего средства для лечения и профилактики заболеваний, связанных с иммунодефицитными состояниями. Его назначают при хронических рецидивирующих заболеваниях воспалительного характера (хронические бронхиты, пневмонии и др.) в условиях неэффектив-

ности антибактериальной и противовоспалительной терапии. Еще один препарат, разработанный в ВИЛАР – Сок "Эхинацея – ВИЛАР" – лекарственный препарат, который получают из свежей травы Эхинацеи пурпурной, путем настаивания ее на 95% этиловом спирте. В препарате содержатся фенолпропаноиды (цикориевая кислота и эхинокозид), полисахариды и алкиламиды (полиеновые и полиацетиленовые соединения с изобутиламидным остатком). "Эхинацея – ВИЛАР" стимулирует образование антител, существенно повышает пролиферативную активность лимфоцитов, стимулирует функциональную активность фагоцитарных клеток, а также оказывает противовоспалительное и капилляропротекторное действие. Препарат применяют в качестве иммуностимулирующего и противовоспалительного средства в комплексной терапии острых и хронических инфекционных воспалительных заболеваний, в том числе дыхательных и мочевыводящих путей.

Кроме этого, в настоящее время, для корректировки иммунодефицитных состояний применяются стандартизированные препараты иммунал, иммунекс, иммунорм, полученные из разных частей растения, включая сок, экстракты, настойки, отвары и др.

Список литературы:

1. Захаров Ю.М. Физиология системы крови. Кроветворение и его регуляция. Современный курс классической физиологии. Под редакцией акад. Ю.В. Наточина, акад. В.А.Ткачука - М.: ГЭОТАР - Медиа. - 2007г. - с.169.
2. Корсун В.Ф. Энциклопедия фитотерапии: Травы жизни профессора Корсуна./В.Ф. Корсун, Е.В. Корсун.- М.:ЗАО Центрполиграф. -2007. -с.5.
3. Липницкий С.С. Зеленая аптека в ветеринарии. / С.С. Липницкий, А. Пилуй, Л. Лаппо. - Минск: Урожай. -1995. -с.35.
4. Фитопрепараты ВИЛАР: научно-справочное издание под общ.редакцией проф., докт.фарм.н. Т.А.Сокольского. - М.: Борус-Пресс,2009, 165-170.

УДК 616-022.1-033: 619: 636.8

Эпизоотологические данные по возбудителям гемотропных инфекций у кошек по г. Москве на 2015–2016 гг

Вирцер М.А.,
Огнева А.А.

Ветеринарная лаборатория "Зайцев+", 105318, Россия, Москва, Щербаконская 41а, тел: +7(495) 999 03 32vetlabplus@gmail.com

Аннотация. Среди гемотропных инфекций кошек особое значение имеют возбудители вирусного иммунодефицита кошек (ВИК), вирусной лейкемии кошек (ВЛК) и гемабартонеллеза (ГмБ). Часто эти инфекции протекают бессимптомно, но при ослаблении иммунитета вызывают достаточно тяжелые формы заболевания. В нашей работе мы провели оценку эпизоотологической ситуации по этим заболеваниям по г. Москве на 2015–2016 гг. Исследования проводились методом ПЦР в режиме реального времени. Мы определили, что среди общего количества кошек, исследуемых на наличие гемотропных инфекций, было обнаружено: ВИК у 4,2–4,7% кошек, ВЛК у 9,0–9,7% кошек, ГмБ у 33,3–34,8% кошек. Вероятность сочетанности ВЛК и ГмБ значительна, поэтому при исследовании животных на гемотропные ретровирусы (ВИК и ВЛК) существует необходимость диагностирования и гемабартонеллеза.

Ключевые слова: вирусный иммунодефицит, лейкемия, гемабартонеллез, кошки.

Epizootic data on pathogens of hemotropic infections in cats in Moscow for 2015–2016

Wirzer M.A., Ogneva A.A.

Feline immunodeficiency virus (FIV), feline leukemia virus (FeLV) and hemobartonellosis (HmB) are the particular importance pathogens of hemotropic infections of cats. Often these infections occur asymptotically, but with a weakening of immunity, they cause quite severe forms of the disease.

In our work, we assessed the epizootic situation of these diseases in Moscow for 2015–2016. The research was used with technology PCR in real-time. Among the total number of cats, which were tested for hemotropic infections, it was found: FIV in 4.2–4.7% of cats, FeLV in 9.0–9.7% of cats, HmB in 33.3–34.8% of cats. The probability of combination of FeLV and HmB is significant, therefore, when studying animals for hemotropic retroviruses (FLV and FeLV), there is a need for diagnosis and hemobartonellosis.

Key words: Viral immunodeficiency, leukemia, gemabartonelalez, cats.

Введение

В настоящее время наиболее актуальными гемотропными хроническими инфекциями кошек являются вирусный иммунодефицит кошек (ВИК), вирусная лейкемия кошек (ВЛК) и гемабартонеллез (ГмБ) (1, 2, 6).

ВИК и ВЛК относятся к ретровирусам. Чаще всего заражение происходит через укушенные раны. Животные остаются инфицированными пожизненно. Болеют только кошки. Методами диагностики ВИК и ВЛК являются ELISA, ИХА,

ИФА, где для ВИК определяют наличие антител, а для ВЛК антигенов. Кроме того, в настоящее время широкое применение получил метод ПЦР (3, 6).

ГмБ вызывают гемотропные паразиты, относящиеся к роду *Mycoplasma*.

Это оппортунистическая инфекция, развивающаяся как вторичное заболевание при иммуносупрессивных состояниях, нередко сопровождая ВЛК. Основным источником заражения считаются кровососущие насекомые (блохи, клещи и т.д.). Болеют и кошки, и собаки. Для диагностики гемабартонеллеза используется микроскопия высушенных мазков крови окрашенных по Романовскому, но наиболее чувствительным методом является ПЦР (1, 3, 6).

ВИК, ВЛК и ГмБ объединяет ряд общих признаков: гемотропность, иногда довольно длительный инкубационный период, часто бессимптомное протекание или невыраженность клинических признаков. Кроме того, эти инфекции нередко могут быть сочетанными друг с другом, а в тяжелых случаях возможно наличие всех трех заболеваний (3, 4, 5).

Цель и задачи

Нашей задачей было оценить эпизоотологическую ситуацию по ВИК, ВЛК и ГмБ (Табл. №1) и вероятность сочетанности этих инфекций (Табл. №2) по городу Москве на 2015–2016 годы с целью оптимизации тактики диагностики гемотропных инфекций у кошек.

Материалы и методы

Исследования проводились методом ПЦР в режиме

Таблица 1. Результаты тестирования клинических образцов на ВИК, ВЛК и ГмБ методом ПЦР

	Статистические данные ВИК, ВЛК, ГмБ за 2015 и 2016 год					
	ВИК		ВЛК		ГмБ	
	всего	«+»	всего	«+»	всего	«+»
2015	428	18	496	45	207	72
2016	505	24	578	56	249	83

Таблица 2. Результаты тестирования клинических образцов на сочетанность инфекций ВИК, ВЛК и ГмБ

	Сочетанность (ВИК, ВЛК, ГмБ)							
	ВИК+ВЛК		ВИК+ГмБ		ВЛК+ГмБ		ВИК+ВЛК+ГмБ	
	всего	+	всего	+	всего	+	всего	+
2015	50	3	20	1	20	4	20	1
2016	50	5	20	3	20	6	20	1

УДК 612.085.2: 616-078: 619

Диагностика лямблиоза методом ПЦР в режиме реального времени

Вирцер М.А.,

Зайцев В.С., кандидат биологических наук,

Гордеева Т.Г

Ветеринарная лаборатория "Зайцев+", 105318,

Россия, Москва, Щербаковская 41а,

тел: +7(495) 999 03 32, vetlabplus@gmail.com

Аннотация. Лямблиоз является протозоозным заболеванием. Основным методом диагностики инфекции в ветеринарии является микроскопия и ИХ тест.

Существующие методы диагностики не всегда позволяют выявить возбудителя даже если он присутствует в организме. Нашей задачей была разработка набора реагентов для ПЦР-диагностики лямблиоза с использованием технологии в режиме реального времени.

Ключевые слова: ПЦР-диагностика, лямблиоз.

Diagnosis of giardiasis using real-time PCR

Wirzer M.A., Zaitsev V.S., Gordeeva T.G.

Giardiasis is a protozoology disease. The main method of diagnosing infection in veterinary medicine is microscopy and ELISA. Existing methods of diagnosis do not always allow to identify the pathogen even if it is present in the body. Our task

was to develop a reagent kit for diagnostics of giardiasis with technology PCR in real-time.

Результаты

Результаты проведенной работы приведены в таблицах 1 и 2.

Выводы

По результатам проведенной работы мы сделали вывод, что среди общего количества кошек, исследуемых на наличие гемотропных инфекций, было обнаружено: ВИК у 4,2–4,7% кошек, ВЛК у 9,0–9,7% кошек, ГмБ у 33,3–34,8% кошек. Вероятность сочетанности ВЛК и ГмБ значительна, поэтому при исследовании животных на гемотропные ретровирусы (ВИК и ВЛК) существует необходимость диагностирования и гемабартонеллеза.

Список литературы

1. N. James MacLachlan. Fenner's veterinary virology, Elsevier, 2011: 243-272.
2. Craig E. Greene. Infectious diseases of the dog and cat, Elsevier, 2011: 310-319.
3. Gentilini F1, Novacco M, and etc. Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infections in northern Italy. J Feline Med Surg. 2009: 277-285.
4. Westman ME1, Malik R2, and etc. Comparison of three feline leukaemia virus (FeLV) point-of-care antigen test kits using blood and saliva. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2017: 88-96.
5. Walker Vergara R1, Morera Galleguillos F2. Prevalence, risk factor analysis, and hematological findings of hemoplasma infection in domestic cats from Valdivia, Southern Chile. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2016: 1063-1069.
6. Ваден Ш., Нолл Д., Смит Ф., Тиллей Л. Полное руководство по лабораторным и инструментальным исследованиям у собак и кошек, Аквариум, 2013: 219-225.

was to develop a reagent kit for diagnostics of giardiasis with technology PCR in real-time.

Key words: PCR diagnosis, giardiasis.

Введение

Лямблия (Giardia) является жгутиковым паразитарным простейшим, вызывающим хронические кишечные инфекции у собак, кошек и многих других млекопитающих. Течение инфекции может быть субклиническим и бессимптомным, но периодически может наблюдаться снижение массы тела и диарея (1, 2, 3).

Основными диагностическими методами в ветеринарии является обнаружение цист лямблий в кале микроскопически или выявление их антигенов при помощи ИХ тестов (3). В связи с жизненным циклом этих простейших диагностика заболевания затруднительна, поскольку паразит с калом выделяется спорадически, и концентрация его низкая. При этом условия существующие методы диагностики не всегда позволяют выявить возбудителя даже если он присутствует в организме (1,2). А между тем лямблиоз является зооозным заболеванием, поэтому тем важным значением является своевременное обнаружение лямблий для предотвращения заражения человека и оказания специфической и своевременной помощи животному.

Цель

Разработать набор реагентов для ПЦР-диагностики лямблиоза с использованием технологии в режиме реального времени.

Материалы и методы

Олигонуклеотиды были подобраны на специфический участок генома лямблий. Специфичность и чувствительность разработанных реагентов сравнивали относительно тест-системы "VetExpert Giardia Ag" (Ветэксперт). Для исследования были взяты образцы кала от животных с предполагаемым диагнозом – лямблиоз. Нуклеиновые кислоты выделяли из клинических образцов помощи набора НК-преп (Интерлабсервис). Амплификация проводилась на амплификаторе iQ5 (BioRad) по следующему режиму: 95°C – 5 мин 1 цикл; 95°C – 20 сек, 60°C – 40 сек 40 циклов.

Полученные результаты в ПЦР сравнивали с результатами ИХА-тестов "VetExpert Giardia Ag" (Ветэксперт) и мик-

роскопии. Положительные результаты в ИХ-тестах полностью совпадали с результатами, полученными методом ПЦР. При этом в нескольких случаях при положительных сигналах в ПЦР, ИХ-тесты оказались отрицательными, что связано со значительно меньшей чувствительностью этого метода. При микроскопическом исследовании лямблии часто не были обнаружены, в то время как в ПЦР и в ИХ-тестах они были положительные. Результаты проведенного исследования представлены в таблице 1.

Выводы

Таким образом мы показали, что разработанный нами метод обладает большей чувствительностью относительно методов сравнения и может быть использован для диагностики лямблиоза у мелких домашних животных.

Список литературы

1. M.A. Taylor. *Veterinary Parasitology*, Wiley Blackwell, 2016: 128-130.
2. Craig E. Greene. *Infectious diseases of the dog and cat*, Elsevier, 2011: 785-792.
3. Ваден Ш., Нолл Д., Смит Ф., Тиллей Л. Полное руководство по лабораторным и инструментальным исследованиям у собак и кошек, Аквариум, 2013: 486-488.

Таблица 1. Результаты сравнительного тестирования клинических образцов на лямблии с использованием трех методов

	ПЦР	ИХ	Микроскопия
Положительные в методе из 100 образцов	48	35	12
Отрицательные относительно метода сравнения			
ПЦР		0	0
ИХ	13		0
Микроскопия	23	12	

УДК: 615.371: 615.015.33

Оценка длительности иммунного ответа и защитного действия рекомбинантной гриппозной вакцины Унифлю на хорьках

Воронин С.Е.¹,

Крышень К.Л.¹ - кандидат биологических наук,

Макарова М.Н. - доктор медицинских наук,

Степанова Л.А.² - кандидат биологических наук,

Шуклина М.А.²,

Коротков А.В.²

¹-ООО "Институт доклинических исследований", 188663, Россия, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п., Кузьмоловский корп. 245. Тел/факс: +7(812)603-2433 Email: voronin.se@doclinika.ru, info@doclinika.ru

²- Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт гриппа" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НИИ гриппа" Минздрава России, 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 15/17, Тел: 8 (812) 499-15-00

Аннотация. Разработка новых противогриппозных вакцин является актуальной задачей отечественного здравоохранения. Целью исследования явилось изучение длительности циркуляции анти-M2e антител и протективного действия универсальной рекомбинантной гриппозной вакцины Унифлю (разработана ФГБУ НИИ гриппа) на хорьках.

Были сформированы 2 группы хорьков, по 5 самок в каждой группе. Хорьков иммунизировали вакциной Унифлю и плацебо в эквивалентной терапевтической дозе для человека 0,5 мл/животное на 1-й и 22-й дни исследования. Для оценки длительности циркуляции специфических антител на 43-й, 73-й и 178-й дни в сыворотке крови хорьков определяли уровень анти-M2e IgG методом иммуноферментного анализа. Для изучения защитного действия вакцины Унифлю на 43-й день исследования животных заражали вирусом гриппа А/Бризбен/53/07 (H1N1) и на протяжении 14 дней оценивали клинические симптомы заболевания с измерением ректальной температуры тела. Полученные данные свидетельствуют, что вакцина Унифлю стимулирует длительную циркуляцию анти-M2e IgG у хорьков. На модели гриппозной инфекции у хорьков показано, что новая рекомбинантная вакцина Унифлю проявляет выраженное защитное действие.

Ключевые слова: гриппозная вакцина Унифлю, анти-M2e IgG, хорьки.

Duration of immune response and protective effects of recombinant influenza vaccine study in ferrets

Voronin S.E., Kryshen K.L., Makarova M.N., Stepanova L.A., Shuklina M.A., Korotkov A.V.

Development of new influenza vaccine is actual problem for national healthcare. The aim of the study was to evaluate a duration of immune response and protective effects of recombinant influenza vaccine Uniflu (developed by Research Institute of Influenza) in ferrets. The experiment included 2 groups of ferrets, 5 females per group. Ferrets were immunized by Uniflu in human equivalent dose 0.5 ml/animal on day 1 and 22 of study. Level of anti-M2e IgG was analyzed by ELISA on day 43, 73 and 178 for duration immune response analysis. For protective effects evaluation ferrets were infected with influenza virus А/Бризбен/53/07 (H1N1) on day 43. Clinical symptoms and rectal temperature were measured during 14 days after infection start. It was shown that Uniflu vaccine stimulate long time anti-M2e IgG circulation in ferrets. New recombinant vaccine Uniflu demonstrated potent protective effects in ferrets model of influenza infection.

Keywords: influenza vaccine, Uniflu, anti-M2e IgG, ferrets.

Введение

Современные инактивированные гриппозные вакцины обеспечивают профилактический эффект, в основном, за счет индукции иммунного ответа организма на поверхностные белки вируса гриппа: гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (НА). Постоянный мутационный дрейф вирусов гриппа требует ежегодного обновления штаммового состава вакцин. Поэтому, на сегодняшний день высока актуальность разработки универсальных гриппозных вакцин широкого спектра действия.

Гриппозная рекомбинантная лиофилизированная вакцина широкого спектра действия против вирусов гриппа А человека - Унифлю (разработана ФГБУ НИИ Гриппа, Россия) является оригинальным отечественным препаратом, который создан с использованием генно-инженерных технологий. Вакцина представляет собой рекомбинантный слитый белок, содержащий консенсусную последовательность эктодомена М2е вирусов гриппа А человека, встроенную в иммунодоминантную петлю корового антигена вируса гепатита В. Для изучения эффективности противогриппозных вакцин широко используются хорьки, которые являются наиболее релевантной моделью для изучения гриппа у человека, так как обладают высокой восприимчивостью к

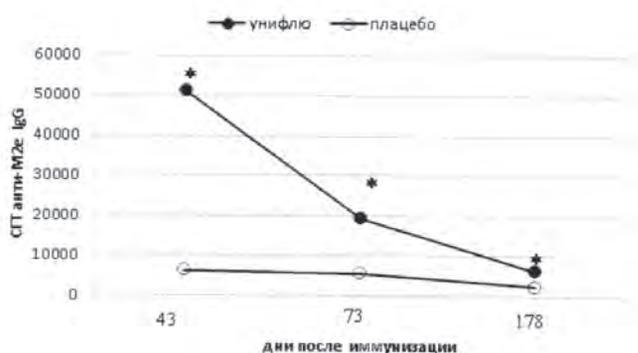


Рисунок 1 - Длительность циркуляции сывороточных анти-M2e IgG у хорьков, средний геометрический титр (СГТ),

* - достоверное отличие от контрольной группы при $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни

вирулентным штаммам вирусов гриппа. В естественных условиях вирусы гриппа типов А и В вызывают у хорьков инфекцию, которая протекает с клиническими симптомами, аналогичными гриппозной инфекции у человека (насморк, вялость, лихорадка и т.д.) [1,2].

Целью настоящего исследования явилось изучение длительности циркуляции анти-M2e антител и протективного действия рекомбинантной гриппозной вакцины Унифлю на хорьках.

Материалы и методы

В исследовании были использованы 10 самок хорьков в возрасте 4-5 месяцев, которые были сформированы в две группы, по 5 хорьков в каждой группе. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU [2,3] в индивидуальных клетках, в которых находился гамак для сна и хлопок - как материал для гнездования и обогащения среды. Для кормления использовали полнорационный гранулированный комбикорм "Bosh ferret baby" (Bosh Tiernahrung GmbH & Co., Германия). Воду хорькам давали ad libitum.

Вакцину Унифлю вводили внутримышечно двукратно с интервалом в 3 недели в эквивалентной терапевтической дозе для человека 0,5 мл/животное. Контрольной группе вводили плацебо в аналогичном объеме.

Для определения уровня анти-M2e IgG у хорьков забирала кровь из локтевой вены через 21, 51 и 157 дней после второй иммунизации. Оценку количества сывороточных антител проводили методом иммуноферментного анализа.

На 43-й день исследования проводили интраназальное заражение животных вирусом гриппа А/Бризбен/53/07 (H1N1) в дозе 6,5-7,0 IgТЦД50. Клинический осмотр животных проводили ежедневно в течение 14-ти суток с момента заражения. Клинический осмотр включал в себя анализ температуры и массы тела, оценку активности животных и респираторных симптомов.

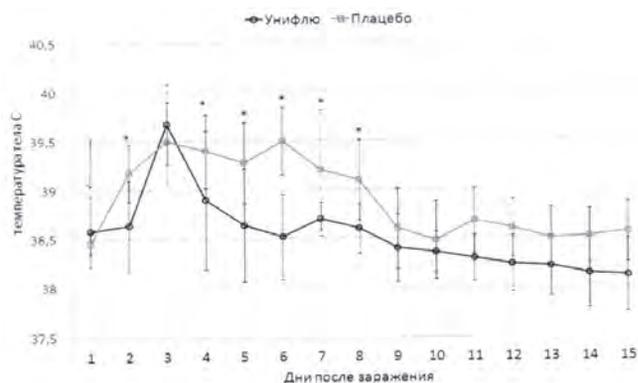


Рисунок 2 - График изменения ректальной температуры тела. Стрелкой указан день заражения.

Примечание - * - достоверные различия между группами на 2-й, 4-й, 5-й, 6-й, 7-й и 8-й день наблюдения ($p < 0.05$, критерий Манна-Уитни, $p < 0.05$)

Результаты и обсуждение

Для определения длительности циркуляции сывороточных специфических антител после иммунизации вакциной Унифлю у хорьков забирала кровь на 43, 73 и 178 дни эксперимента. Результаты оценки длительности циркуляции сывороточных антител представлены на рисунке 1. Эти данные показывают, что у хорьков анти-M2e IgG еще циркулируют в крови в определяемых количествах через 5 мес. после иммунизации. Хорьков, иммунизированных вакциной Унифлю и получавших плацебо заражали эпидемическим вирусом гриппа А/Бризбен/55/07 (H1N1) через 2 недели после второй иммунизации. С момента заражения и в течение последующих 14 дней проводили клинический осмотр животных с измерением ректальной температуры тела. Клинические симптомы оценивали в баллах: активный - 0 баллов, вялый - 1 балл, чихание - 1 балл, выделения из носа - 1 балл. Подсчитывали сумму баллов для каждого животного и вычисляли среднее. Результаты ежедневной ректальной термометрии в период наблюдения представлены на рисунке 2.

Критерий Манна-Уитни выявил достоверные различия между группами ($p < 0.05$) по температуре тела хорьков на 2-й, 4-й, 5-й, 6-й, 7-й и 8-й дни наблюдения (рис.2). У иммунизированных вакциной Унифлю хорьков нормализация температуры тела после заражения эпидемическим вирусом гриппа происходила быстрее на 5 дней, что свидетельствует об эффективности применения вакцины.

По результатам, представленными на рисунке 3, видно, что максимум развития инфекции у хорьков контрольной группы наблюдался со 2-е по 8-е сутки. Полное выздоровление всех животных контрольной группы по клиническим симптомам можно отметить к 10-м суткам. В целом, показатели оценки клинической картины заболевания гриппом коррелируют с оценкой температуры тела. У хорьков, иммунизированных вакциной Унифлю, на протяжении первых 3-х суток наблюдали аналогичное количество животных с выраженной симптоматикой, как и в группе, получавшей плацебо. Важно отметить, что выздоровление хорьков опытной группы наблюдали уже на 4-й день после заражения.

Выводы

На основании полученных данных можно сделать вывод, что вакцина Унифлю стимулирует формирование анти-M2e IgG у хорьков, которые циркулируют в крови в определяемых количествах через 5 мес. после иммунизации. Двукратная иммунизация животных вакциной Унифлю в одной человеческой дозе способствует уменьшению длительности проявления клинических симптомов заболевания.

Список литературы:

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая - М.: Гриф и К, 2012 - 536 С.
2. Воронин С.Е., Макарова М.Н., Крышень К.Л., Алякринская А.А., Рыбакова А.В. Хорьки, как лабораторные животные // Международный вестник ветеринарии. 2016. № 2. С. 103-116.
3. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

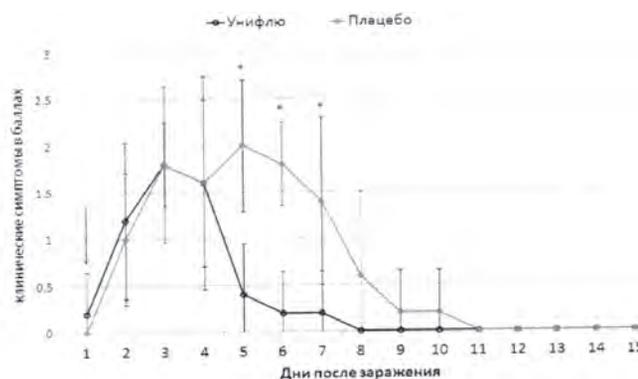


Рисунок 3 - Клинические симптомы (в баллах). Стрелкой указан день заражения.

Примечание * - достоверные различия между группами на 5-7-й дни наблюдения ($p < 0.05$, критерий Манна-Уитни).

Т. evansi антигены и сыворотки

Георгиу Христофис, д. биол. наук, заведующий лабораторией протозоологии, Chgeorgiou@rambler.ru ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.П. Коваленко", г. Москва

Аннотация. Приведены результаты получения Т. evansi соматических и экзоантигенов с активностью 95-97% от зараженных собак, мышей и крыс, для диагностических исследований в РДСК, РНГА и ИФА. Кроме того, поставленные нами опыты показали, что кровь от паразитоносителей можно использовать для приготовления положительной сыворотки для диагностических исследований. При этом титр антител должен быть не ниже 1:20 в РДСК, 1:200 в РНГА и ИФА. Для приготовления отрицательных сывороток можно использовать только кровь от здоровых животных, отрицательно реагирующих на сурру. Согласно ветеринарным требованиям Таможенного союза (2) и Международного эпизоотического бюро (7) в списке заболеваний лошадей, подлежащих контролю, присутствуют два, вызываемые трипаносомами - случная болезнь (дурина) и сура (су-ауру). Смертность от них составляет 30-50%, вакцины не существует.

Ключевые слова: антиген, инвазия, ИФА, паразитизация, РДСК, РНГА, трипаносомоз, экзоантиген Т. evansi.

Т. evansi antigens and sera

Georgiou Ch.

Received data is show that developed tripanosomosis antigen and exoantigen is specific, highly active and does not need significant expenses because initial material for manufacturing is earlier thrown out plasma of blood of infected animals. We proposed besiny antigen activity 95-97% can be used to diagnose surra of horses the ICFT, IHAT and ELISA. Results of producing of positive and negative surra horses sera for IHAT, ICFT, ELISA have been discribed in article. Blood from tripanosomosis carries can be used for producing of positive serum when lebel of antibodies against tripanosomosis is more than 1:20 in ICFT, 1:200 in IHAT and 1:200 in ELISA. For producing negative serum blood from health horses can be used only. According to the veterinary requirements of the Cuctoms Union (2) and the Office International des Epizooties (7), the lists of diseases of horses to be monitored has the two ones caused by trypanosomes - covering disease (dourine) and Surra (triapanosomosis). Mortality from these diseases is 30 - 50%, and there is no vaccine.

Key-words: antigen, invasia, ELISA, parasitic, ICFT, IHAT, tripanosomosis экзоантиген Т. evansi.

Сокращения: ИНАН - инфекционная анемия, ИФА - иммуноферментный анализ, МЭБ - Международное эпизоотическое бюро, РДСК - реакция длительного связывания комплемента, РНГА - реакция непрямой гемагглютинации, РСК - реакция связывания комплемента

Введение

Сурра - трансмиссивная болезнь верблюдов, лошадей, ослов, собак, протекающая остро, подостро или хронически, характеризующаяся интермитирующей лихорадкой с отеками, увеличением поверхностных лимфатических узлов, анемией, исхуданием и наличием возбудителя в крови. Впервые трипаносомы, патогенные для сельскохозяйственных животных, были обнаружены Эвансом (Evans) в 1880 г. в Индии в крови животных, больных "Surra". В последующем этиологическая роль трипаносом различных видов в различных болезнях человека и животных была установлена во многих странах мира. В России трипаносом в крови больного суррой верблюда впервые обнаружил Д. Е. Фейншмидт в бывшей Астраханской губернии в 1912 г. В последующие три года В. Л. Якимов с сотрудниками установил сурру верблюдов и ослов в Туркестане. В 1915 г. А. П. Уранов опубликовал работы о восприимчивости домашних и лабораторных животных к сурре. С 1918 г. эту болезнь стали изучать в нашей стране подробно. По данным МЭБ, surra широко распространена в Азии, Северной Африке, Центральной и Южной Америке. К ней восприимчивы большинство видов домашних и многие виды диких животных. У лошадей и верблюдов вызываемая этой трипаносомой болезнь сурра (су-ауру), как правило, заканчивается летально [16].

По международным правилам, ввоз лошадей из небла-

гополучных по случной болезни стран разрешен только при условии исключения у них данного трипаносомоза. С этой целью, в основном, применяют серологические тесты (чаще РСК и дополнительно ИФА) микроскопию и биопробу на лабораторных животных. При диагностических исследованиях особую сложность представляет видовая дифференциация Т. equiperdum и Т. evansi, поскольку они неразличимы морфологически, имеют перекрестно-реагирующие антигены и многочисленные сходные участки генома [1, 4, 9, 11].

Цель исследования

Выявить возможность получения Т. evansi антигенов - как соматических, так и экзоантигенов из крови зараженных собак, мышей и крыс, положительных - от животных-паразитоносителей и отрицательных - от животных, отрицательно реагирующих на сурру.

Материалы и методы

Материалом для получения трипаносомного антигена послужила кровь больных животных (собак, мышей и крыс), инфицированных суррой с пораженностью 250 и более трипаносом в 1 поле зрения микроскопа. На высоте паразитемии животных обескровливали. Кровь собирали в стерильные колбы с антикоагулянтом из расчета 50 мл 20%-го раствора цитрата натрия на 1 л крови. Дальнейшую обработку крови проводили в день ее взятия или не позднее следующих суток по методике Х. Георгиу [13]. Полученный антиген консервировали и титровали в РДСК и ИФА с заведомо положительными и отрицательными сыворотками. Экзогенные антигены из плазмы крови и надосадочной жидкости (супернатанта), полученной после первого центрифугирования лизированных эритроцитов, выделяли посредством осаждения в 20%-м растворе полиэтиленгликоля по стандартной методике [18] и титровали в РДСК и ИФА (табл. 1). РДСК ставили согласно "Временному наставлению по применению набора компонентов для диагностики анаплазмоза рогатого скота в РДСК" [14]; РНГА - согласно "Методическим рекомендациям по диагностике трипаносомозов лошадей (Т. equiperdum и Т. evansi)" [15]; ИФА - согласно "Методическим рекомендациям для серологической диагностики случной болезни лошадей с применением экзоантигенов Т. equiperdum в иммуноферментном анализе" [16]. Полученный антиген проверяли на чистоту микроскопией мазков, окрашенных по Романовскому-Гимзе, на активность, отсутствие антикомплементарных свойств.

Отрицательную сыворотку получили от лошадей (n=30), отрицательно реагирующих на Т. evansi антиген [2].

Положительную сыворотку получили от лошадей (n=30), положительно реагировавших в РДСК на Т. evansi антиген.

Для проверки антигена на активность его разводили физиологическим раствором в соотношении 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 и 1:128. Остальные компоненты, используемые в РДСК при определении активности антигена (сыворотки - позитивная, нормальная, комплемент, гемолитическая система), брали в рабочих дозах. Реакцию ставили по схеме, приведенной в таблице 1.

Результаты реакции оценивали по степени гемолиза и выражали в крестах: "++++" - гемолиз отсутствует - реакция положительная; "+++ - 25 % гемолиза - реакция положительная; "++ - 50 % гемолиза - реакция положительная; "+" - 75% гемолиза - реакция сомнительная; "-" - 100 % гемолиза - реакция отрицательная.

По этой схеме учитывали реакцию и с другими разведениями сыворотки. Титром антигена считали то наибольшее разведение, при котором проходит 50%-я задержка гемолиза эритроцитов с наибольшим разведением 1:20... 1:40 позитивной контрольной сыворотки.

Антикомплементарные свойства антигена устанавливали в РДСК при определении активности и специфичности антигена путем добавления в пробирку двойной дозы антигена в рабочем разведении в присутствии комплемента, причем в пробирках не должно быть задержки гемолиза эритроцитов барана. После чего консервировали и определяли рабочий титр в РДСК в объеме 0,5 мл с положительными и отрицательными сыворотками. На специфичность антиген проверяли с сыворотками животных, перенесших паразитарные или инфекционные болезни непротозойной природы.

Сублимационное высушивание приготовленных серий

антигена проводили на базе ВИЭВ в лаборатории ихтиопатологии. Лиофилизованные серии антигена хранили в бытовом холодильнике при (при 4 °С).

Результаты и обсуждение

Результаты титрования соматического и экзогенного (растворимого) *T.evansi* антигена приведены в таблице 2.

Титры супернатанта лизированных эритроцитов уступали титрам экзогенного антигена, полученного из плазмы, но не соматического антигена. По-видимому, определенное количество растворимого трипаносомного антигена фиксируется на мембране эритроцитов и лейкоцитов, после лизиса которых переходит в супернатант. Таким образом опыты показали, что кроме соматических антигенов можно выделить и использовать в диагностике и экзанти-

гены трипаносом, которые по титрам не уступают первым.

Результаты исследования полученного *T.evansi* антигена на специфичность и чувствительность в РДСК и РДСК с сыворотками крови от лошадей, зараженных случайной болезнью, суррой, нутталлиозом, сапом, ИНАН, ринопневмонией, вирусным артериитом, а также от здоровых лошадей приведены в таблице 3. Из данных, приведенных в таблице 3 видно, что эти сыворотки ни в одном случае, кроме сывороток, полученных от зараженных суррой животных, не реагировали с трипаносомным антигеном. Кроме того нами установлено, что предложенный нами антиген с активностью 95...97 % можно использовать для диагностики трипаносомоза лошадей в РДСК, РНГА и ИФА с аналогичным результатом. Как видно из приведенных результатов, предложенный способ позволяет получить чувствительный и специфичный трипаносомный антиген.

Для постановки серологических реакций были необходимы положительные и отрицательные сыворотки.

Для приготовления позитивной сыворотки крови брали кровь от 30 лошадей-паразитозителителей из разных районов Российской Федерации. Отрицательную брали кровь от 30 лошадей отрицательно реагирующих на сурру (тапл. 4). Как видно в табл. 4 позитивные серии сывороток были активными и не антикомплементарными. Негативные сыворотки были отрицательными и не антикомплементарными в РДСК, РНГА и ИФА. Поставленные нами опыты по получению позитивной сыворотки от лошадей паразитозителителей показали, что кровь от лошадей-паразитозителителей для приготовления позитивной сыворотки можно брать, когда антитела в РДСК находятся в титрах 1:20 и выше и 1:200 до 1:800 в РНГА и ИФА. Негативной - когда сыворотка крови лошадей отрицательно реагирует в РДСК, РНГА и ИФА. С целью установления общности антител в сыворотках крови, полученных от лошадей, положительно реагирующих с трипаносомным антигеном, была поставлена перекрестная реакция. Сыворотки лошадей исследовали с антигеном *T.evansi* в РДСК, РНГА и ИФА (тапл.5).

Таким образом поставленные нами опыты показали возможность получения положительных сывороток от лошадей, переболевших суррой и отрицательных сывороток от лошадей, отрицательно реагирующих на сурру. Кроме того получили не идентичные результаты при испытании указанных сывороток с приготовленными нами антигенами *T. equiperdum* и *T. evansi*. При исследовании положительно реагирующих на случайную болезнь сывороток с *T. evansi* антигеном давали отрицательный результат и наоборот давали положительные результаты при исследовании их на *T. equiperdum* антиген. Полученные нами положительные сыворотки от лошадей паразитозителителей смешали и приготовили пул положительной сыворотки. Одну серию негативной сыворотки крови лошадей и одну серию негативной сыворотки крови кроликов. Позитивные и негативные серии сывороток крови титровали в РДСК, РНГА и ИФА (тапл.6).

Как видно в табл. 6 положительные сыворотки крови лошадей были высокоактивными и не антикомплементарными, отрицательные сыворотки также не обладали антикомплементарными свойствами.

В дальнейшем позитивные и негативные сыворотки крови лошадей с целью длительного хранения высушивали. После лиофилизации сыворотку разводили в 2 мл

Компоненты реакции	Количество трипаносомного антигена,мл,при разных разведениях							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	Контроль
Антиген	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Одно разведение сыворотки	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Комплемент	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Холодильник при 2...4°С – 18-20 ч, затем 30 мин при комнатной температуре								
Гемолитическая система	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня при 37...38°С – 20 мин, затем холодильник при 2...4°С – 4...5 ч								

Номер серий	Соматический антиген		Экзоантиген			
			Из плазмы крови		Из супернатанта лизированных эритроцитов	
	РДСК	ИФА	РДСК	ИФА	РДСК	ИФА
1	1:32	1:64	1:256	1:512	1:32	1:128
2	1:16	1:32	1:64	1:128	1:32	1:64
3	1:8	1:16	1:64	1:128	1:8	1:16
4	1:16	1:32	1:32	1:64	1:32	1:64

Происхождение сывороток	Разведение сывороток		Без антигена
	1:5	1:10	
Положительные сыворотки от лошадей, переболевших разными болезнями (по n=1): бруцеллезом сапом ИНАН ринговиевмонией вирусным артериитом	от	от	от
Здоровые лошади (n=2)	от	от	от
Фабричная сыворотка (Омская) № 1 от лошади, зараженной <i>T. equiperdum</i>	от	от	от
Положительная сыворотка от кроликов зараженных <i>T. evansi</i>	пол	пол	пол
Положительная сыворотка от лошади из Китая, зараженной <i>T. evansi</i>	пол	пол	пол

Примечание: ОТ — отрицательная, ПОЛ — положительная

Табл. 4. Результаты титрования позитивных и негативных сывороток крови лошадей с антигеном *T.evansi*

№ серий	Титры позитивных серий сывороток в			Титры отрицательных сывороток в		
	РДСК	РНГА	ИФА	РДСК	РНГА	ИФА
1	1:20	1:200	1:400	-	-	-
2	1:40	1:800	1:800	-	-	-

Табл.5. Результаты титрования позитивных и негативных серий сывороток крови лошадей с антигеном *T. evansi*

№ серий	Титры позитивных серий сывороток в			Титры отрицательных сывороток в		
	РДСК	РНГА	ИФА	РДСК	РНГА	ИФА
1	1:20	1:200	1:400	-	-	-
2	1:40	1:800	1:80	-	-	-

Табл.6. Титры нативных сывороток (позитивных и негативных) крови лошадей в РДСК, РНГА и ИФА

№ серии	Вид животного	Рабочий титр в		
		РДСК	РНГА	ИФА
1	От лошадей паразитозителителей	1:40	1:800	1:800
2	От контрольных лошадей	-	-	-

Табл. 7. Титры высушенных сывороток (позитивных и негативных) крови лошадей и кроликов в РДСК, РНГА и ИФА.

№ серии	Вид животного	Рабочий титр в		
		РДСК	РНГА	ИФА
1	От лошадей паразитозителителей	1:40	1:800	1:800
2	От контрольных лошадей	-	-	-

физиологического раствора и вновь титровали в сравнении с нативными (табл. 7). Из таблицы 7 видно, что высушенные сыворотки крови от лошадей - паразитоносителей сохранили свою активность и не были антикомплементарными. Негативные сыворотки тоже не были антикомплементарными.

Заключение

Полученные нами результаты показывают, что кровь от зараженных суррой животных (собак, мышей и крыс) можно использовать для приготовления антигенов (соматических и экзоантигенов). Предложенный нами трипаносомный антиген с активностью 95-97% пригоден для диагностики трипаносомоза лошадей в РДСК, РНГА и ИФА.

Поставленные нами опыты показали, что кровь от паразитоносителей для приготовления позитивной сыворотки можно брать, когда титры антител в РДСК находятся в титрах 1:20 и выше. Для приготовления негативной сыворотки, когда сыворотка крови у лошадей дает отрицательные результаты в РДСК с антигеном *T.evansi*.

Библиография

1. Георгиу, Х. Получение высокоактивных и высокоспецифичных трипаносомных сывороток / Х. Георгиу // Ветеринария и кормление. - 2014. - №1. - С. 26-28.
2. Георгиу, Х. Сравнительная оценка серологических тестов (РДСК, РНГА и ИФА) для диагностики анаплазмоза рогатого скота и нутталлиоза лошадей: автореф. дис. ... докт. биол. наук; защище-

на 26.06.1997. / Х. Георгиу - М.:ВИЭВ, 1997. - 56 с.

3. Георгиу, Х. ИФА для диагностики трипаносомоза (дурина) лошадей / Х. Георгиу // Ветеринарная патология. -2003. - № 1. - С. 99-101.

4. Ломакина, Н.Ф. Трудности дифференциации трипаносом *T. evansi* и *T. equiperdum* / Н.Ф. Ломакина, Х. Георгиу, М.И. Гулюкин / Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Молекулярная диагностика". - 2014. - Том II. - С. 491-492

5. Единные ветеринарные (ветеринарно-санитарные) требования, предъявляемые к товарам, подлежащим ветеринарному контролю / Комиссия Таможенного союза, утв. 18.06.2010, № 317, в ред. От 02.03.20011.

6. Claes, F. Variable surface glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections / F. Claes, M. Radwanska, T. Urakawa et al. // Kinetoplastid Biol. Dis. - 2004. - Vol. 3. - P. 3.

7. Lai, D.H. Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei* / D.H. Lai, H. Hashimi, Z.R. Lun et al. / Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2008. -Vol. 105(6). - P. 1999-2004.

8. OIE Terrestrial Manual. 2008. Chapter 2.5.3. P. 845-851. Режим доступа: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.03_DOURINE.pdf.

9. Интернет-ресурс. Режим доступа: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.17_TRYPANO_SURRA.pdf.

10. Zablotskij, V.T. The current challenges of dourine: difficulties in differentiating *Trypanosoma equiperdum* within the subgenus *Trypanozoon* / V.T. Zablotskij, C. Georgiu, T. De Waal et al. // Rev. Sci. Tech. - 2003. - Vol. 22(3). -P. 1087-1096.

УДК 619:618.19-002

Эффективность различных схем использования ассоциированной вакцины против мастита коров

Л.К. Семина, заведующая отделом по изучению болезней животных незаразной этиологии Вологодского филиала ФГБНУ ВИЭВ, кандидат ветеринарных наук, 160009, РФ, г. Вологда, ул. Чехова, 10, тел.: (8172)72-24-90.

Е.В. Ремизова, старший научный сотрудник отдела по изучению болезней животных незаразной этиологии Вологодского филиала ФГБНУ ВИЭВ, кандидат биологических наук, e-mail: Elena_remizowa@mail.ru

З.А. Скулябина, старший научный сотрудник отдела по изучению болезней животных незаразной этиологии Вологодского филиала ФГБНУ ВИЭВ.

Т.Г. Ворошилова, научный сотрудник отдела по изучению болезней животных незаразной этиологии Вологодского филиала ФГБНУ ВИЭВ.

Н.Н. Авдеевская, младший научный сотрудник отдела по изучению болезней животных незаразной этиологии Вологодского филиала ФГБНУ ВИЭВ.

А.В. Горбатов, заведующий лабораторией микробиологии с музеем типовых культур ФГБНУ ВИЭВ, 109428, РФ, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1.

Х.С. Горбатова, ст. преподаватель кафедры эпизоотологии и организации ветдела ФГБОУ ВПО "Московская Государственная Академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина.

L. K. Semina, E. V. Remizova, Z. A. Skulyabina, T. G. Voroshilova, N. N. Avduevskaya, A. V. Gorbатов, Kh. S. Gorbatoва

Резюме. В статье представлены результаты испытания ассоциированной вакцины против мастита коров, позволившие определить наиболее эффективную схему иммунизации коров и нетелей. Наличие роста специфических антител в сыворотке крови вакцинированных коров позволяет считать, что вакцина иммуногенна по отношению к золотистому стафилококку и агалактичному стрептококку и может быть применена для специфической профилактики инфекционного мастита коров.

Ключевые слова: вакцинация, мастит, иммуногенность, кокковая микрофлора, специфические антитела, эффективность, быстрый маститный тест.

Summary. Results of the testing of associated vaccine against mastitis of cows allowed to determine the most effective scheme of immunization of cows and heifers. Increase of specific antibodies in the serum of vaccinated cows suggests that the vaccine is immunogenic against *Staphylococcus aureus*

and *Streptococcus agalactiae* and can be used for specific prevention of infectious mastitis in cows.

Key words: vaccination, mastitis, immunogenicity, coccal microflora, specific antibodies, efficiency, fast mastitis test.

Одной из самых серьезных проблем в молочном животноводстве была и остается борьба с маститом. При этом все большее количество авторов приходит к выводу об инфекционной природе массовых маститов у коров [1, 2, 3, 4]. Высокий процент заболеваемости коров маститами инфекционной природы в хозяйствах Вологодской и других областей РФ вызывает необходимость в разработке новых способов профилактики этого массового заболевания среди коров, в том числе специфической. В настоящее время ветеринарная фармакология предлагает ряд вакцин против мастита коров, таких как "Мастивак" (Испания), "Старвак" (Испания), "Ваколин" (Россия) [5]. Однако они отличаются дороговизной и зачастую недоступны сельскохозяйственным предприятиям молочного направления.

Учитывая вышесказанное, сотрудниками ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р.Коваленко и Вологодского филиала института начаты исследования по изучению профилактической эффективности ассоциированной вакцины, (разработка ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р.Коваленко), созданной для специфической профилактики маститов кокковой этиологии у коров.

Цель работы: определить эффективность различных схем использования противомаститной ассоциированной вакцины и разработать новый способ специфической профилактики стрептостафилококковых маститов у коров.

Материалы и методы

Научные исследования выполняли на базе Вологодского филиала ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р.Коваленко, а также в трех животноводческих хозяйствах Вологодской области. При этом использовали клинические, серологические исследования в соответствии с действующими наставлениями и методическими указаниями по их проведению. Объектом исследования служили коровы (173 головы) в разные физиологические периоды (сухостойный и лактационный). Предмет исследования - секрет молочной железы, сыворотка крови подопытных животных. Схемы вакцинации коров против мастита инфекционной этиологии, дозы и сроки вакцинации представлены в таблице. Оценка эффективности вакцины осуществлялась по результатам клинического осмотра животных, исследованию секрета молочной железы вакцинированных коров на уровень соматических клеток в 1 см³ с помощью быстрого маститного теста ("Кенотест", ООО "РАБОС Интл"), серологического исследования (РНГА) крови животных на наличие специфических антител. Ис-

следования проводились девятикратно: 1 - до вакцинации; 2 - через 13-14 дней после первого введения вакцины, перед ревакцинацией; 3 - через 13-14 дней после ревакцинации; 4 - через один месяц после ревакцинации; 5 - через два месяца после ревакцинации (в послеродовой период); 6 - через три месяца после ревакцинации; 7 - через четыре месяца после ревакцинации; 8 - через пять месяцев после ревакцинации; 9 - через шесть месяцев после ревакцинации.

Полученные в процессе НИР результаты обработаны методами математической статистики с помощью пакета программ Microsoft Office (2003, 2007).

Результаты исследования

Для получения наибольшей эффективности иммунизации коров противомаститной вакциной провели серию опытов по определению оптимального состава, дозы, кратности и периода введения вакцины. Результаты опытов для наглядности приведены в таблице. В процессе испытания модифицировался состав вакцины - от микробных культур стрептококков и стафилококков из музея культур ФГБНУ ВИЭВ (серия №1), до культур, изолированных из секрета вымени больных маститом коров тех ферм, на которых проводилась иммунизация коров (серия №2 и №3). Изменен метод и место введения вакцины - от внутримышечного в область крупа до подкожного в область средней трети шеи. Доза вводимого препарата увеличилась с 2,0 см³ (первое введение) и 3,0 см³ (второе) при первых трех испытаниях до 5,0 и 5,0 см³ - при последующих (см. таблицу).

Сроки введения также различались - от применения в сухостойный период (за 10 и 40 дней до предполагаемого отела) до использования в лактационный период одновременно всему здоровому поголовью коров и первотелок.

Как показали результаты испытаний, профилактическая эффективность различных серий и схем вакцинации животных по показателям быстрого маститного теста колебалась от 44,0 % (серия № 1) до 97,8,3 % (серия № 3). На наш взгляд, более высокие показатели эффективности вакцины третьей серии обусловлены тем, что при ее изготовлении использованы штаммы бактерий (*S. aureus* и *St. agalactiae*), изолированных из секрета молочной железы коров указанной фермы, т.е. более специфична. Кроме того, при проведении испытаний в данном хозяйстве были увеличены дозы вводимой вакцины (в сумме - в 2 раза), изменен период иммунизации (лактационный период), способ и место введения (подкожно в область средней трети шеи).

Одним из главных критериев оценки эффективности вакцины является наличие роста специфических антител. Нашими исследованиями установлено, что в хозяйстве наиболее часто регистрировались такие возбудители мастита, как золотистый стафилококк и агалактийный стрептококк. В связи с этим был определен уровень антител к этим компонентам вакцины.

Титр антител к *S. aureus* у коров до первого введения вакцины варьировал от 1:16 до 1:1024, а в среднем составил 342,4±225,0, что больше диагностического титра в 10,7

раз. При этом клинических признаков мастита или других патологий не наблюдалось, быстрый маститный тест (БМТ) на скрытый мастит был отрицательным. После первого введения вакцины средний уровень антител резко упал до 48,0±25,0, что говорит о первичной вакцинальной недостаточности, вызванной угнетением иммунной системы. Через 14 дней после ревакцинации титр антител увеличился более чем в 6 раз, а в послеродовой период составлял уже 1:1024 у всех опытных коров. Спустя шесть месяцев наблюдений он был равен 99,2±53,57, что выше диагностического значения в 3 раза. Титр антител к *St. agalactiae* у коров до первого введения вакцины изменялся от 1:32 до 1:64, а в среднем составил 32,0±10,71, что соответствовало уровню диагностического титра. После первого введения вакцины средний уровень антител увеличился в 4 раза, через 14 дней после ревакцинации - 1,5 раза, а в послеродовой период - 2, 5 раза. Спустя шесть месяцев наблюдений он был равен 134,4±50,0, что выше диагностического значения в 4,2 раза.

Испытания, проведенные в ряде хозяйств Вологодской области с использованием ассоциированной вакцины против мастита кокковой этиологии, дали возможность определить наиболее эффективную схему вакцинации животных и разработать способ специфической профилактики маститов у коров. Способ обеспечивает образование специфического иммунитета к возбудителям мастита.

Наличие роста специфических антител в сыворотке крови вакцинированных коров позволяет считать, что вакцина иммуногенна по отношению к золотистому стафилококку и агалактийному стрептококку и может быть применена для специфической профилактики инфекционного мастита коров.

Список литературы

1. Кузьмин Г.Н. Инфекционный мастит коров // Воронеж, "Истоки". - 2004. - 146 с.
2. Черепяхина Л.А. Динамика циркуляции патогенов мастита и антисептическая обработка вымени // Молочное скотоводство. - 2007. - № 2. - С.37-39.
3. Семина Л.К., Ворошилова Т.Г., Рыжакина Е.А. К вопросу об инфекционной природе массовых маститов у коров // Материалы Международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел". - Москва - 2011. - С. 294-297.
4. Семина Л.К., Ворошилова Т.Г. Ремизова Е.В. Этиологическая структура маститов у коров в хозяйствах Вологодской области // Ветеринария и кормление. - 2015.- №5. - С. 77.
5. Скосырских Л.Н. Перспективы применения вакцин против мастита коров // Ветеринария. - 2013. - № 4 (23). - С. 57-60.

References:

1. Kuzmin G. N. Infectious mastitis of cows - Voronezh, "Origins" - 2004. - 146 p.
2. Cherepakhina L. A. Dynamics of circulation of pathogens of mastitis and antiseptic udder // Dairy cattle. - 2007. - № 2. - P. 37-39.
3. Semina L. K., Voroshilova T. G., Ryakhina E. A. To the question of the infectious nature of the mass of mastitis in cows // Materials of the International scientific-practical conference "Actual

Таблица. Сравнительная характеристика способов применения вакцины

Показатели	Серия вакцины				
	1 №1	1 №2	2 №2	2 №3	3 №4
Ферма					
Состав вакцины	Микробные культуры стрептококков серогруппы С (<i>Str. equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i>), серогруппы В (<i>Str. agalactiae</i>) и стафилококка <i>S. aureus</i> (ФГБНУ ВИЭВ)		Микробные культуры стрептококков серогруппы С (<i>Str. equi</i> subsp. <i>Zoepidemicus</i>), серогруппы В (<i>Str. agalactiae</i>) и стафилококка <i>S. aureus</i> (изолированы из молока коров молочного комплекса) (№2)		Микробные культуры стафилококка <i>S. aureus</i> , стрептококков (<i>Str. agalactiae</i>) изолированные из молока коров ф. № 4
Животные, колич-во голов	Коровы и нетели				
Метод введения	внутримышечно в область крупа			подкожно в область средней трети шеи	
Кратность введения	Первично – двукратно, при ревакцинации – однократно				
Доза	2,0 и 3,0 см ³	2,0 и 3,0 см ³	2,0 и 3,0 см ³	5,0 и 5,0 см ³	5,0 и 5,0 см ³
Сроки введения	1-е введение – за 10 дней до предполагаемого отела. 2-е – через 12-14 дней после первого введения, но не ранее чем на 4-й день после отела		1-е введение – в сухостойный период, но не позднее, чем за 40 дней до отела, 2-е – через 14 дней после 1-ого введения		в лактационный период, но не ранее чем на 4-й день после отела
Иммунный ответ	Через 12-14 дней после двукратного применения				
Эффективность (по показателям БМТ), %	72,7-90,9	44,0-66,7	Коровы – 66,0 -78,0. Нетели – 90,0-100,0	76,5-95,0	91,3-97,8

problems of infectious diseases of young and other age groups of agricultural animals, fish and bees". - Moscow. - 2011. - P. 294-297.

4. Semina L. K., Voroshilova T. G. Remizova, E. V. Etiological structure of mastitis in cows in the farms of the Vologda region // Veterinary and feeding. - 2015.- № 5. - P. 77.

5. Skosyrskih L. N. Prospects for the use of vaccines against mastitis cows // Veterinary. - 2013. - № 4 (23). - P. 57-60.

УДК 619:576.851.42:636.294

Система мониторинга за эпизоотической обстановкой по бруцеллезу северных оленей и способы повышения его эффективности в современных условиях

Гордиенко Л.Н. – кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник, врио директора, vniibtg@rambler.ru
Куликова Е.В. – научный сотрудник лаборатории экологии, lab.ecology.vniibtg@mail.ru

Новиков А.Н. – кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории экологии, novikovart06@mail.ru

ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных" 644001, ул. Лермонтова, д.93, г. Омск, Российская Федерация, 8(3812) 563260

Аннотация. В комплексе профилактических и оздоровительных мероприятий при бруцеллёзе северных оленей важную роль играет мониторинг за эпизоотическим состоянием стад. Система мониторинга в северном оленеводстве имеет свои особенности, связанные со спецификой отрасли.

От объективности результатов мониторинга зависит своевременность и правильный выбор методов и средств противозооотических мероприятий в свежих очагах бруцеллёза и в стадах с хроническим течением инфекции.

Проведение диагностических мероприятий в сочетании с технологическими процессами комплексов по убою северных оленей позволяет провести отбор проб крови от 100% убойного контингента и более, чем 5 раз увеличить количество обследуемых на бруцеллез животных. При использовании предлагаемой методики выявлены единичные случаи инфицированных животных при заносе возбудителя бруцеллеза в четырех стадах, ранее благополучных, и получены объективные данные о степени интенсивности распространения заболевания в неблагополучных стадах с хроническим течением инфекции.

Ключевые слова: северные олени, бруцеллез, эпизоотическая ситуация, мониторинг.

Monitoring system for epizootic situation on reindeer' brucellosis and methods for increasing its effectiveness in modern conditions

Gordienko L. N., Kulikova E. V., Novikov A. N.

The brucellosis of reindeer is registered in the vast territory of the circumpolar subarctic of the Russian Federation. The natural foci are supported by the source of infection in wild populations of reindeer. The multiple uses of the same pasture domestic and wild deer, the reservation of brucella in organism carnivorous, the circulation of the pathogen in the environment pose a danger of introduction of infection in a free from brucellosis herds and spread of the disease among the susceptible animal population. The monitoring of the epizootic state of herds plays an important role in the complex of preventive and recreational measures with reindeer brucellosis. The monitoring system in the northern reindeer herding has its own characteristics associated with the specifics of the industry. The timeliness and correct choice of methods and means of anti-epizootic measures in fresh centers of brucellosis in herds with a chronic course of infection depend on the objectivity of the monitoring results. The number of detected cases of brucellosis of animals and bacteria carriers is directly dependent on the completeness of the coverage of the investigated animal population. As a result of this work it has been proposed a method of collecting of reindeer

blood and obtaining serum adapted on the three complexes for slaughtering reindeer: "The Yamal reindeer" (Yar-Sale, Yamal region), "Nydingskoye" (Nyda, Nadym region), "Antipayutinsky" (Antipayuta, Taz region). The organizing of diagnostic measures in combination with technological processes of complexes for slaughtering reindeer allowed to carry out for blood sampling from the 100% slaughter contingent and more than 5 times to increase the number of inspected animals. We have identified isolated cases of infected animals with introduction brucellosis pathogen in four stages the previously advantaged and obtain objective data on the intensity of the extent of the disease in disadvantaged herds with a chronic course of infection by using the proposed method.

Key words: reindeer, brucellosis, epizootic state, monitoring.

Бруцеллез северных оленей регистрируется на обширной территории субарктического циркумполярной Российской Федерации [1]. На проявление инфекционного и эпизоотического процессов при бруцеллезе у северных оленей оказывают влияние многочисленные факторы, связанные с географическими, климатическими, ландшафтными, этническими и другими особенностями Крайнего Севера [2].

Наличие природных очагов бруцеллеза и их поддержание за счет источника инфекции среди дикой популяции оленей, смешивание домашних и диких оленей на маршрутах движения, круглогодичный выпас с многократным использованием одних и тех же пастбищ, резервация бруцелл в организме домашних и диких плотоядных, циркуляция их во внешней среде создают опасность заноса возбудителя в благополучные стада и распространение инфекции среди восприимчивого поголовья [3].

Для контроля за эпизоотическим состоянием стад северных оленей по бруцеллезу и недопущению возникновения очагов инфекции в стадах проводят мониторинг. Система мониторинга по бруцеллезу северных оленей включает анализ результатов эпизоотических, клинических и лабораторных исследований [4].

Клиническое обследование оленей и наблюдение за их состоянием осуществляют зооветспециалисты, бригадиры и пастухи непосредственно в стадах во время движения на маршрутах пастбы, лежки, случки, отела. Отсутствие транспортных связей в условиях тундры и невозможность обеспечить оленеводческие бригады стационарными и переносными коралями создают сложности в проведении диагностических мероприятий и не позволяют их осуществлять системно, массово и с полным охватом поголовья.

В северном оленеводстве диагностические исследования проводят с целью мониторинга эпизоотического состояния стад на основании групповой оценки [5].

Отбор крови проводят выборочно от животных всех половозрастных групп. В условиях тундры традиционно животных отлавливают на аркан, фиксируют в лежачем положении и кровобратальной иглой проводят отбор крови из яремной вены.

В зимний период года отбор крови совмещают с хозяйственными мероприятиями на убойных площадках, где отбор проб крови производят из шейных сосудов при обескровливании животных. Данные методы позволяют охватить диагностическими исследованиями 3–5% поголовья. В случае заноса возбудителя бруцеллёза в стадо северных оленей вероятность выявления заражённых животных слишком низкая и может возникнуть опасность формирования очага и вспышки инфекции. В этой связи мы посчитали целесообразным повысить эффективность системы мониторинга за эпизоотическим состоянием по бруцеллёзу северных оленей за счёт оптимального сочетания хозяйственных, зоотехнических и ветеринарных мероприятий с учётом специфики отрасли.

Материалы и методы

Работу проводили в оленеводческих хозяйствах 4-х районов Ямало-Ненецкого автономного округа: Пуровском, Надымском, Тазовском и Ямальском с 2004 по 2016гг.

Отбор проб крови от оленей проводили в условиях тундры летом при заготовке пантов. В зимний период на комплексах по убою оленей. Сыворотку крови получали путем отстаивания, консервировали летом – борной кислотой, зимой – методом замораживания и доставляли в лабораторию экологии института. Серологические исследования проводили общепринятыми методами в реакции агглютинации (РА), реакции связывания комплемента (РСК), реакции иммунодиффузии (РИД с О-ПС антигеном) и розбенгал пробе (РБП) [6].

Результаты и обсуждение

В результате проведенной работы была предложена методика отбора крови от северных оленей и получения сыворотки и адаптирована на трёх комплексах по убою северных оленей: "Ямальские олени" (п. Яр-Сале, Ямальский район), "Ныдинский" (п. Ныда, Надымский район), "Антипаютинский" (п. Антипаюта, Тазовский район).

В условиях комплекса по убою северных оленей разработан алгоритм действий специалистов, занятых в процессе ветеринарного контроля на всех "зонах" предприятия, произведён расчёт необходимого количества лабораторной посуды, реактивов, материалов, дезсредств и оборудования с учётом непрерывной работы комплекса в период убойной компании с ежедневным объёмом до 350 голов оленей. Определены возможности обработки и приготовления лабораторной посуды для взятия крови непосредственно на комплексе с целью минимализации затрат на её приобретение, условий хранения и утилизации использованных пробирок в соответствии с требованиями существующих санитарных правил. В производственных условиях совместно с ветеринарными специалистами оленеводческих бригад ветеринарные врачи предприятия апробировали и успешно внедрили методику отбора крови и приготовления сыворотки. С учётом того, что убойный контингент составляет до 17-20% поголовья стада, то количество исследованных животных значительно увеличилось при минимальных финансовых и физических затратах.

Анализируя результаты серологических исследований на бруцеллёз, проводимых с 2006 года по предлагаемой методике, в Ямальском районе, позволило увеличить количество обследованных животных ежегодно до 15–22 %.

Увеличение охвата обследованного поголовья способствовало повышению качества контроля за эпизоотическим состоянием северных оленей при постоянном их движении, смешивании и перегруппировках. Благодаря этому в 2014 году были выявлены единичные случаи положительно реагирующих животных в двух бригадах МУП "Яр-салинское" и в одной бригаде МУП "Панаевское" Ямальского района. В результате анализа эпизоотической обстановки установлено, что занос возбудителя бруцеллёза в стада произошел с животными личного пользования пастухов, переместившихся с неблагополучной территории и выпасавших их вместе с общественным поголовьем, которое в течение длительного времени было свободное от бруцеллёза.

В 2016 году с применением предлагаемой методики выявлено по одному инфицированному бруцеллёзом животному в бригаде МУП "Ярсалинское" и в оленеводческой общине. При анализе ситуации установлена аналогичная причина. Выявление инфицированных животных в ранее

благополучных стадах на территории свободной от бруцеллёза позволило своевременно принять меры к недопущению распространения инфекции среди восприимчивого поголовья оленей и в короткие сроки завершить оздоровительные мероприятия.

При использовании предлагаемого метода на "Антипаютинском" и "Ныдинском" комплексах, введенных в эксплуатацию в 2013 и 2014 годах, количество исследованных на бруцеллез животных увеличилось в 5,7 раз и в 6,4 раз соответственно. Использование предлагаемой методики позволило увеличить охват поголовья обследованных животных, что дало возможность с большей объективностью определить интенсивность распространения инфекций среди оленей в бригадах ЗАО "Ныдинское", неблагополучных по бруцеллёзу.

В заключении следует отметить, что в комплексе профилактических и оздоровительных мероприятий при бруцеллёзе северных оленей важную роль играет мониторинг за эпизоотическим состоянием стад. Система мониторинга в северном оленеводстве имеет свои особенности, связанные со спецификой отрасли.

От объективности результатов мониторинга зависит своевременность и правильный выбор методов и средств противозооотических мероприятий в свежих очагах бруцеллёза и в стадах с хроническим течением инфекции.

Количество выявленных больных бруцеллёзом животных и бактерионосителей находится в прямой зависимости от полноты охвата исследуемого поголовья.

Список литературы:

1. Забродин В.А., Казановский Е.С. Ветеринарные проблемы северного оленеводства // Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки России / Сб. материалов научной сессии Российской академии сельскохозяйственных наук. - М., 1999. С. 94-96
2. Калиновский А.И. Бруцеллез в Восточной Сибири и на Дальнем Востоке (теоретические и прикладные аспекты эпидемиологии, микробиологии и профилактики): автореферат дис.... доктора медицинских наук: 14.00.30 / Науч. центр мед. экологии. - Иркутск, 2006. 47 с.
3. Хоч А.А. О бруцеллезной инфекции диких северных оленей в Якутии // Тр. Якутского НИИСХ. 1975. Вып. 14. С. 143-145.
4. Гордиенко Л.Н. Обеспечение ветеринарного благополучия в северном оленеводстве России // Современное состояние и перспективы продовольственного обеспечения населения Севера РФ и его научного сопровождения. Материалы совместного заседания Северо-западного регионального научного центра и Комитета по агропромышленному комплексу и продовольственному рынку Мурманской области. 2014 -Издательство: Северо-западный региональный научный центр. С. 54-57.
5. Куликова Е.В., Гордиенко Л.Н. Повышение качества эпизоотического мониторинга при бруцеллёзе северных оленей на убойном и перерабатывающем комплексе // Перспективы инновационного развития агропромышленного комплекса и сельских территорий. Материалы международного конгресса. Сер. "Агрорусь" Северо-Западный региональный научный центр Российской академии сельскохозяйственных наук, Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, ООО "ЭФ - ИНТЕРНЕТШНЛ". 2014 - Санкт-Петербург.-2014. С. 74-75.
6. Наставление по диагностике бруцеллёза животных № 13-5-02/0850. Утв. департаментом ветеринарии Минсельхоза России 29.09.03. М., 2003. - 64 с.

УДК:619:616.98.578.835.2

Эволюция микроорганизмов

С.А.Гринь, член-корреспондент РАН, зам.директора ФГБНУ ВНИТИБП

Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, 141142, Московская область, Щелковский район поселок Биокомбината, Тел.8-496-567-32-63

Современные эволюционные процессы происходящие с микроорганизмами существенно влияют на взаимодействия с микроорганизмами. Если известны сотни опасных патогенных микроорганизмов и повышение их вирулентности требует от ученых и практиков интенсификации усилий с более углубленным изучением вопросов, связанных с защитой от них микроорганизмов.

Ключевые слова: геномные мутации, серотипы, микроорганизмы

Evolution of microorganisms

S.A. Grin

Modern evolutionary processes occurring microorganisms significantly affect the interaction with microorganisms. If there are hundreds of dangerous pathogens and their virulence increasing demands from scholars and practitioners intensify efforts with more in-depth study of issues related to the protection of these microorganisms.

Key words: genomic mutations, serotypes, microorganisms

Биологическая эволюция (от лат. *evolutio*-развертывание) – естественный процесс развития живой природы, сопровождающееся изменением генетического свойства популяций, формированием адаптаций, видообразованием и вымиранием видов преобразованием экосистем и биосферы в целом. К числу неадаптивных причин эволюции микроорганизмов относят генетический дрейф, патогенов и мутаций [6, 8, 9].

Современный этап развития цивилизации связан с интенсивным загрязнением окружающей среды. Неблагоприятные факторы, различающиеся по характеру и степени воздействия на макро (человек и животные) и микроорганизмы. К ним относятся абиотические факторы физической, химической и биологической природы; антропогенные, связанные с деятельностью человека, и биотические формы взаимодействия человека с внешней средой. Особенно важно, что ухудшение состояния естественной среды обитания приводит к увеличению образования мутаций на уровне клеток животных и растений, вирусов и бактерий в процессе их деления, когда они особенно неустойчивы и подвержены перерождению [1].

Увеличение интенсивности мутационных процессов на генетическом уровне (геномные мутации) объясняет факт

появления большого количества новых штаммов (серотипов) микроорганизмов, вызывающих инфекционные болезни. Например, на сегодняшний день регистрируется более 100 штаммов вируса ящура, свыше 2,5 тысяч штаммов сальмонелл, несколько тысяч штаммов эшерихий [2, 7]. Мутированные штаммы микроорганизмов отличаются по физическо-химическим и биологическим, иммунологическим и серологическим свойствам и могут вызвать различную клинику заболеваний, что значительно затрудняет борьбу с ним [5]. Кроме того, увеличение численности населения и животных, возрастание скорости и количества перемещаемых микроорганизмов, существенно увеличивает вероятность непрерывной передачи микроорганизмов от одного микроорганизма к другому [3]. При этом время передачи инфекции сократилось с 3 мин до 0,000002 мин. Эти факторы повышают вероятность непрерывного пассирования микроорганизмов, которые при этом становятся более вирулентными.

Таким образом, современные эволюционные процессы, происходящие с микроорганизмами существенно влияют на взаимодействия с микроорганизмами [4]. Если известны сотни опасных патогенных микроорганизмов и повышение их вирулентности требует от ученых и практиков интенсификации усилий с более углубленным изучением вопросов связанных с защитой от них микроорганизмов.

Список литературы

1. Enjuanes L. Желудочно-кишечные вирусы свиней: патогенез и методы защиты // Ветеринария и кормление. -2016.- N 5.-С. 4-19.-Рез. англ.-Библиогр.: с.18-19.
2. Kolesnikova Y.N. Prophylaxis of salmonellosis of farm animals and poultry: the main directions and means.//Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. T. 60. № 12. С. 247-254.
3. Ездакова И.Ю. Рецепторы иммунного узнавания у животных. М: Компания Спутник+. 2008. 88 с.
4. Еремина М.А. Динамика иммунологических показателей коров в разные месяцы стельности. //Зоотехния. -2013. - № 10. -С. 25-26.
5. Ефремова М.С. Количественная характеристика иммунокомпетентных клеток кур в процессе поствакцинального иммунного ответа // Ветеринария и кормление. -2013.-№1.- С.28-29
6. Забережный А.Д. Современные способы модификации вакцинных вирусных штаммов. Сборник материалов X Международной научно-практической конференции "Научные перспективы XXI века. Достижения и перспективы нового столетия". 2015. С 155-158.
7. Капустин А.В. Колибактериоз (эшерихиоз) кроликов. / Сборник научных трудов ВГНКИ, Том 66. Москва 2005. Стр. 75-84.
8. Манько В.М. Ветеринарная иммунология. Фундаментальные основы, Москва.2011. - 105-116 с.
9. Уорен Левинсон. Медицинская микробиология и иммунология. Москва. Лаборатория знаний, 2015. - 26-29 с.

УДК 579.63:57.083.12

Изменения в составе иммуноглобулинов крови служебных собак в результате антибиотикотерапии и применения пробиотика "Белолин"

Грязнева Т. Н. – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии e-mail: grjasneva@mail.ru

Ласковец Р.С. – аспирант, e-mail: laskovets84@mail.ru.

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина (ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина), Россия, 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23, тел. (495) 377-67-31

Аннотация. Значительное внимание в медицине и ветеринарии в последние десятилетия уделяется проблемам, которые могут возникнуть в результате использования некорректных схем антибиотикотерапии, а также в случаях клинической необходимости длительного применения антибиотиков. Одновременно с поисками лекарственных средств, способных нейтрализовать или купировать негативные эффекты использования антибиотиков, не ослабевают попытки поиска препаратов, не имеющих значительных побочных эффектов и способных заменить антибиотики в лечении широкого круга заболеваний, имеющих инфекционную природу. Одним из вариантов таких препаратов являются пробиотики. Статья посвящена изучению влияния антибиотико- и пробиотикотерапии у служебных собак на состав белков сыворотки крови.

Ключевые слова: белки крови, пробиотик, служебные собаки.

Changes in the composition of immunoglobulins in the blood of dogs as a result of antibiotic therapy and use of probiotic "Belolin"

Grjazneva T. N., Laskovets R. S.

Considerable attention in human and veterinary medicine in recent decades faced on the problems that can arise from the use of incorrect schemes of antibiotic therapy, as well as in cases of clinical need for long-term use of antibiotics. Along with the search for drugs that can neutralize or stop the negative effects of antibiotic use, does not weaken attempts to find drugs without significant side effects and can replace antibiotics in the

treatment of a wide range of diseases with infectious nature. One of the variants of these drugs are probiotics. The article is devoted to study the effect of antibiotic and probiotic therapy service dogs on the composition of the blood serum protein.

Key words: blood proteins, probiotic, service dog.

Служебные собаки в условиях напряжённых физических нагрузок и стрессов, обусловленных влиянием кормовых факторов подвержены риску появления у них различных дисфункциональных расстройств ЖКТ, в основном связанных с нарушением хрупкого баланса микрофлоры кишечника. Описанные причины запускают широкий каскад реакций и изменений, таких как:

- нарушение витаминного обмена и витаминная недостаточность;
- нарушение усвояемости питательных веществ;
- нарушение моторики ЖКТ;

– нарушение ферментативной активности пищеварительных желёз.

Воздействие неблагоприятных экологических факторов, попытки влиять на состояние организма химиопрепаратами приводят к еще более серьезным нарушениям [2,4].

Ввиду постоянного, а в ряде случаев – несистемного применения антибиотиков в животноводстве, эффективность их воздействия на организм заметно падает. В организме животных развивается негативные процессы, снижается численность полезной кишечной микрофлоры. При этом в составе популяций полезной микрофлоры организма накапливаются штаммы с измененными экологическими характеристиками. У представителей грамположительной микрофлоры снижается антагонистическая, адгезивная и биохимическая активность, а у грамотрицательных бактерий усиливаются вирулентные свойства. Это приводит к тому, что циркулирующая резистентных штаммов бактерий быстро растет [3].

Пробиотики – это биопрепараты, содержащие живые, антагонистически активные в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов "полезные" бактерии, и применяемые для профилактики и лечения желудочно-кишечных болезней человека и животных.

Бациллы могут оказывать как локальный, так и системный иммуностимулирующий эффект. Они стимулируют активность лимфоцитов и выработку секреторных IgA, индуцируют образование интерферона, увеличивают активность Т-лимфоцитов [1].

Цели исследования: определить состав и количественные показатели крови (морфологический и биохимический состав), а также значения уровня белковых фракций во период применения антибиотиков и на фоне применения пробиотика "Белолин". Целью исследования являлась необходимость оценки влияния антибиотико- и пробиотикотерапии на некоторые факторы иммунной защиты организма.

Табл. № 1. Морфологический состав крови собак

Показатель \ Группа	№ 1 (n=8)	№ 2 (n=10)	№ 3 (n=8)	Контроль (n=14)
Гематокрит, %	55,2±2,3*	53,2±6,5	55,6±3,0	54±1,6
Гемоглобин, г/л	125,5±3,5*	136,3±3,4	153,5±5,6*	156,1±4,3
Эритроциты, ×10 ¹² /л	3,2±0,6*	5,2±1,6*	5,5±1,6*	5,4±0,7
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	11,6±4,3*	11,8±1,2*	11,4±2,0**	11,4±0,7
Сегментоядерные нейтрофилы, %	64,3±8,4**	62,6±3,1*	64,6±3,6	62,8±8,1
Эозинофилы, %	7,6±0,4*	6,7±0,2*	3,4±0,3*	3,4±0,6
Базофилы, %	0,3±0,01	0	0	0,2±0,01
Моноциты, %	8,8±0,6*	6,2±1,3*	6,6±3,6*	7,5±0,2
Лимфоциты, %	30,6±4,2	28,4±3,2*	30,6±3,6*	33,4±4,1
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	284,4±3,3	540,6±16,6	540,4±16,2	520,3±15,6
СОЭ, мм/ч	5,4±2,5	5,9±0,9	6,6±3,1	6,1±0,4

Примечание: * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P < 0,001 – относительно контроля

Табл. № 2. Результаты биохимического исследования крови собак при применении антибиотиков

Показатель \ Группа	№ 1 (n=8)	№ 2 (n=10)	№ 3 (n=8)	Контроль (n=14)
Билирубин общий (мкмоль/л)	15,8±2,6*	16,6±3,5*	16,6±5,8	14,6±3,4
Билирубин прямой (мкмоль/л)	3,5±0,2*	3,7±0,6*	4,3±0,6	3,2±1,1
АСТ (ед/л)	42,2±2,6*	44,1±3,3*	33,5±2,6*	34,1±2,3
АЛТ (ед/л)	45,7±3,6*	45,7±4,1*	35,9±2,4*	36,7±4,1
Щелочная фосфатаза (ед/л)	66,1±1,3*	66,4±2,7*	56,7±2,6	56,4±4,7
Мочевина (мкмоль/л)	4,3±0,4*	5,6±1,1*	6,3±2,4	5,6±1,4
Креатинин (мкмоль/л)	95±3,5	99,4±5,2	80,1±7,3	79,4±6,7
Мочевая кислота (мкмоль/л)	25,9±6,4*	26,1±1,3*	23,4±5,6	26,1±3,8
Холестерин (ммоль/л)	7,2±0,9	8,1±1,2*	5,8±1,4	7,1±1,5
Глюкоза (ммоль/л)	4,5±0,4*	4,9±1,0	5,5±1,6	4,9±1,2
Калий (ммоль/л)	7,3±0,6	6,7±0,2*	5,5±0,5*	5,7±0,3
Натрий (ммоль/л)	155,2±7,6*	150,3±12,1*	146,8±7,4	139,3±2,1
Фосфор (ммоль/л)	1,5±0,3*	1,2±0,01	1,6±0,6*	1,2±0,2
Кальций (ммоль/л)	3,5±0,1	3,4±0,6*	3,5±0,1*	3,4±0,4
Магний (ммоль/л)	0,8±0,3	1,2±0,1	1,2±0,3*	1,3±0,2

Примечание: * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P < 0,001 – относительно контроля

Табл. № 3. Результаты исследования белков крови собак при применении антибиотиков

Показатель \ Группа	№ 1 (n=8)	№ 2 (n=10)	№ 3 (n=8)	Контроль (n=14)
Общий белок (г/л)	50,6±1,2*	51,2±2,0*	51,2±0,5*	51,2±2,1
Альбумины (г/л)	20,1±1,2*	23,2±1,0	25,1±2,1*	24,2±1,0
Глобулины (г/л)	28,2±1,3	26,1±1,8*	26,5±1,9*	24,1±1,8
α ₁ глобулины	1,6±0,3*	1,3±0,2	1,1±0,1	1,5±0,2
α ₂ глобулины	3,2±0,1*	3,7±0,5*	3,3±0,1*	3,5±0,3
β ₁₋₂ глобулины	4,2±1,5*	4,7±0,8*	7,9±2,2*	3,7±0,2
γ глобулины	18,6±1,2*	16,2±1,1*	13,2±1,2	15,2±2,1

Примечание: * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P < 0,001 – относительно контроля.

Табл. № 4. Результаты исследования иммуноглобулинов в сыворотке крови собак при применении антибиотиков (г/л).

Показатель \ Группа	№ 1 (n=8)	№ 3 (n=10)	№ 5 (n=8)	Контроль (n=14)
IgA	0,7±0,2*	0,8±0,3**	0,5±0,2*	0,7±0,1
IgM	1,5±0,2*	1,3±0,1*	1,1±0,1	1,2±0,2
IgG	16,3±0,02	13,5±0,4*	11,2±0,4*	12,2±0,9

Примечание: * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P < 0,001 – относительно контроля.

Материалы и методы

Исследования были проведены на базе питомника служебных собак Пограничного кинологического центра, г. Вязьма, Смоленской области.

Для опыта было отобрано 4 группы собак:

1. Группа собак (n=8) пород немецкая овчарка, бельгийская овчарка в возрасте от 2 до 5 лет, которым в течение 7 дней был назначен амоксициллин в дозе 15 мг/кг подкожно.

2. Группа собак (n=10) пород немецкая овчарка, бельгийская овчарка, которым в течение 7 дней был назначен амоксициллин совместно с пробиотиком "Белолин" в лечебной дозе 0,8 г внутрь.

3. Служебные собаки первой группы, которым после проведения исследований был назначен пробиотик в течение 7 дней в лечебной дозе.

4. Контролем в этом опыте являлась группа из 14 клинически здоровых собак от 2 до 5 летнего возраста.

Собаки содержались в вольерах, кормление осуществлялось кашей с мясом и добавлением овощей. С целью изучения изменения показателей клеток крови брали у служебных собак исследуемых групп кровь натошак. Общий анализ крови проводили на автоматическом гематологическом анализаторе Micro-CC 20 Plus по имеющейся методике (определение гематокрита, гемоглобина, концентрации эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов), а также микропипетированием мазков крови и подсчетом лейкоцитарной формулы на счетчике. Скорость оседания эритроцитов определяли по методу Панченкова. С целью изучения изменения биохимических показателей крови брали у служебных собак исследуемых групп кровь натошак, пробирки с кровью центрифугировали, исследование проводили на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Biochem SA.

Неспецифическую резистентность организма определяли по следующим показателям: общий белок, альбуминовая фракция, иммуноглобулины G, A, M на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Biochem SA. Глобулиновые фракции белка определяли с помощью методики электрофореза в агарозном геле. Результаты исследования подвергли анализу и статистической обработке.

Результаты исследования

Из таблицы № 1 видно, что группа собак, получавших антибиотик, отличалась пониженным, в сравнении с контролем, уровнем гемоглобина и эритроцитов, отмечены уменьшение СОЭ, тромбоцитопения и эозинофилия. Все эти изменения характеризуют нарушение гемопозза, свидетельствуют о возможном появлении инфекционных факторов, связанных с транслокацией условно-патогенных микроорганизмов, устойчивых к данному антибиотику, и показывающих усиленный рост в кишечнике за счет угнетения чувствительных представителей облигатной микрофлоры.

Вторая группа собак при исследовании отличалась от первой менее выраженными изменениями в отмеченных выше показателях, которые характеризовались приближенными к контрольной группе значениями.

У третьей группы сдвиг в сторону контроля заметен ещё более явно.

Данные таблицы № 2 свидетельствуют о повышенных уровнях печёночных ферментов (АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы) а также креатинина в 1 и 2 группах собак. В связи с этим можно предположить о значительном влиянии применения данного антибиотика в 1 и 2 группах на гепатоциты, разрушение которых привело к высвобождению ферментов и повышению их уровня в крови. У собак третьей группы таких изменений отмечено не было, что является подтверждением гепатопротекторного действия бактерий рода

Bacillus, за счет стимуляции рибосомальной РНК клеток печени биологически активными веществами, мембрано-защитного действия [5].

Понижение уровня альбуминов в сравнении с контрольной группой, отмеченное в таблице № 3, свидетельствует о токсическом поражении клеток печени, которое развивается при использовании антибиотиков, что сопровождается понижением синтеза альбуминов. Гиперглобулинемия у собак в первой группе также может свидетельствовать о воспалительных процессах, связанных с гибелью клеток. Белки "острой фазы" – альфа-глобулины и гамма-глобулины, уровень которых повышен, свидетельствуют также о наличии в организме необходимости в противовоспалительных агентах.

Повышение уровня IgG у собак первой группы, как видно из таблицы № 4 указывает на происходящие изменения в организме опытных собак, выражающиеся в активации иммунных факторов. В данном случае эти изменения могут быть результатом как воспалительных процессов в печени, так и чрезмерным развитием условно-патогенных микроорганизмов в толстом отделе кишечника.

Таким образом приведенные данные свидетельствуют о том, что антибиотикотерапия, широко применяемая в служебном собаководстве при лечении различных заболеваний, в том числе, заболеваний ЖКТ, сопровождающихся диареей, значительно влияет на различные функциональные связи в организме, приводит к изменениям морфологического состава крови, биохимических реакций. В свою очередь эти изменения сопровождаются различными вторичными расстройствами. Необходимо отметить, что применение антибиотиков напрямую связано с токсическим поражением печени, что сопровождается гибелью гепатоцитов.

С целью коррекции вышеописанных изменений нами был применен пробиотик "Белолин" собакам, которым был назначен антибиотик, что, согласно полученных данных, позволило значительно купировать негативные процессы, происходившие у собак при монотерапии антибиотиком, и сохранить внутренний баланс организма собак.

Также, в связи с тем, что всё же эти изменения присутствовали у собак при коррекционной терапии, мы посчитали необходимым назначить и провести исследование на собаках, которым был назначен пробиотик в качестве реабилитационной терапии (3 группа собак). Эти собаки показывали результаты наиболее приближенные к результатам клинически здоровых собак, что позволяет рекомендовать пробиотик "Белолин" как препарат, восстанавливающий нарушение гомеостаза после антибиотикотерапии.

Список литературы

1. Авдеев В. Г. Пробиотики и пребиотики в лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта / В.Г. Авдеев / Клиническая фармакология и терапия. - 2006. - №15. - С. 36-40.
2. Бакулина, Л. Ф. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus* и их использование в ветеринарии //Л. Ф. Бакулина, И. В. Тимофеев, Н. Г. Перминова, А. Ф. Полушкина, Н. И. Печоркина // Биотехнология. - 2001. - № 2. - С. 48-56.
3. Грязнева Т.Н. Пробиотики для животных: Учебно-методическое пособие. - М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ, 2012. - 258 с.
4. Егорова И.Н., Иванова И.Е. Нарушение микрофлоры кишечника у детей: практическое руководство для врачей/ Чебоксары: ГОУ ИУВ, 2009 - 72 с.
5. Патент - 2 429 869 РФ, МПК А61К 35/74. Средство "Гепатобиол" обладающее гепатопротекторным действием/ Забокрицкий Н.А., заяв. 2008155589/15, опубл. 27.09.2011, бюл. № 27.

УДК619:616.937.5

Роль клеток крови в становлении и развитии иммунного ответа (обзор литературы)

М.И. Гулюкин – директор ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко" (ФГБНУ ВИЭВ), академик РАН, Москва, РФ

Т.В. Степанова – научный сотрудник лаборатории лейкологии

ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко" (ФГБНУ ВИЭВ), Москва, РФ.

Аннотация. В статье представлен обзор литературы о роли нейтрофильных гранулоцитов, миелоидных супрессорных и дендритных клеток в формировании иммунного ответа.

Ключевые слова: нейтрофилы, дендритные клетки, иммунный ответ, нетоз, апоптоз.

The role of blood cells in the formation and development of the immune response (literature review)

M.I. Guliukin, T.V. Stepanova

The article reviews the literature on the role of neutrophilic granulocytes, myeloid suppressor and dendritic cells in the formation of an immune response.

Key words: neutrophils, dendritic cells, immuneresponse, notosis, apoptosis.

На современном этапе развития промышленного животноводства, распространение инфекционных, протозойных, микологических болезней можно предотвратить комплексными мероприятиями по повышению резистентности животных, связанных, в частности, с повышением эффективности действия отдельных факторов неспецифического иммунитета, а также с использованием средств специфической профилактики: вакцин и сывороток.

Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе сниженной эффективности вакцины, остаются не исследованными. Особенно это касается использования в составе вакцин адьювантов. Адьюванты обычно повышают иммуногенность совместно вводимых антигенов, но, к сожалению, также мало известно о механизмах их действия.

Практическим ветеринарным специалистам необходимо знать, что вакцинация животных, наряду со специфическим иммунным ответом, вызывает неспецифические сдвиги в состоянии иммунной системы, деятельность и интенсивность которых варьирует в зависимости от свойств и дозы вакцин, а также от кратности введения.

В книге Т.И. Ульянкиной "Зарождение иммунологии" (1994) отмечено, что второе десятилетие XX века является определенным рубежом в истории иммунологии [1]. В этот период, как отмечает автор, завершилось формирование классической иммунологии и в это время произошло социальное признание иммунологии как науки. Необходимо также отметить, что в 1902 г. Эмиль Беринг, в 1905 г. Роберт Кох, в 1908 г. Илья Ильич Мечников и Пауль Эрлих, в 1913 г. Шарль Рише, в 1919 г. Жюль Борде были удостоены Нобелевской премии за исследования в теоретической и практической иммунологии.

В научной литературе термин "иммунитет" четко обозначен тем, что происходит от латинского "immunitas", означающего "освобождение, избавление от чего - то".

Достаточно широко известно, что русские ученые внесли большой вклад в развитие и становление иммунологии как науки. Открытие фагоцитоза в 1882 г. связано с именем русского микробиолога И.И. Мечникова, и это стало основой формирования иммунологии как науки [2].

В настоящее время наукой установлено, что в организ-

ме человека и животных существует огромное разнообразие субпопуляций лимфоцитов с разными видами специфичности, и практически каждый антиген может найти соответствующий клон лимфоидных клеток, способных отвечать выработкой антител с последующим формированием эффекторов клеточного иммунитета.

Таким образом, гемопоэз или кроветворение – это многостадийный процесс образования, развития и созревания клеток крови. У млекопитающих, после рождения, центральным органом кроветворения становится костный мозг. В костном мозге все клетки крови берут начало от стволовых полипотентных клеток.

В настоящее время экспериментально доказано существование для всех ростков кроветворения, в том числе и лимфоцитов, единой полипотентной стволовой клетки.

По данным Р.В. Петрова (1982) одно из наиболее распространенных определений иммунитета – это способ защиты организма от живых тел и веществ, несущих на себе признаки генетической чужеродности. Следовательно, защитные реакции сопровождаются появлением специфических иммунокомпетентных клеток и соответственно антител, осуществляющих удаление из организма всего чужеродного, в том числе и генетически изменившихся клеток [3].

К настоящему времени значительно изменилось традиционное представление о клетках гематологической системы и в том числе о нейтрофильных гранулоцитах (НГ). По современным представлениям данная гетерогенная популяция клеток является одним из главных эффекторов врожденного иммунитета. По данным Черешнева В.А. и соавт. (2013) нейтрофильные гранулоциты, обладая способностью быстро мигрировать к месту инвазии микроорганизмов и располагая обширным спектром механизмов их инактивации, НГ выступают в роли первой линии иммунной защиты. По данным авторов, наличие сегментированного ядра у зрелых форм позволяет НГ проникать через мелкие поры диаметром 3–5 мкм, купировать инфекционный процесс в месте инвазии патогенов, препятствуя их распространению [4].

Результаты многих исследователей свидетельствуют о ключевой роли НГ в инактивации вне- и внутриклеточных бактерий, вирусов и грибов. В связи с этим произошло возрождение интереса исследователей к нейтрофильным гранулоцитам и это обусловлено тем, что наряду с эффекторной функцией, данные клетки обладают мощным иммунорегуляторным потенциалом. По данным Mantovani A. et al., (2011), Rieber Netal., (2013), Долгушкина И.И. и соавт. (2009) в зависимости от степени зрелости и фенотипических особенностей, НГ могут способствовать развитию врожденного и адаптивного иммунного ответа или приводить к формированию толерантности к специфическому антигену.

В 2004 году Brikmann V. et al. описали новую стратегию антимикробного действия нейтрофилов – формирование во внеклеточном пространстве сетеподобных структур – нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ). Образование внеклеточных ловушек служит еще одной стратегией нейтрофилов и важным механизмом врожденного иммунного ответа, а нетоз (netosis) – еще одной формой программированной гибели нейтрофилов, альтернативной апоптозу и некрозу.

Как отмечает Долгушин И.И. и соавт. (2009), Kaplan M.J., Radie (2012), Tillack K. et al. (2012), Barrientos L. et al. (2014) в последние годы внимание исследователей привлекают сетчатые структуры, состоящие из ядерного хроматина и гранул антимикробных протеинов, названные нейтрофильными внеклеточными ловушками (NET – neutrophil extracellular traps). Они по данным авторов высвобождаются в результате особой формы клеточной смерти (нетоза) и служат для иммобилизации и деградации микробных патогенов, препятствующих их распространению. Кроме этого, помимо эффекторной функции, NET способны оказывать иммунорегуляторное воздействие на другие клетки иммунной системы: поддерживают пролиферацию, сни-

жают порог активации клеток адаптивного иммунитета усиливают секрецию цитокинов. По данным Б.Г. Андриякова и соавт. (2016) изучение феномена образования нейтрофильных внеклеточных ловушек инетоза, а также их связи с патогенезом инфекционной и неинфекционной патологии – одно из самых интересных и актуальных направлений современных научных исследований. Нейтрофильные внеклеточные ловушки играют существенную роль в патогенезе ряда аутоиммунных и воспалительных заболеваний человека и животных.

Нейтрофилы, являясь фагоцитами, осуществляют поглощение киллинга разнообразных патогенов хозяина в процессе фагоцитоза, а также экзоцитоз антимикробных пептидов и образование активных форм кислорода для защиты от внеклеточных микроорганизмов [5].

По данным Nathan C. (2006), Воробьева Н.В. и соавт. (2012), Brikmann V., Zychlinsky A. (2012) нейтрофилы также обладают способностью атаковать патогены, выбрасывая "нейтрофильные внеклеточные ловушки, которые представляют собой фибриллы хроматина; в их состав входят антимикробные белки гранул, ядра и цитоплазмы". Выброс ядерного хроматина по данным Steinberg B.E., Grinstein S. (2007) активируется специфическими индукторами и сопровождается гибелью клеток – нетозом.

Помимо участия в защите хозяина от патогенов, нетоз играет существенную роль в патогенезе ряда аутоиммунных заболеваний, как васкулит мелких сосудов, волчаночный нефрит, ревматоидный артрит, псориаз, системная красная волчанка и др. (Kessenbrock K. et al., 2009; Hakkim A. et al., 2010; . Khandpur R. et al., 2013; . Pinegin B. et al., 2013). По мнению авторов, в соответствии с этим подавление нетоза должно оказывать сильное терапевтическое воздействие на данные заболевания. В работе Воробьевой Н.В. и соавт. (2016) подробно представлена методика выделения первичных нейтрофилов человека, а также подсчет нейтрофильных ловушек.

Поэтому, в настоящее время научными исследованиями четко доказано, что нейтрофилы – первые эффекторные клетки, в огромном количестве колонизирующие очаг инфекции [6,7]. Эти клетки, активно взаимодействуя с другими иммунокомпетентными клетками, активируются и реализуют свои антибактериальные функции – фагоцитоз, дегрануляцию и формирование нейтрофильных ловушек.

В работах отечественных и зарубежных исследователей основными морфологическими отличиями нетоза от апоптоза служат разрушения ядерной мембраны, деконденсация хроматина, отсутствие фрагментации ДНК, смешивание содержимого ядра и цитоплазмы и высвобождение их во внеклеточное пространство. Нетоз морфологически характеризуется тем, что при микроскопии необратимые изменения происходят в ядрах и цитоплазме клеток. Клетки теряют воду, ядра сморщиваются и уплотняются (кариопикноз), затем нуклеиновые кислоты в виде отдельных глыбок выходят из ядра в цитоплазму клетки, происходит распад ядра, наблюдается кариорексис. Ядерное вещество растворяется (кариолизис). Исчезновение клеточных ядер один из основных признаков некроза. Та же динамика гибели наблюдается в цитоплазме.

Определенно, следует особенно отметить, что нейтрофильные гранулоциты – важнейшие клетки врожденного иммунитета, участвующие в невероятно быстрой реакции противобактериальной и противовирусной защиты. По данным литературы, это самая мобильная и многочисленная популяция клеток врожденного иммунитета, молниеносно реагирующая на любую агрессию, осуществляющая, в том числе и мощную противинфекционную защиту [8,9]. В работах ряда авторов Mantovani A. (2011); Fillay J. et al. (2013); Нестерова И.В. и соавт. (2015, 2016) отмечено, что различные субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов обладают разнообразными регуляторными влияниями как позитивного активирующего, так и негативно супрессирующего характера практически на все иммунокомпетентные клетки. Адекватный ответ НГ при контакте с различными

агрессивными патогенами (вирусами, бактериями, грибами), по мнению авторов, может развиваться вариантами.

В то же время недостаточность функциональной активности НГ – фактор риска для развития многих патологий.

В работах Нестерова И.В., и соавт. (2012,2015,2016) обозначена двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты. Следует отметить, что результаты исследований последних лет Coussen L.M., Werb Z. (2001), Di Carlo E. et al. (2003), Нестерова И.В. и соавт. (2008,2015,2016) продемонстрировали, что нейтрофильные гранулоциты активно вовлекаются в реализации полноценного противоопухолевого ответа и участвуют в уничтожении мутировавших клеток и, первыми из клеток иммунной системы мигрируют к опухоли на ранних стадиях ее формирования, кроме того, авторами показано, что НГ, являясь составной частью морфологической структуры опухолей, активны в иммунном надзоре против различных опухолевых клеток.

Ранее было принято считать, что нейтрофильные гранулоциты – это дифференцированные клетки, не способные к белковому синтезу, перестройке ядра, активной трансформации, синтезу и секреции цитокинов.

В настоящее время убедительно доказано, что под влиянием цитокинового окружения нейтрофильные гранулоциты способны к дифференцировке, синтезу и секреции цитокинов, хемокинов, различных пептидов и множества других молекул, трансформации в антигенпрезентирующие клетки. Исходя из этих данных, многие авторы считают, что нейтрофильные гранулоциты – это ключевые клетки иммунной системы, участвующие в реализации и регуляции реакций как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Следовательно, нейтрофильные гранулоциты вплоть до терминальных стадий дифференцировки сохраняют способность к приобретению функций и маркеров дендритных клеток, с которыми связывают функции антигенпредставляющих клеток (АПК) [10].

Данные некоторых исследований, проведенных в различных лабораториях, N. Tamassietal. (2007), T. Guietal. (2013), P. Nordenfilit, H. Tapper (2011), R. Kainetal. (2010), A.R. Markovichetal. (2013), A. Mocsai (2013), B.G. Andryukovetal. (2015), Б.Г. Андриякова и соавт. (2016) показали, что характер инфекционного процесса зависит от течения иммунных реакций и эффективности антибактериальных систем клеток врожденного иммунитета, в том числе нейтрофилов, функционирующих не только в качестве фагоцитов, они непосредственно взаимодействуют с лимфоцитами, естественными клетками, играющими центральную роль в реализации реакций адаптивного иммунитета.

Андрияков Б.Г. и соавт. (2016) приводят данные о том, что нейтрофильные гранулоциты, будучи клетками врожденной иммунной системы, используют различные стратегии антимикробной защиты организма в процессе развития инфекционного воспаления, и в зависимости от природы сигнала активации и, стоящих перед ними эффекторных задач, нейтрофилы используют различные функции антибактериальной защиты: фагоцитоз, дегрануляция и формирование внеклеточных сетей – ловушек, и являются активным афферентным участником модуляции иммунных реакций – врожденной иммунной системы и приобретенного адаптивного иммунитета.

В работах Chanova T. et al. (2008) и Tecchio C. et al. (2014) показано, что нейтрофильные клетки могут воздействовать на другие клетки иммунной системы как путем прямых межклеточных взаимодействий, реализующихся во вторичных лимфоидных органах, так и дистанционно, посредством растворимых медиаторов.

Таким образом, секретлируемые в большом количестве активированными нейтрофилами медиаторы способствуют созреванию, дифференцировке, активации клеток врожденного и, в особенности, адаптивного иммунитета.

В обзорах Mayadas et al. (2014), Б.Г. Андриякова и соавт. (2016) представлен весь спектр антибактериальных стратегий нейтрофилов при инфекционной патологии на основе

использования научных данных. Так, по данным авторов в реализации механизмов врожденного и адаптивного иммунитета важнейшую роль играет нейтрофилы – наиболее многочисленный и мобильный пул лейкоцитов, составляющие 50–70% популяций лейкоцитов. Свое название, нейтрофильные гранулоциты, получили вследствие наличия в цитоплазме гранул, компоненты которых играют основную роль в эффекторных функциях нейтрофилов.

В своих антимикробных действиях нейтрофилы по данным Б.Г. Андрюкова и соавт. (2016), B.N. Jaegeretal. (2012), H.Parkeretal. (2012) могут использовать до 300 ферментных и белковых компонентов гранул, обладающих высокой реакционной способностью, широкой субстратной специфичностью и антибактериальной активностью.

В работах B.Gyorgyetal. (2006), N. Tamassietal. (2007), B.N. Jaegeretal. (2012), H.Parkeretal. (2012), Y. Kobayahi (2015), E.S. Harrisetal. (2013), A.A. Тотоляна, И.С. Фрейдлина (2000), N.G. Ionitaetal. (2010), N. Tamasiaetal. (2007), О.Л. Коротиной, И.И. Генералова (2012), Б.Г. Андрюкова и соавт. (2016) отмечено, что при отсутствии очага инфекции неактивные нейтрофилы в основном находятся в состоянии покоя, циркулируя в крови, и составляют большую часть лейкоцитарной фракции. При этом по данным авторов, длительность жизни циркулирующих нейтрофилов в крови составляет от нескольких часов до нескольких дней, их численный гомеостаз поддерживается непрерывным высвобождением зрелых клеток в периферический кровоток из костного мозга, где их содержится около 60% общего числа клеток. Пролиферация, созревание и терминальная дифференцировка гранулоцитарных нейтрофилов – сложные и строго регулируемые процессы, которые контролируются регуляторами транскрипции, факторами роста, интерлейкинами, колониестимулирующими факторами и другими системами кроветворения, под действием которых незрелые клетки – предшественники превращаются в зрелые нейтрофилы. Однако, при появлении воспалительного сигнала от микробных молекул и цитокинов – продуктов – нейтрофилы активируются и быстро, в массовом количестве покидают кровоток, преодолевая барьер из эндотелиальных клеток сосудов, и колонизируют очаг инфекции.

Нарушения нормального функционирования иммунной системы может приводить к различным заболеваниям. Естественно, существуют механизмы, активирующие и подавляющие действия иммунной системы.

По литературным данным, миелоидные супрессорные клетки (МСК) – клетки костного мозга миелоидного происхождения, присутствующие в крови, лимфатических узлах, селезенке, а также в опухоли и в тех тканях, где имеются иммунокомпетентные клетки [11].

У здоровых людей незрелые миелоидные клетки с фенотипом миелоидных супрессоров составляют приблизительно 0,5% от числа мононуклеарных клеток периферической крови. Однако это значение увеличивается в несколько раз при различных заболеваниях. Миелоидные супрессоры включают прямые предшественники дендритных клеток, макрофагов и гранулоцитов. В настоящее время установлено, что МСК образуются в результате изменения дифференцировки гемопоэтического пути, ведущей к накоплению гетерогенной популяции незрелых миелоидных клеток. Миелоидные клетки – предшественники дифференцируются в костном мозге в незрелые миелоидные клетки. На этом этапе клетки покидают костный мозг и выходят в периферическое кровообращение и мигрируют в различные периферические органы, где они подвергаются дифференцировке в зрелые миелоидные клетки, такие как макрофаги, дендритные клетки и гранулоциты. По мнению авторов, в таких условиях, как инфекции, сепсис, травма, либо в микроокружении опухоли дифференцировка незрелых миелоидных клеток в нормальные зрелые миелоидные клетки блокируется, и в то же время незрелые миелоидные клетки могут активироваться и становятся миелоидными супрессорами (T.F. Greten, M.P. Manns, F. Kogangy, 2011). В работе А.В. Пономарева (2016) также отмечается, что мие-

лоидные супрессоры образуются в результате изменения дифференцировки гемопоэтического пути, ведущей к накоплению гетерогенной популяции незрелых миелоидных клеток. В настоящее время охарактеризованы две основных популяции миелоидных супрессоров – моноцитарные и полиморфноядерные или гранулоцитарные.

Дендритные клетки (ДК) выполняют ряд важных функций в качестве элементов врожденного и приобретенного иммунитета. Кроме того, было отмечено, что в естественных условиях ДК индуцируют антигенспецифическую невосприимчивость или толерантность в центральных и периферических лимфоидных органах. В тимусе ДК обеспечивают толерантность с помощью делеции аутореактивных Т-клеток. В периферических лимфоидных органах ДК также индуцируют толерантность к антигенам, захваченным рецепторами, обеспечивающими эффективное поглощение белков и погибающих клеток. После поглощения этими рецепторами, антигены презентуются на поверхности дендритных клеток с помощью главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I и класса II [12, 13]. В стационарном состоянии, при воздействии на рецепторы ДК малыми дозами антигенов, происходит делеция соответствующих Т-клеток, а при повторном воздействии с сильными адъювантами, наступает иммунологическая невосприимчивость. Однако, при одновременном воздействии на ДК стимулами созревания и антигеном, у мышей в лабораторных условиях вырабатывается иммунитет: появляются Т-клетки памяти и эффекторные Т-клетки, секретирующие интерферон- γ . В ходе недавних исследований были получены доказательства того, что ДК играют роль в распространении и дистрибуции Т-клеток, которые в свою очередь регулируют или супрессируют другие иммунные Т-клетки. Существует вероятность, что такое четкое разделение стадий развития и большое разнообразие ДК и Т-клеток обеспечивают различные пути выработки периферической толерантности, такие как супрессия и делеция. Предполагается, что некоторые случаи в клинической практике, включая аутоиммунные заболевания и некоторые инфекционные заболевания, могут быть следствием антигенспецифической толерантной роли ДК (Ralph M. Steinmanetal. (2003)) [14, 15].

По данным YooS., Ha S.J. (2016) дендритные клетки (ДК) являются специализированными антигенпредставляющими клетками (АПК), которые играют ключевую роль в иммунном ответе, являясь связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом.

В настоящее время установлено, что ДК являются неоднородной популяцией, состоящей из различных субпопуляций со специализированными функциями в иммунном ответе на конкретные патогены. При вирусных инфекциях, плазматоидные ДК (pDCs) быстро продуцируют большое количество ИФН, который обладает мощным противовирусным эффектом и активирует несколько типов других иммунных клеток.

В противоположность им, миелоидные ДК (mDCs) являются очень мощными антигенпрезентирующими клетками (АПК) и обладают уникальной способностью праймировать наивные Т-клетки и, следовательно, инициировать первичный адаптивный иммунитет [16, 17, 18].

В обзоре В.Ю. Танеева и соавт. (2016) – регуляция апоптоза в процессе созревания дендритных клеток посвящено описанию изменений про- и антиапоптоической сигнализации под действием стимулов, ассоциированных с этапами функционирования дендритных клеток (ДК). Авторы отмечают, что срок жизни дендритных клеток служит одним из ключевых параметров, определяющих численность этих наиболее активных антигенпрезентирующих клеток. Сокращение срока их жизни коррелирует с иммуносупрессией, тогда как искусственное продление жизни ДК приводит к развитию аутоиммунных реакций.

Вместе с тем, дендритные клетки в работе R.M. Steimman (1991) отнесены к специализированным антигенпрезентирующим клеткам (АПК) иммунной системы. В последующем ряд авторов дендритные клетки разделили на 2 основ-

ные группы: плазмацитоидные и классические, или "обычные". Авторы отмечают, что как плазмацитоидные, так и классические ДК развиваются из костномозговых предшественников миелоидного ряда кроветворения, в частности общего предшественника ДК.

Особая группа классических дендритных клеток – клетки Лангерганса, которые в незрелом состоянии локализованы в эпидермисе кожи. По некоторым данным отличительное свойство клеток Лангерганса – специфическая потребность в цитокинах и самоподдержание их численности в периферических тканях за счет пролиферации [19]. Главным и обязательным механизмом увеличения их численности является созревания в тканях из клеток-предшественников, а роль важнейшего негативного регулятора играет запрограммированная гибель этих относительно короткоживущих клеток по механизму апоптоза [20,21]. Функция дендритных клеток – собирателей антигенного материала, а также их предшественная локализация в потенциальных воротах инфекции и периферических лимфоидных органах существенно повышают риск инфицирования этих клеток внутриклеточными патогенами.

Вместе с тем, моноциты крови также способны дифференцироваться в отдельные субпопуляции классических ДК, особенно в условиях воспаления. Сегодня уже практически всеми учеными мира признается, что основной функцией плазмацитоидных дендритных клеток (ДК) служит продукция интерферонов (ИНФ) I-го типа, тогда как его способность к сбору и презентации антигенов организму у них ограничена и проявляется лишь после стимуляции цитокинами или характерными для микроорганизмов полинуклеотидами. В то же время классические ДК – наиболее эффективные антигенпрезентирующие клетки (АПК) нашего организма [6,14]. Они обладают уникальным жизненным циклом, который позволяет им на стадии так называемых незрелых ДК собирать антигенный материал, а после распознавания молекулярных паттернов патогенов (МПП), маркеров повреждения тканей или индукторов воспаления приобретать способность к презентации антигенов и вовлечению наивных Т-лимфоцитов в иммунный ответ. По месту своей первичной локализации классические дендритные клетки делятся на клетки нелимфоидных тканей, мигрирующие в лимфоидные органы после сбора антигенов, и клетки – резиденты лимфоидных тканей, собирающих антигенный материал, приносимый в лимфатические узлы с лимфой, а в селезенку с кровью [22,23].

Особую сложность вопросу придает способность некоторых вирусов активно подавлять апоптоз зараженной клетки. Эта способность наиболее исследована у вирусов группы герпеса, склонных к длительной персистенции. Для этих вирусов апоптоз клетки-хозяина несет существенную угрозу, поскольку гибель клетки до воспроизведения вирусного потомства предотвращает инфицирование новых клеток [24,25].

Таким образом, основная проблема состоит в том, что апоптоз – неотъемлемая часть системы дендритных клеток, причем как усиление, так и ослабление апоптоза дендритных клеток может вести к патологическим нарушениям работы иммунной системы. Выживание ДК по данным В.Ю. Танеева (2012), В.Ю. Танеева и В.М. Плеханова (2015), В.Ю. Танеева, А.В. Матвейчева и В.М. Плеханова (2015), В.Ю. Танеева и соавт. (2016) постоянно зависит от баланса про – и антиапоптотических внутриклеточных факторов, содержание которых меняется под действием стимулов, ассоциированных с определенными этапами функционирования дендритных клеток. Подробно группы дендритных клеток описаны в специализированных обзорах В.Ю. Танеевым и соавт. (2016).

Список использованной литературы

1. Ульяновкина Т.И. Зарождение иммунологии. - М.: Наука, 1994. 319 с.
2. Ездакова И.Ю. Современное развитие клеточной теории И.И. Мечникова // Труды ВИЭВ, 2015. Том 78. С. 193-199.
3. Петров Р.В., Чередеев А., Ковальчук Л.В. Клиническая иммунология: сегодняшние проблемы и будущие перспективы // Иммунология. 1982. № 6. С. 21.
4. Влияние алкилоксибензолов на поглотительную и секреторную функции нейтрофилов периферической крови человека / Свиридова Т.Г. и др. // Иммунология. 2013. Т. 34. № 2. С. 84-88.
5. Ездакова И.Ю. Рецепторы иммунного узнавания у животных. - М: Компания Спутник+, 2008. 88с.
6. Talayev V.Yu., Matveichev A.V., Plekhanova M.V. Dendritic Cells: Maturation, Migration and Functions. N. Novgorod: Rastr-NN; 2015. (in Russian)
7. Журавлева М.С. Динамика показателей состояния иммунной системы животных и ее оценка // Аллергология и иммунология. 2014. № 4. С. 300-301.
8. Лощинин М.Н., Попова Е.В. Использование нагрузочных тестов для оценки фагоцитарной активности клеток крови животных // Веткорм. 2015. № 1. С. 14-15
9. Гришина Е.Е. Изучение функциональной активности фагоцитов крови животных / Международная н-пр. конференция "Современные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных. 2016. Труды ВИЭВ. Т. 79. С. 190-195
10. Steinman R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity // Annu. Rev. Immunol. 1991. 9. P. 271 - 96.
11. Merad M., Sathe P., Helft J., Miller J., Mortha A. The dendritic cell lineage: Ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting // Annu. Rev. Immunol. 2013. 31. P. 10.
12. Talayev V.Yu. The mechanisms controlling migration of myeloid dendritic cells and langerhans cells // Immunologiya. 2012. 33(2). P. 104-112.
13. Talayev V.Yu., Plekhanova M.V., Zaichenko L.Ye., Babaykina O.N. Effect of vaccines on the expression of chemokine receptors on dendritic cells of newborns and adults in vitro // Immunologiya. 2013. 34(6). P. 318 - 23.
14. Chopin M., Allan R.S., Belz G.T. Transcriptional regulation of dendritic cell diversity. Front. Immunol. 2012. 3. Article 26.
15. Collin M., McGovern N., Haniffa M. Human dendritic cell subsets. // Immunology. 2013. 140. P. 22 - 30.
16. Talayev V.Yu., Plekhanova M.V. Functional specialization of dendritic cell subsets. Uspekhisovremennoy biologii. 2015; 135(6). P. 575.
17. Klechevsky E. Human dendritic cells - stars in the skin // Eur. J. Immunol. 2013. 43. P. 55.
18. Гончарова И.С. Эволюционные аспекты развития иммунной системы у животных // Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел": Сб. науч. тр. - М: ВИЭВ. 2011. С. 249-251.
19. Kaplan D.H., Li M.O., Jenison M.C., Shlomchik W.D., Flavell R.A., Shlomchik M.J. Autocrine/paracrine TGF β 1 is required for the development of epidermal Langerhans cells // J. Exp. Med. 2007. 204. P. 254.
20. Wang Y., Szretter K.J., Vermi W., Gilfillan S., Rossini C., Celia M. et al. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia // Nat. Immunol. 2012. 13. P. 753.
21. Merad M., Manz M.G., Karsunky H., Wagers A., Peters W., Charo I. et al. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions // Nat. Immunol. 2002. 3. P. 1135.
22. Ingulli E., Mondino A., Khoruts A., Jenkins M.K. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells // J. Exp. Med. 1997. 185. P. 2133.
23. Kamath A.T., Henri S., Battye F., Tough D.F., Shortman K. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs // Blood. 2002. 100. P. 1734.
24. Nopora A., Brocker T. Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo // J. Immunol. 2002. 169. P. 3006.
25. Hou W.S., Van Parijs L. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells // Nat. Immunol. 2004. 5. P. 583.

УДК 619:616.937.5

Использование иммунологических маркеров в качестве возможных диагностических ориентиров определения состояния здоровья животных

Ездакова И.Ю. – доктор биологических наук, зав. лабораторией иммунологии

Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.П.Коваленко, 109428, г. Москва, Рязанский проспект, 24/1, e-mail:ezdakova.i@viev.ru

Аннотация. Устойчивые корреляции служат иммунологическими маркерами сбалансированности иммунитета, что позволяет найти не только более точные диагностические ориентиры при проведении профилактических мероприятий, но и дать характеристику общих закономерностей функционирования иммунной системы. Целью исследований являлось определение устойчивых корреляций показателей и преципитирующей активности иммуноглобулинов, а также их использование в качестве иммунологических маркеров состояния здоровья животных. У крупного рогатого скота были установлены устойчивые положительные корреляции между показателями нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и фагоцитарной активности. Полученные результаты подтверждают функциональную связь между количеством фагоцитов и их активностью. Установлено, что разные животные не одинаково реагируют на один и тот же белок кандид следовательно устойчивость Ig к инфекционным агентам индивидуальна и может служить диагностическим маркером иммунореактивности организма животного.

Ключевые слова: маркеры, иммунная система, корреляции, иммуноглобулины, рогатый скот.

Use immunological markers as a possible diagnostic guidelines determination of animal health

Ezdakova I.Yu.

Stable correlations are immunological markers of immunity balance that allows you to find not only a more accurate diagnostic guidelines for performing the preventive measures, but also to characterize the general laws governing the functioning of the immune system. The aim of research was to determine the correlation of stable performance and precipitating activity of immunoglobulins, as well as their use as immunological markers of animal health. In cattle were established stable positive correlation between indicators of neutrophils, monocytes, eosinophils, and phagocytic activity. These results confirm the functional relationship between the number of phagocytes and their activity. Also, the different animals do not react the same way to the same protein Candida hence stability parameters Ig to infectious agents of different etiology may serve as a diagnostic marker immunoreactivity animal.

Key words: markers, immune system, correlation, immunoglobulins, cattle.

С появлением новых и совершенствованием известных иммунологических методов исследования значительно расширяются возможности углубленного и всестороннего изучения здоровья животных. Иммунологические маркеры позволяют совершенствовать диагностику практически любых заболеваний, так как система иммунитета играет важную роль в поддержании физиологических механизмов организма. При различных нагрузках на организм могут возникать изменения и наблюдаться существенные колебания иммунологических показателей, что в ряде случаев ведет к развитию патологий, снижающих эффективность иммунопрофилактических мероприятий. Маркерами состояния иммунной системы могут быть как отдельные белки, так и

группа белков, определяющих фенотип заболевания. При скрининге иммунопатологий у групп животных, оценке поствакцинального иммунного ответа необходимо учитывать сильные устойчивые корреляции, играющие важную роль в нормальном функционировании различных систем организма, так как они показывают сбалансированность работы их компонентов. Наличие сильной отрицательной корреляции лимфоциты-нейтрофилы и положительной между иммуноглобулинами классов М и G, свидетельствует о довольно высоком уровне здоровья, хороших адаптивных возможностях иммунной системы, прогнозе стойкого клинического эффекта при изучении в динамике.

Поэтому устойчивые корреляции служат иммунологическими маркерами сбалансированности иммунитета, что позволяет найти не только более точные диагностические ориентиры при проведении профилактических мероприятий, но и дать характеристику общих закономерностей функционирования иммунной системы [1,2].

Целью исследований было определение устойчивых корреляций показателей иммунного статуса и преципитирующей активности иммуноглобулинов, а также их использование в качестве иммунологических маркеров состояния здоровья животных.

Материалы и методы

Для экспериментальных исследований использовали образцы крови рогатого скота (47 гол.) и метаболиты культур *S.tropicalis* в фазе логарифмического роста. Иммуноглобулины и белки сыворотки крови рогатого скота получали хроматографическими и электрофоретическими методами для получения моноспецифических антисывороток. Фагоцитарная активность определена с помощью частиц латекса по стандартным методикам, уровень иммуноглобулинов методом простой радиальной иммунодиффузии (РИД). При проведении нагрузочного теста (НРИД) образцы сыворотки крови инкубировали с метаболитами *S.tropicalis* в течение 30 мин. при 37°C [3].

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований определена концентрация основных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови рогатого скота и установлены их корреляционные связи с показателями лейкограммы и фагоцитарной активности. Сезонная динамика в направлении от весны к осени сопровождалась увеличением напряженности защитных реакций, развитие адаптационных механизмов в организме осуществлялось на ином уровне регуляции метаболизма, что привело к усилению связей между рядом иммунных показателей и смене их направленности.

Установлены устойчивые корреляции иммунологических показателей и построен корреляционный профиль зна-

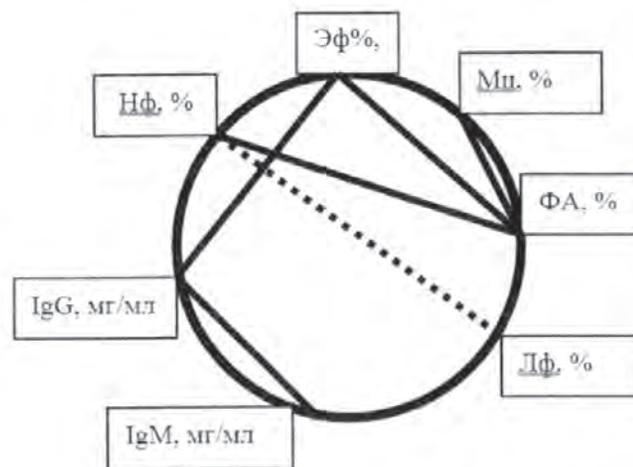


Рисунок. Корреляционный профиль устойчивых взаимосвязей показателей иммунного статуса.

Прим. Нф - нейтрофилы; Эф - эозинофилы; Мц - моноциты; ФА - фагоцитарная активность; Лф - лимфоциты; ——— прямая связь при $p < 0,05$; обратная связь при $p < 0,05$

чимых иммунологических взаимосвязей между показателями. Различия в "рисунке связей" могут свидетельствовать о нестабильности иммунной системы и развитии патологического процесса.

По мнению А.А. Михайленко и др. в иммунной системе существует система стойких прямых и обратных взаимосвязей ее наиболее важных компонентов, которые играют роль своеобразных переключателей реагирования иммунной системы в зависимости от конкретного раздражителя [4]. Представленные данные подтверждают это суждение, так как была выявлена устойчивая отрицательная корреляция между показателями нейтрофилов и лимфоцитов и положительная между концентрацией IgG и IgM (рис.). Также у крупного рогатого скота были установлены устойчивые положительные корреляции между показателями нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и фагоцитарной активности. Полученные результаты подтверждают функциональную связь между количеством фагоцитов и их активностью. Таким образом, устойчивые корреляции могут служить маркерами нормального состояния иммунной системы при исследовании в динамике.

Большинство белков, при участии которых происходит распознавание антигенов, принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов, т.е. Ig являются одними из основных компонентов защиты организма от инфекций [5]. С целью получения большего числа параметров, характеризующих состояние иммунной системы, был разработан нагрузочный метод с метаболитами *S.tropicalis* (белковая фракция 28) на основе реакции простой радиальной иммунодиффузии. При инкубации сыворотки крови с метаболитами кандид, по-видимому, происходит блокировка центров связывания молекулы Ig. Поэтому часть антител не участвовала

в образовании преципитата в реакции антиген-антитело. Как показал эксперимент, индивидуальные параметры нагрузочного теста значительно отличались между собой (от 3,1 мг/мл до 18,0 мг/мл). Следовательно, разные животные не одинаково реагируют на один и тот же антиген, и устойчивость Ig к инфекционным агентам может служить диагностическим маркером иммунореактивности организма.

На основании проведенного исследования, можно заключить, что устойчивые корреляции и показатель преципитирующей активности иммуноглобулинов в нРИД могут рассматриваться как иммунологические маркеры состояния здоровья животных, от которого зависит эффективность иммунопрофилактических мероприятий.

Список литературы

1. Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Захид М. и др. Корреляционный анализ взаимоотношений структур тимуса и крови после использования полиоксидония // Медицина и образование в Сибири, 2012. №2. С.57
2. Ездакова И.Ю., Еремина М.А., Попова Е.В. Мониторинг состояния иммунитета у быков-производителей молочных и мясных пород // Российская сельскохозяйственная наука. 2016. №1. С.42-44
3. Клиническая иммунология и аллергология / Под ред. А.В.Караулова А.В.- М: МИА, 2002.- 651 с.
4. Михайленко А.А. Роль корреляционных взаимосвязей в оценке функциональных возможностей иммунной системы / А.А.Михайленко, Т.А.Федотова // Иммунология.- 2000.-№6.-С.59-61.
5. Heriazon A. Phenotypic and genetic parameters of antibody and delayed-type hypersensitivity responses of lactating Holstein cows / Armando Heriazon, Margaret Quinton, Filippo Miglior et al // Veterinary Immunology and Immunopathology-2013- Vol. 154.-Issues 3-4.-P. 83-92.

УДК 612.017.1:636.234.1

Основные показатели гуморального иммунитета коров голштинской породы

Еремина М.А.¹,
Ездакова И.Ю.² – доктор биологических наук

¹ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К.Эрнста". 142132 Московская область, Подольский район п. Дубровицы, д.60 e-mail: vijinfo@yandex.ru1

²ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.П.Коваленко". 109428 Москва, Рязанский пр-т, д.24, кор.1. e-mail: immsys@mail.ru

Аннотация. В работе исследованы показатели гуморального иммунитета у лактирующих коров голштинской породы в зависимости от сезона года и времени отела. В результате исследований установлено некоторое увеличение удоя коров, отел которых проходил в зимне-весенний период (на 518 кг) по сравнению с животными, отел которых проходил летом-осенью. Обнаружено значительное колебание показателя концентрации IgM в сторону повышения к осени (на 1,89 мг/мл $P < 0,001$) по сравнению с весенним периодом. Не установлено значительных корреляций между данными молочной продуктивности гуморальными факторами иммунитета в зависимости от сезона года. Однако имеется устойчивая отрицательная зависимость между всеми исследуемыми показателями и концентрацией IgG в зимний период.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, коровы, иммуноглобулины, молочная продуктивность, корреляция.

Major Indicators of Humoral Immunity in Holstein Cows

Eryomina M.A., Ezdakoval.Yu.

The indicators of humoral immunity in the Holstein lactating cows have been analyzed depending on the season and calving periods. The results from the survey revealed some (518 kg) increase in the milk production of the cows calved in the winter-spring period, as compared to that in the animals calved in the summer-autumn period. A considerable variation in the indicator of the IgM concentration with a trend to increase the content (by 1.89 mg/mL, $P < 0.001$) in autumn as compared to that in spring was ascertained. No season-dependent significant correlation between the milk production and the humoral factors in the immune system has been found. However, there is a stable negative relationship between all of the analyzed variables and the high IgG levels in the winter period.

Key words: cattle, cows, immunoglobulins, milk production, correlation.

Разведение высокоценных пород крупного рогатого скота молочного направления продуктивности, их совершенствования базируется, главным образом, на глубоких знаниях основных аспектов селекционной работы с ними, постоянном совершенствовании генетической и фенотипической оценки животных. Однако в настоящее время эта оценка затруднена в связи с ранним выбытием коров. Это

может быть вызвано как неоптимальными условиями содержания и кормления, так и возможной заболеваемостью животных, что может быть связано с нарушениями в работе иммунной системы. Поэтому контроль иммунологических показателей, в частности некоторых факторов гуморального иммунитета у коров, наряду с другими аспектами, является необходимым условием получения здорового потомства и продолжительного срока их хозяйственного использования.

В этой связи интерес представляет определение концентрации иммуноглобулинов класса G (IgG), как основного протективного Ig организма, и класса M (IgM), появляющегося на ранних стадиях ответа на инфекцию в зависимости от сезонных факторов.

Ранее нами было отмечено увеличение содержания IgG у первотёлок от первой лактации к третьей [1]. При этом технология содержания животных (привязное и беспривязное) не влияли на уровень IgG в сыворотке крови коров. Установлено лишь увеличение данного показателя в летний период по сравнению с зимним [2].

В связи с полученными ранее данными в настоящей работе изучены особенности гуморального иммунитета у лактирующих коров.

Целью нашей работы явилось исследование некоторых гуморальных звеньев иммунитета и продуктивных показателей коров чёрно-пёстрой голштинизированной породы.

В задачи исследований входило:

- изучение молочной продуктивности животных, воспроизводительных качеств;
- определение концентрации IgG и IgM у коров чёрно-пёстрой голштинизированной породы в зависимости от сезонных факторов.

Таблица 1. Показатели молочной продуктивности и воспроизводительных качеств коров

Показатели	Зима-Весна	Лето-Осень
Число животных, гол.	20	40
Удой, кг	6549,2±345,4	6031±136,6
Массовая доля жира, %	4,34±0,10	4,23±0,06
Массовая доля белка, %	266,1±18,5	255,8±6,94
Молочный жир, кг	3,31±0,05	3,31±0,06
Молочный белок, кг	201,6±10,5	196,4±4,14
Сервис-период, дн.	186,2±25,1	194,4±22,8

Таблица 2. Показатели гуморального иммунитета в разные сезонные периоды

Показатели	Сезон года		
	Зима	Весна	Осень
Число животных, гол.	22	57	16
IgG, мг/мл	24,49±0,55	27,14±0,48	27,75±1,13
Число животных, гол.	20	20	20
IgM, мг/мл	1,29±0,19	2,08±1,09	3,18±0,19 ^{***}

Таблица 3. Показатели корреляции между исследуемыми признаками

Сезон года	Весна	Осень	Зима
Число животных	36	15	39
IgG/удой	-0,17595	-0,09601	-0,22955
IgG/жир	0,098047	0,2476293	-0,32175
IgG/белок	-0,03794	0,11523	-0,0218
IgG/сервис-период	-0,06863	-0,13873	-0,02532
Число животных	20	15	-
IgM/удой	-0,24688	-0,0309	-
IgM/жир	-0,21225	0,19409	-
IgM/белок	0,116605	-0,0467	-
IgM/сервис-период	0,087245	-0,2614	-

Материалы и методы

Исследования проведены в период с 2011 по 2016 годы в ФГУП Э/Х "Клёново-Чегодаево", (г. Москва) на коровах чёрно-пёстрой голштинизированной породы. Животные находились на двух фермах с привязным и беспривязным содержанием. В период исследований были изучены показатели молочной продуктивности животных, воспроизводительные качества. Весной, осенью и зимой у коров были взяты образцы сыворотки крови для определения IgG и IgM. Установлены корреляционные закономерности между удоём, качественными показателями молока и концентрацией IgG за лактацию.

Для количественного определения IgG и IgM использован метод простой радиальной иммунодиффузии [3]. Иммунологические исследования проведены в лаборатории иммунологии ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П.Коваленко".

Полученные данные обработаны при помощи компьютерной программы "Excel".

Результаты исследований. Исследования молочной продуктивности за первую лактацию коров в зависимости от сезона отела показали, что удои коров, отелившихся зимой-весной, имел тенденцию к повышению (на 518 кг) по сравнению с животными, отел которых проходил летом-осенью. Остальные данные не имели существенных отличий между собой (таблица 1).

Изучение гуморальных факторов иммунитета животных показало, что концентрация IgG и IgM в сыворотке крови имела различия по сезонам года и повышалась от зимы к осени (таблица 2). Установлено значительное колебание показателя концентрации IgM в сторону повышения к осени (на 1,89 мг/мл $P \leq 0,001$).

В результате изучения корреляционных взаимосвязей (r) не установлено значительных корреляций между данными молочной продуктивности гуморальными факторами иммунитета в зависимости от сезона года. Однако, имеется устойчивая отрицательная зависимость между всеми исследуемыми показателями и концентрацией IgG в зимний период.

Вывод

В результате исследований установлена тенденция повышения (на 518 кг) молочной продуктивности коров, отелы которых проходили зимой-весной по сравнению с животными, отел которых проходил летом-осенью. При этом показатель концентрации IgG и IgM в сыворотке крови различался по сезонам года, повышаясь от зимы к осени. Особенно заметные колебания установлены по показателю концентрации IgM в сторону повышения к осени (на 1,89 мг/мл $P \leq 0,001$). Имеется незначительная, но устойчивая отрицательная зависимость между всеми исследуемыми показателями и концентрацией IgG в зимний период.

Список литературы

1. Еремина М.А., Ездакова И.Ю., Попов Н.А., Лизпа В.Л. Уровень основных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови коров-первотёлок при разных способах содержания и происхождения. // Доклады РАСХН. 2013. № 2. С. 46-48.
2. Еремина М.А., Ездакова И.Ю., Лизпа В.Л. Продуктивные показатели и уровень протективных антител коров черно-пестрой породы в период лактации // Молочное и мясное скотоводство, 2016. - № 5. - С. 28-29.
3. Иммунологические методы / Под ред. Х.Фримеля. - М: Мир, 1979. 518 с.

УДК 619:616.98:579.843.95:639.3.091

Иммуноферментный анализ в диагностике вирусной геморрагической септицемии лососевых рыб (VHS)

Завьялова Е.А. – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией ихтиопатологии, e-mail: aquazeda@mail.ru

Дрошнев А.Е. – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории ихтиопатологии, e-mail: asdf1961@yandex.ru

Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.П.Коваленко (ФГБНУ ВИЭВ), 109428, Россия, Москва, Рязанский проспект, д.24, к.1

Аннотация. Вирусная геморрагическая септицемия лососевых рыб (VHS), вызываемая рабдовирусом, одна из наиболее серьезных проблем лососеводства. В России утвержденным диагностическим методом является вирусное выделение в чувствительных культурах клеток. В представленном исследовании показаны результаты разработки диагностического теста для выявления VHSV методом ИФА. Разработанный тест дополняет спектр диагностических методов и позволяет уточнять спорные результаты, полученные классическими методами. Результаты, полученные в ходе исследования, коррелировали с данными, полученными другими методами: в ИФА, в реакции нейтрализации, методом электронной микроскопии.

Ключевые слова: диагностика, вирусная геморрагическая септицемия лососевых рыб (VHS), аквакультура.

ELISA – based diagnostics for VHS

Zavyalova E. A., Droshnev A. E.

Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) caused by virus of Rhabdoviridae family, as one of the most important loss factors in salmonid aquaculture. In the Russian Federation the approved diagnostic method for determination of VHSV antigen is virus isolation on sensitive cells cultures. The present paper gives the results of developing a diagnostic test to reveal VHSV by ELISA. The developed test supplement a battery of diagnostic methods and specify some disputable results obtained with classical methods. The data received during research, correlated with the data received by other methods such as PCR, the reaction of the neutralization and method of the electronic microscopy.

Key words: viral haemorrhagic septicaemia (VHS), aquaculture.

Введение

Стратегической целью развития аквакультуры России является обеспечение национальной продовольственной безопасности страны, в том числе удовлетворение спроса внутреннего рынка на рыбные товары, а также социально-экономическое развитие регионов географически связанных с большим количеством водоемов. Учитывая основополагающую роль рыбохозяйственного комплекса в решении продовольственной проблемы государство обеспечивает приоритетные условия для его развития. Однако, ряд объективных причин сдерживает наращивание объемов выращивания и воспроизводства гидробионтов, одна из них – болезни. Длительное время в диагностике вирусных болезней человека и животных используется иммуноферментный анализ (ИФА), который в ихтиопатологии, к сожалению, распространен пока недостаточно. Главными достоинствами метода являются высокая чувствительность и специфичность, коррелирующие с результатами, полученными при использовании других методов, а также широкое распространение специального оборудования, позволяющего почти полностью автоматизировать процесс выявления возбудителя, при этом исключив субъективные факторы. Поэтому основным направлением применения ИФА является диагностика инфекционных болезней в ходе проведения массовых эпизоотологических обследований.

Вирусная геморрагическая септицемия (Viral haemorrhagic septicaemia, VHS) – острая вирусная болезнь,

поражающая пресноводных и морских рыб. Возбудителем болезни является РНК-содержащий вирус (VHSV) [9], принадлежащий к недавно одобренному роду *Novirhabdovirus*, семейства *Rhabdoviridae*, со спиральной симметрией, имеющий пальцевидную форму размером 180–240 x 60–75 нм. Его цилиндрические частицы имеют один закругленный, а другой плоский или слегка вогнутый внутрь концы. Вирион содержит геном отрицательной полярности длиной приблизительно 11000 нуклеотидов. В геноме расположены шесть генов, кодирующих неструктурный белок (NV) и пять структурных белков: нуклеокапсидный белок (N), фосфопротеин (P), матричный белок (M), гликопротеин (G), и РНК-полимеразу [8]. В реакции нейтрализации с использованием моно- и поликлональных антител изоляты делятся на три серогруппы. Кроме того, имеет общие антигенные детерминанты с вирусом весенней виремии карпа (SVCV), инфекционного гемопоэтического некроза (IHNV) и рабдовирусом мальков щуки. В настоящее время VHS в основном распространена на территории США и Канады, регистрируется в Дании, Финляндии, Норвегии, Швеции, странах Балтии, Абхазии, на Украине, описаны случаи выявления болезни и у рыб диких популяций в России [3]. Лабораторная диагностика VHS в рыбоводческих хозяйствах за рубежом, регламентируется правилами Международного Эпизоотического Бюро (МЭБ), основана на выделении вируса в культурах клеток и идентификации его в серологических реакциях, таких как реакция нейтрализации, иммуноферментный анализ, реакция иммунофлуоресценции, ПЦР. [10].

На отечественном рынке ветеринарных препаратов в настоящее время отсутствуют диагностикумы, сочетающие невысокую стоимость анализа, простоту в использовании, а, главное, высокую чувствительность. Ранее авторами разработаны наборы для диагностики наиболее распространенных заболеваний лососевых рыб: инфекционного некроза поджелудочной железы (IPN) [5], инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHN) [2], йерсиниоза (ERM) [4] лососевых рыб.

Цель настоящего исследования – применить отработанные приемы и создать диагностикум для выявления возбудителя вирусной геморрагической септицемии лососевых рыб (VHS) методом ИФА.

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали очищенный и концентрированный антиген VHSV штамм S7/10 – выделенный в 2010 году от молоди кумжи и озерного лосося, выловленных в одном из водоемов Северо-Западного региона страны.

Антитела для сенсibilизации планшетов. Для сенсibilизации планшетов использовали вирусоспецифические кроличьи антитела против VHSV штамм S7/10, полученные в нашей лаборатории по разработанной ранее схеме [6].

IgG из иммунных сывороток выделяли высаливанием раствором сернокислого аммония с последующей гель-фильтрацией и ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе с измерением концентрации белка [1,7].

Конъюгат специфических антител. Конъюгирование фермента с иммуноглобулинами проводили ковалентным способом, для введения фермента в молекулы антител использовали периодат натрия по методике Wilson и др. В качестве ферментативной метки использовалась пероксидаза хрена (ПХ) RZ>3,1. [12].

Неспецифические компоненты: субстрат – ТМБ (тетраметилбензидин), "стоп-раствор" – 2М серная кислота, отмывочный буфер ФСБ-Т (фосфатно-солевой буфер с твином pH 7.4-7.6).

Позитивный и негативный порог (ПНП) реакции рассчитывали по стандартной методике D.B. Snyder [11]. Сумма среднего значения и двух стандартных отклонений являлась верхней границей отрицательных значений, а сумма среднего значения и трёх стандартных отклонений - нижней границей положительных значений. Реакцию нейтрализации ставили микрометодом в 96-луночных панелях по стандартной методике с серийными десятикратными разведениями вирусосодержащей суспензии от 10^{-1} до 10^{-9} и постоянной концентрацией сыворотки 1:100. В качестве испытуе-

мого материала использовали культуральные вирусы VHSV из коллекции лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ.

Отрицательным контролем служили интактные культуры клеток, гетерологичные вирусы: IHNV – инфекционного некроза гемопоэтической ткани, IPNV – инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых, образцы тканей лососевых и других видов рыб, свободные от VHSV.

Результаты и обсуждение

Для создания тест-системы методом "шахматного" титрования подбирали концентрацию специфических IgG и рабочее разведение конъюгата. Для оптимизации реакции, увеличения точности и чувствительности метода определяли оптимальный диапазон оптической плотности, оптимальное рабочее разведение вирусспецифических антител, при котором наблюдалась максимальная разница между средними значениями оптической плотности положительных и отрицательных контролей, а также диагностические характеристики метода.

Для определения концентрации антител, сенсibilизированных на планшеты, их титровали с положительными и отрицательными контролями. Разведения антител, начиная с концентрации 100 мкг/мл с шагом 10, адсорбировали в лунках планшет в течение 18 ч при 4°C. В пятикратно отмытые ФСБ-Т и высушенные планшеты добавляли по 100 мкл положительных и отрицательных образцов, планшеты инкубировали 1 час при комнатной температуре (20–22°C), после чего промывали. Добавляли конъюгат в предварительно подобранном для данной партии разведении (1:35000), в объеме 100 мкл на лунку, инкубировали, промывали. Реакцию проявляли субстратным раствором ТМБ 25 минут, и, после остановки 2М серной кислотой, измеряли значения оптической плотности при длине волны 450 нм.

Оптимальное разведение антигена, обеспечивающее достоверное различие результатов с положительными и контрольными образцами составило 30 мкг/мл.

Для определения ПНП реакции в ИФА тестировали 100 заведомо отрицательных образцов. Значение стандартного отклонения не превышало 0,016 о.е., что свидетельствует о хорошей воспроизводимости результатов. Рассчитывали среднее значение оптической плотности образцов, которое составило – 0,290 о.е. и прибавляли удвоенное значение стандартного отклонения – 0,016 о.е. ПНП, представленный в виде прямой, отражал верхнюю границу отрицательных величин – 0,322 о.е., а оптическая плотность, соответствующая наименьшему положительному значению равнялась 0,711 о.е.

В тесте на воспроизводимость определяли статистические характеристики для положительных и отрицательных контрольных препаратов при исследовании их в пяти повторностях. Реакция тест-системы с препаратами IHNV, IPNV и неинфицированными клетками и тканями была на уровне фона. При этом, среди лунок на планшете коэффициент вариации составил не более 4%, между отдельными

планшетами не превышал 5,5%, что свидетельствует о высокой чувствительности и специфичности данного метода.

Сравнительная оценка обнаружения VHSV антигена методами ИФА, РН и полимеразной цепной реакции (ПЦР) представлена в таблице 1. Результаты, приведенные в таблице, показывают, что при сравнительном исследовании материала на наличие вируса VHSV отмечена корреляция показателей. Однако, при исследовании в реакции РН гомогенизированных органов форели результат был получен через 10 дней, одновременно с выделением вируса в культуре клеток. При исследовании положительных образцов методом ПЦР во всех случаях был обнаружен VHSV, в пробах отрицательных по результатам ИФА и РН вирус не обнаруживали. Полученные данные подтверждают специфичность испытанных реакций.

Выводы

В результате проведенных исследований нами была разработана тест-система на основе твердофазного "сэндвич" варианта ИФА для определения антигена VHSV в инфицированных культурах клеток и в гомогенатах тканей рыб, показана возможность применения метода для быстрого выявления вируса при диагностических исследованиях.

Список литературы

1. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика - М.: Изд-во "Мир", 1991. - 545с.
2. Завьялова Е.А. Иммуноферментный анализ - инновационный метод диагностики инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб (IHNV) в России / Инновации в сельском хозяйстве, №1 (16), 2016, с.255-259
3. Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Кандрин Н.Ю., Калинина Н.Р. Выделение возбудителя вирусной геморрагической септицемии лососевых от рыб в естественных водоемах // Сборник материалов: Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел. Международная научно-практическая конференция, посвященная 50-летию со дня основания лаборатории лейкозоологии, лаборатории ихтиопатологии и отдела охраны полезной энтомофауны, 2011, с.75-77
4. Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Карпова М.А., Богданова П.Д. Новый метод диагностики йерсиниоза лососевых рыб на основе иммуноферментного анализа (ИФА) // Сборник материалов 4-й Международной конференции "Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов", г.Борок, 24-27 сентября 2015 года, с. 144-149
5. Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Карпова М.А., Гулюкин М.И. Разработка тест-системы для выявления вируса возбудителя инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV) иммуноферментным методом / Материалы международной научно-практической конференции "Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК" Щелково, 2012, с.165-171
6. Завьялова Е.А., Карпова М.А., Дрошнев А.Е., Гулюкин М.И. Экспериментальное обоснование схемы иммунизации кроликов для получения антисыворотки против вируса-возбудителя инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV). Ветеринария и кормление, №3, 2012, с.42-43
7. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой - М.: Изд-во МГУ, 1989. - 508с.
8. Einer-Jensen K., Bjorkland H., Oreshkova S., Shchelcunov I., Vesely T., Lorensen N., Section 3: Workshop Detection and typing of fish viruses. - Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., - 2002, Vol. 22, №2., p.158-165
9. Jensen M.H. Research on the virus of Egtved disease. //Ann. N.Y. Acad. Sci., 1965, 126, 422-426.
10. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. - OIE. - 2016
11. Van der Marel P., Snyder D.B., Lutticken D. Antigenic characterization of IBVD field isolates by their reactivity with a panel of monoclonal antibodies // Dtsch.tierarztl. Wschr. 1990. - Bd. 97. - S. 81-83.
12. Wilson M.B., Nakane P.K. Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. Biomedical press; 1978: 215-244.

Таблица 1. Выявление антигена VHSV методами ИФА, РН и ПЦР

Испытуемый материал	ОП в ИФА (о.е.)	Результат ИФА	Результат РН	Результат ПЦР
1 VHSV шт. S7/10	1,397	+	+	+
2 VHSV шт. ChF 1.2 (референсный для России, год выделения 1981)	1,322	+	+	+
3 VHSV шт. DK9695303 (Дания, 1960 год)	1,011	+	+	+
4 IHNV шт. «Балтика-12»	0,245	-	-	-
5 IPNV шт. Ab (референсный)	0,193	-	-	-
6 Гомогенат внутренних органов форели	0,209	-	-	-
7 Гомогенат внутренних органов карпа	0,177	-	-	-
8 Гомогенат внутренних органов форели, зараженной VHSV	1,205	+	+	+
9 <i>Yersinia ruckeri</i> шт. RMS10-7/3	0,190	-	-	-
10 Культура клеток RTG-2	0,277	-	-	-
11 Культура клеток OMG	0,262	-	-	-

№1 – рабочий образец, пассирующий в культуре клеток RTG-2; №2 гомологичный вирус после пассажа в культуре клеток, нативный; №3 гомологичный вирус, хранившийся в лиофилизированном виде; №4-5 – гетерологичные вирусы, после пассажа в культуре клеток, нативные; №6-7 – пробы внутренних органов разных видов рыб, интактные; №8 – пробы внутренних органов рыб экспериментально зараженных VHSV в условиях аквариальной; №9 – суспензия бактериальных клеток; №10-11 неинфицированные культуры клеток.

УДК 615.371: 615.015.33

Разработка вакцины на основе протективного антигена бруцелл

¹Искандаров М.И., доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник, m-iskandarov@mail.ru

¹Федоров А.И., кандидат биологических наук, заведующий лабораторией;

¹Искандарова С.С., научный сотрудник;

¹Альбертян М.П., доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий сектором хронических инфекций;

²Слепцов Е.С., доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник;

²Винокуров Н.В. кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник.

¹Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.П.Коваленко (ФГБНУ ВНИИЭВ им. Я.П. Коваленко), 109428, г. Москва, Рязанский проспект, 24/1,

²ФГБНУ Якутский НИИСХ

Аннотация. В настоящее время для профилактики бруцеллеза животных используют преимущественно живые вакцины. Эффективность таких вакцин проверенный временем факт. Однако живые вакцины обладают многими недостатками. Они могут вызывать аборт у привитых животных, некоторые вакцинные штаммы мигрируют на непривитых животных, представляют эпидемиологическую опасность. Кроме того, возникает проблема поствакцинальных антител, затрудняющая дифференциальную диагностику иммунизированных и больных животных. Исходя из экологических соображений, пора отказаться от живых вакцин и перейти на вакцины, сконструированные из протективных антигенов бруцелл. Сотрудниками ФГБНУ ВНИИЭВ имени Я.П. Коваленко выполнена определенная работа по созданию вакцин нового поколения. Основываясь на современных данных о механизме патогенеза при бруцеллезе, на протяжении ряда лет проведена серия экспериментов по конструированию вакцин, иммунизирующим компонентом которой является фактор вирулентности, выделенный из бруцелл в результате кислотного, оксидативного и теплового стресса. Для повышения иммуногенности протективный антиген использовали с полимерными и корпускулярными носителями, а также с иммуномодуляторами различного происхождения. Для стимуляции производства супероксидных и гидроксильных радикалов и фермента - супероксиддисмутазы, вводили в состав препарата металлы в ионной и высокодисперсной форме. Стабилизацию иммунизирующего препарата от негативного воздействия протеолитических ферментов проводили с помощью цитрата натрия. Полученный препарат при оптимальной дозировке действующего вещества проявлял иммуногенность сравнимую с иммуногенностью живых вакцин.

Ключевые слова: бруцеллез, вакцина, протективный антиген.

The development of a vaccine based on protective antigen of Brucella

Iskandarov M.I., Fedorov A.I., Iskandarova S.S., Albertyan M.P., Sleptsov E.S., Vinokurov N.V.

Nowadays time-proved live vaccines are predominantly used to prevent animal brucellosis. However, these vaccines have many limitations. They can provoke abortions in vaccinated animals, some vaccine strains are able to migrate to unvaccinated animals. They are also potentially epidemiologically dangerous. Moreover, there is a problem of postvaccinal antibodies which hinder differential diagnosis of immunized and sick animals.

On the basis of environmental considerations, we consider that it is time to abandon live vaccines and use instead vaccines constructed from protective antigens of Brucella.

A significant research concerning the creation of new-generation vaccines was performed by scientists of Kovalenko All-Russia Research Institute of Veterinary Medicine. Based on current data of the mechanism of brucellosis pathogenesis, a

series of experiments to design vaccines, whose immunizing component would be a virulence factor isolated from Brucella exposed to acid, oxidative and thermal stress, was conducted. To enhance the immunogenicity protective antigen was used with polymer and particulate carriers, as well as various immunomodifiers. In order to stimulate the production of superoxide and hydroxyl radicals, as well as superoxide dismutase enzyme, metals in ionic and fine form were injected. Sodium citrate was used to protect the immunizing material from the negative effects of proteolytic enzymes. The resulting product with optimal dosage of active substance exhibited immunogenic properties comparable with the immunogenicity of live vaccines.

Key words: postvaccinal antibodies, Brucella, vaccines.

Эффективность живых вакцин против бруцеллеза проверенный временем факт. Однако в их отношении имеется много нареканий в плане abortогенности, эпидемиологической опасности, мутации и, как следствие, изменения свойств. В частности, много нареканий к вакцине из штамма 82 B. abortus. Исследователями и практикующими врачами отмечается abortогенность этой вакцины, возможность миграции вакцинного штамма на не привитых животных, нестабильность свойств разных серий вакцины. Имеются сообщения об abortогенности и эпидемиологической опасности вакцин из штаммов 19 B. abortus, Rev-1 B. melitensis и даже новой, американской вакцины RB 51[4, 8].

Неживые вакцины лишены практически всех обозначенных недостатков, а слабую иммуногенность разработчики вакцин пытаются компенсировать многими методами, в частности повышением антигенной нагрузки, увеличением кратности и сокращением сроков между ревакцинациями, применением депонирующих адъювантов, различного рода стимуляторов иммунного ответа и др. [6].

При разработке противобруцеллезных вакцин на основе того или иного антигена необходимо учитывать механизмы патогенеза заболевания. В процессе эволюции бруцеллы приспособились выживать внутри макроорганизма выработав ряд так называемых факторов патогенности, которые способствуют проникновению возбудителя через эпителиальный барьер; сохранению жизнеспособности внутри клетки за счет незавершенного фагоцитоза, повышению устойчивости к воздействию специфической и неспецифической систем иммунитета [7, 8].

Липополисахаридный (ЛПС) компонент клеточной стенки S- форм бруцелл играет существенную роль во внутриклеточном выживании, так как гладкие (S) организмы по сравнению с шероховатыми (R), выживают лучше. По сравнению с энтеробактериальными ЛПС, S-ЛПС бруцелл имеет относительно низкую токсичность для эндотоксин-чувствительных мышей, кроликов, и куриных эмбрионов, низкую токсичность для макрофагов и относительно слабое влияние на температурную регуляцию организма. Липополисахаридный антиген бруцелл слабо индуцируют интерферон и фактор некроза опухоли, но являются сильным индуктором интерлейкина 12 (IL-12) [10].

В экспериментах с моноклональными и поликлональными антителами S-ЛПС бруцелл представляет собой главный антиген, отвечающий за пассивный иммунитет. Однако индуцированный протективный эффект в этом случае незначительный. Являясь сильным антигеном ЛПС маскирует более слабые в антигенном отношении антигены являющимися важными факторами в выживании бруцелл внутри клетки. Так как лизис бруцелл в первую очередь зависит от активации макрофагов и требует развития Th1 типа клеточно-опосредованного ответа к антигенам бруцелл [1, 3].

Решающим фактором вирулентности бруцелл, по мнению ряда авторов, является синтезируемый ими аденин и гуанин монофосфат, которые тормозят фаголизосомное слияние в макрофагах; дегрануляцию (экзоцитоз) фагоцитов и активацию миелопероксидазной системы, а также производство фактора некроза опухоли [7, 9].

По мнению других авторов, выживание бруцелл в макрофагах обусловлено синтезом белков молекулярного веса 17, 24, 28, 60, и 62 kda. Белок - с молекулярным весом 24 kda коррелирует с выживанием бактерий при кислых условиях (pH < 4). Белки имеющие молекулярную массу 17 и 28 kda,

специфически индуцируются макрофагами и обуславливаются внутриклеточное выживание бруцелл [2, 5].

В последнее время интерес исследователей к состоянию стресса у бактерий возрос. Практический интерес к стрессу у патогенных бактерий определяется тем, что стрессорные белки могут рассматриваться как кандидаты вакцин нового поколения. Есть много факторов, способных вызывать состояние стресса у бактерий. К наиболее известным относятся физические (температурные, радиационные и т.д.), физико-химические (рН, pO_2 , pCO_2), биологические (бактериофаги, бактериальные токсины и др.). При воздействии стрессорных факторов бактерии начинают усиленно синтезировать полимеры клеточной стенки, происходят изменения в липидном составе мембран, синтез протекторных соединений (углеводов, аминокислот и др.) [1, 8].

Наиболее известными являются так называемые белки теплового шока, появляющиеся под воздействием повышенной температуры. Белки теплового шока могут действовать как факторы вирулентности [7, 9]. Кислый рН - один из стрессоров, наиболее часто встречающихся в микробных системах. При этом стрессе происходят многочисленные изменения в экспрессии различных белков и многие события на уровне генной регуляции: хромосомные локусы, ответственные за чувствительность и устойчивость к стрессам, вирулентность и др.

Оксидативный стресс у бактерий вызывает синтез дополнительных белков - ферментов, а также низкомолекулярных компонентов, исполняющих роль фактора патогенности [2, 9]. Описаны эффективные механизмы защиты бактерий от оксидативных повреждений на уровне генома.

Основываясь на изложенных данных о механизме патогенеза при бруцеллезе, нами на протяжении ряда лет проведена серия экспериментов по конструированию вакцин, иммунизирующим компонентом которой является фактор вирулентности, выделенный из бруцелл в результате кислотного, оксидативного и теплового стресса. Бакмассу бруцелл после экспозиции в "стрессирующих" условиях удаляли путем центрифугирования. Из супернатанта выделяли антиген, хроматографически очищали от примесей и использовали в качестве протективного антигена для конструирования бруцеллезных вакцин.

Протективный антиген, полученный таким методом, имел молекулярную массу не более 30 kda, не обладал антигенными свойствами, выявляемыми общепринятыми методами диагностики бруцеллеза. При определении биохимического состава этого антигена установили, что он состоит из полисахаридов (25%), фолинположительных веществ (около 10%), нуклеотидов (6%). Не выявили различия в содержании сахаров, первичных аминокислот и УФ - спектра у антигена, полученного из штамма 19 V. abortus и 54 V. abortus. В тоже время в составе антигена, выделенного из вирулентного штамма, определяли большее содержание белковой и нуклеотидной фракций. Для повышения иммуногенности протективный антиген использовали с полимерными и корпускулярными носителями, а также с иммуномодуляторами различного происхождения. Для стимуляции производства супероксидных и гидроксильных радикалов и фермента - супероксиддисмутазы, вводили в состав препарата металлы в ионной и высокодисперсной форме. Стабилизацию иммунизирующего препарата от негативного воздействия протеолитических ферментов проводили с помощью цитрата натрия.

Изучение иммунизирующих свойств различных серий препарата выявило некоторые особенности. Так, протективный антиген, выделенный из вирулентного штамма, почти в 1000 раз превышает иммуногенность антигена, полученного из вакцинного штамма. Однако, пока не установлено, качественная или количественная характеристика лежит в основе отличия иммуногенных свойств протективных антигенов из вакцинных и вирулентных штаммов. По предварительным данным, биохимический состав и количество действующего вещества в иммунизирующих препаратах, изготовленных из вирулентных и вакцинных штаммов примерно одинаково, вместе с тем иммуногенные свойства существенно различаются.

Иммуногенные свойства препаратов из протективного

антигена имеют свои особенности. На примере живых бруцеллезных вакцин из штаммов V. abortus 19, 104-M и V. melitensis Rev-1 известно, что разница в дозе вакцин в сотни и более раз существенно не сказывается на напряженности иммунитета. Превышение определенной пороговой дозы разработанного нами препарата не только не увеличивает иммуногенные свойства, но вызывает состояние "иммунного паралича". У морских свинок, получивших "надпороговую" дозу препарата, искусственное заражение с целью проверки иммунитета вызывает бурную реакцию на месте введения бруцелл заражающего штамма (феномен Артюса). В паренхиматозных органах и лимфатических узлах отмечали ярко выраженные патологоанатомические изменения. Бруцеллы заражающего штамма высевали практически из всех органов и лимфатических узлов. Индекс инфицированности в 2-3 раза превышает аналогичные показатели у контрольных животных.

Введение "надпороговой" дозы протективного антигена у белых мышей угнетал синтез антител на введение чужеродного антигена и гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ). При этом угнетение иммунной системы не носило специфического характера. Так, у подопытных белых мышей подкожное введение культуры стафилококка вызывало 100%-ную гибель, тогда как у контрольных животных - в худшем случае местный некроз кожи. После детоксикации протективного антигена формалином по аналогии получения "анатоксина" из грамположительных бактерий для получения, выраженного протективного эффекта требовалось повышение дозировки вводимого антигена в 4-10 раз. При использовании для иммунизации животных детоксигированного антигена значительно снижался дозо-зависимый эффект. Таким образом, протективный антиген можно считать типичным фактором патогенности "эндотоксином" и может использоваться в качестве специфической части разрабатываемых противобруцеллезных вакцин. Однако "широта" применения доз от эффективной до токсичной, крайне мала и существует реальная опасность передозировки с негативными последствиями. Полученный нами препарат при оптимальной дозировке действующего вещества проявлял иммуногенность сравнимую с иммуногенностью живых вакцин.

Список литературы

1. Albertian, M.P. Brucellosis vaccines: past, present and future / M.P. Albertian, A.I. Fedorov, M.I. Iskandarov // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2006. № 4. С. 8-11.
2. Баснакьян, И.А. Стресс у бактерий / И.А. Баснакьян // М.: Медицина, 2003. -135 с.
3. Гулюкин, М.И. Конструирование слабоагглютиногенных вакцин против бруцеллеза / М.И. Гулюкин, М.П. Альбертян, М.И. Искадаров, А.И. Федоров // В книге: Бруцеллез - пограничная инфекция животных и человека, требующая общих усилий разных стран. - 2008. -С. 15-16.
4. Гулюкин, М.И. Эффективность вакцинопрофилактики бруцеллеза животных в России / М.И. Гулюкин, М.П. Альбертян, М.И. Искадаров, А.И. Федоров, В.Н. Боровой, С.А. Коломыцев // Ветеринария. -2008. -№ 9. -С. 7-13
5. Значение гуморального и клеточного иммунитета при бруцеллезе / А.И. Федоров, М.И. Искадаров, П.Е. Игнатов, М.П. Альбертян, С.С. Нестреляев, А.В. Некрасов, Р.М. Хаитов, Р.В. Петров. // Физиология и патология иммунной системы. 2006. Т. 10. № 8. С. 3-7.
6. Игнатов, П.Е. Сравнительное изучение иммуностимуляторов различного происхождения / П.Е. Игнатов, Н.И. Блинов, Ю.Э. Кириш, М.И. Искадаров. // Ветеринария. -1983. -№ 9. -С. 30-31.
7. Изучение иммунобиологических свойств антиген-полимерной вакцины против бруцеллеза / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов, А.В. Некрасов, Н.Г. Пучкова, А.С. Иванова, А.И. Федоров, М.И. Искадаров, М.П. Альбертян. // Физиология и патология иммунной системы. 2006. Т. 10. № 9. С. 9-13.
8. Искадаров, М.И. Бруцеллез животных в России: эпизоотологические особенности и совершенствование специфической профилактики / М.И. Искадаров // Автореф. дисс. док. вет. наук. - Москва, 2012.
9. Федоров А.И. Изучение антигена, провоцирующего скрытые формы бруцеллезной инфекции / А.И. Федоров, М.И. Искадаров, М.П. Альбертян. // Ветеринария. -2007. -№ 6. -С. 23-25.
10. Caron E. Live Brucella spp. fail to induce tumour necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes / Caron E, Peyrard T, Kohler S, Cabane S, Liautard J-P, Dornand J // Infect. Immun. -1994. -V.62. -P. 5267-74.

УДК 619:616.98:579.852.13

Способы контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против инфекционных болезней крупного рогатого скота, вызванных различными видами бактерий рода *Clostridium* spp

Капустин А.В. – кандидат ветеринарных наук

ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко", Рязанский проспект 24 к.1. 109428 Москва, Россия, +7(495)739-99-05, E-mail: kapustin_andrei@mail.ru

Аннотация. Контроль производимых на территории Российской Федерации биопрепаратов, используемых в качестве средств специфической профилактики инфекционных болезней животных, подразумевает необходимость выполнения целого ряда испытаний по различным показателям, основным из которых стоит считать определение иммуногенности. В случае если исследуемый препарат является ассоциированным то имеется необходимость контроля иммуногенной активности каждого антигена входящего в состав вакцины, при этом, существующие методы его контроля являются весьма затратными и низкокэффетивными, так как не позволяют использовать лабораторных животных в качестве биологической модели. Ярким примером такой ситуации являются биопрепараты против клостридиозов животных. В данной работе приведены способы определения иммуногенной активности ассоциированных препаратов против клостридиозов крупного рогатого скота с использованием принципиально нового подхода позволяющего снизить экономические затраты на проведение исследования.

Ключевые слова: Иммуногенность, иммунитет, токсины, бактерины, биопрепараты.

Control methods of immunogenic activity associated vaccines against infectious diseases of cattle caused by various species of bacteria of the genus *Clostridium* Spp.

Kapustin A.V.

The control of produced biopreparations in the territory of the Russian Federation, used as a means of specific prophylaxis of infectious diseases of animals implies the necessity of performing a number of tests on various parameters, the main of which should be considered in the determination of immunogenicity. If the study drug is associated there is a need for monitoring immunogenic activity of each antigen included in the vaccine, thus, existing methods of control are very expensive and inefficient, as does not allow the use of laboratory animals as biological models. A shining example of this situation are the biological preparations against clostridiosis animals. In this article are present the results of a work of the methods of determining the immunogenic activity of the combined drug against clostridiosis cattle using a brand new approach to reduce the economic costs of the research.

Key words: Immunogenicity, immunity, toxins, bacterin, biopreparation.

В настоящее время общее количество представителей бактерий рода *Clostridium* spp. составляет более 180 видов. Наиболее опасными для животных, из которых являются лишь некоторые, в частности: *Clostridium botulinum*, *Cl.chauvoei*, *Cl.fallax*, *Cl.haemolyticum*, *Cl.oedematiens*, *Cl.perfringens*, *Cl.septicum*, *Cl.sordelli*, *Cl.sporogenes*, *Cl.tetani*, *Cl.histolyticum*. Приведённые виды клостридий способны вызывать ряд заболеваний имеющих принципиальные различия в клинко-патоморфологическом отношении, но их всех объединяет то, что основным фактором влекущим к гибели животного является не сам возбудитель а его токсин [12].

Основную роль в патогенезе клостридиозов играют высокоактивные экзотоксины, которые образуются в про-

цессе размножения в организме животных, а также при росте на питательных средах [9]. Стремительное воздействие токсинов на организм животного, не смотря на своевременное лечение, зачастую не приводит к получению необходимого результата в виде выздоровления, а ведёт к летальному исходу. В качестве наиболее оптимального метода борьбы с заболеванием клостридиозной этиологии стоит считать специфическую профилактику. Учитывая важность вакцин в борьбе с анаэробными инфекциями, особое внимание необходимо уделять контролю качества выпускаемых иммунобиологических препаратов, в особенности их иммуногенной активности [1, 6].

Для определения иммуногенной активности биопрепаратов широко используются качественные и количественные методы. С помощью качественных методов можно определить только пригодность препарата к использованию на основании лимита минимальной активности. Количественные методы оценки иммунитета дают возможность определить не только качественный состав препарата, но и степень его специфической активности и спрогнозировать продолжительность иммунитета. Для воспроизведения количественных методов контроля вакцин против клостридиозов используют международные стандартные образцы токсинов и антитоксических сывороток [11].

На момент начала исследований в 2009 году РФ не выпускались ассоциированные вакцины для профилактики анаэробных инфекций крупного рогатого скота (КРС), соответственно отсутствовали методы их контроля. Из всего арсенала вакцин против клостридиозов выпускались лишь вакцина против эмфизематозного карбункула и столбнячный анатоксин. Профилактика злокачественных отеков, некротического гепатита, анаэробной энтеротоксемии была не возможна из-за отсутствия препаратов. Это обстоятельство послужило толчком к тому, что на Российский рынок ветеринарных препаратов хлынул поток зарубежных лекарственных средств и средств специфической профилактики [4, 5, 7, 10].

Целью нашей работы было получение многокомпонентной ассоциированной поливалентной вакцины против наиболее клинически значимых клостридиозов крупного рогатого скота. Для осуществления поставленной цели была изучена этиологическая структура клостридиозов, подобраны высоко токсигенные штаммы, отработана современная технология культивирования и обработки антигенов. Большая часть компонентов вакцины стала изготавливаться в виде очищенных от балластных веществ и концентрированных токсинов, а не бактеринов, как было ранее. Эти изменения состава и технологии изготовления препарата позволили получить безопасный, высокоэффективный препарат широкого спектра действия, а также значительно увеличить длительность иммунитета с 6 до 12 месяцев.

Полученные экспериментальные образцы вакцины по своим характеристикам соответствовали зарубежным аналогам и были эффективны при профилактике анаэробных болезней у восприимчивых животных. Однако оставался нерешенным вопрос контроля качества иммуногенной активности препарата на лабораторных животных. Существовавшие на территории Российской Федерации (РФ) методы контроля анаэробных препаратов, применяемых в ветеринарии, были устаревшими и не давали реального представления о качестве препарата [2, 3].

Еще раз оговариваясь, что вакцин против клостридиозов КРС не существовало, в качестве примера можно привести описание методов контроля иммуногенности препаратов против клостридиозов овец, частично совпадающих по структуре с новым препаратом:

1. Вакцина против бродзота, анаэробной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят инактивированная концентрированная, состоит из инактивированных формалином антигенов *Cl.perfringens* типов В, С, D, *Cl.septicum*, *Cl.oedematiens*. Контроль иммуногенности компонентов *Cl.perfringens* типа В и С, а также *Cl.oedematiens* проводился путем прямого заражения трех дважды имму-

низированных и двух контрольных кроликов активно растущими культурами указанных клостридий. Данный метод имел существенные недостатки: 1) использовалось небольшое количество животных, что не позволяет достоверно подтвердить иммуногенность и статистически обработать полученные результаты; 2) отсутствует возможность стандартизировать заражающую дозу контрольных штаммов, так как используются нативные активно растущие культуры; 3) заражения штаммами, вызывающими гангренозное поражение мышц, не гуманно, так как, даже в случае выживания животных, что говорит о наличии иммунитета, вызванного введением испытуемого препарата, образуется гангренозное поражение конечности, что ведет к страданиям животного.

Компонент *Cl.perfringens* тип D в вакцине контролировался путем постановки реакции нейтрализации эpsilon-токсина сыворотками иммунизированных кроликов, что в принципе отвечало современным требованиям к контролю качества анаэробных препаратов, но используемый метод был качественным и не позволял оценить степень напряженности иммунитета.

2. Поливалентный анатоксин против клостридиозов овец (состав идентичный предыдущей вакцине), имел более совершенный контроль, заключающийся в количественной оценке титра антител в крови иммунизированных животных в единицах связывания токсина. Однако огромным недостатком метода являлось высокая стоимость контроля, так как в качестве подопытных животных использовались взрослые овцы, а также в стране не выпускались стандартные антитоксические сыворотки, что делало этот метод контроля практически не воспроизводимым. Использование овец в опыте имело еще одну негативную сторону, так перед контролем приходилось проверить на наличие антител к клостридиям большое количество животных для выявления серонегативных особей, так как у многих имелись собственные антитела в высоком титре.

Таким образом, для всесторонней и количественной оценки качества нового ассоциированного препарата, существующие методы не подошли, и предстояло разработать современный и приемлемый способ контроля качества иммуногенности вновь разработанной вакцины. Учитывая отсутствие аналогов, был проведен ряд экспериментов по отработке методов контроля иммуногенной активности многокомпонентной вакцины.

Согласно литературным данным, контроль качества иммунитета осуществляется путем постановки реакции нейтрализации токсинов клостридий сыворотками крови кроликов, которых и было решено использовать для контроля иммуногенности большинства компонентов вакцины. К основным преимуществам этих животных можно отнести удобство работы исследователя, возможность получения большого количества сыворотки крови от одного животного, а также отсутствие в популяции серопозитивных особей.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе федерального государственного бюджетного учреждения "Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов", федерального государственного бюджетного научного учреждения "Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.П. Коваленко", а также в виварии Вышневолоцкого филиала ВИЭВ с опытной базой (о. Лисий).

Для определения иммуногенной активности полива-

лентной ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота использовались кролики породы шиншилла массой 2,5–3,0 кг, беспородные белые мыши массой 16–18 г, стандартизированные лиофильно высушенные токсины *Cl.perfringens* типов A, B, C, D, *Cl.tetani*, *Cl.novyi* т. В, физиологический раствор pH 7,2, шприцы, стандартные антитоксические сыворотки токсинам *Cl.perfringens* типов A, C, D, *Cl.tetani*, *Cl.novyi*. В ходе работы применяли эпизоотологические, бактериологические, серологические, статистические методы исследований.

Результаты и обсуждение

Иммуногенную активность вакцины по отношению к *Cl.perfringens* типов A, B, C, D, *Cl.tetani*, *Cl.novyi*, оценивают путем постановки реакции нейтрализации токсинов указанных видов клостридий антителами сыворотки крови вакцинированных кроликов. Для этого проводили иммунизацию 6 кроликов массой 2,5–3,0 кг. Вакцину вводили двукратно внутримышечно с интервалом 28 дней в объеме 1,5 см³, что составляло половину дозы для восприимчивых животных. Через 14 дней после второй вакцинации у подопытных кроликов брали кровь и получали сыворотки. Сыворотку крови каждого животного в группе объединяли в стерильном флаконе в равных объемах, перемешивали и использовали для постановки реакции нейтрализации на белых мышках. Для проведения реакции нейтрализации (РН) использовали стандартизированные токсины *Cl.perfringens* типов A, B, C, D, *Cl.novyi* с различной активностью. Стандартизацию указанных токсинов проводили с использованием международных антитоксических сывороток, приобретенных в ГИСК им. Тарасевича. Всего было использовано пять разведенных токсинов с активностью 10, 15, 20, 25, 30 Длм/мл для белых мышей массой 16–18 г и токсин *Cl.tetani* в разведениях 50, 100 и 200 Длм/мл.

Общую пробу сыворотки разливали в 6 пробирок по 1,5 см³, после чего в них вносили рабочие растворы токсинов клостридий в объеме 1,5 см³: в 1-ую - *Cl.perfringens* тип A, во 2-ую - *Cl.perfringens* тип B, в 3-ую - *Cl.perfringens* тип C, в 4-ую - *Cl.perfringens* тип D, в 5-ую - *Cl.novyi* тип B, в 6-ую - *Cl.tetani*.

Смесь токсинов с сывороткой перемешивали, стараясь не допускать образования пузырьков воздуха, и помещали в термостат на 45 мин. при температуре 37°C. Этого времени было достаточно для нейтрализации токсинов клостридий имеющимися в сыворотке крови антителами. Затем каждую пробу смеси токсин/сыворотка вводили 5 белым мышам внутривенно в объеме 0,5 см³.

Для контроля активности токсинов каждый из них разводили так, чтобы в 1,0 см³ раствора содержалось 2 Длм/мл для белых мышей указанной массы. Растворы токсинов перемешивали, прогревали в термостате 45 мин при 37 °C и вводили внутривенно белым мышам в дозе 0,5 см³, используя по 5 мышей на каждую пробу, токсин *Cl.tetani* вводили внутримышечно в области корня хвоста.

После проведения инъекций за животными устанавливали наблюдение в течение 72 часов. Серию вакцины считали активной, если после введения белым мышам смеси токсина с сывороткой живыми остаются не менее 4 из 5 использованных животных при гибели не менее 4 контрольных белых мышей. Результаты опытов представлены в таблице. В результате проведенной работы было установлено, что мыши, которым вводили смесь токсин/сыворотка с содержанием токсинов *Cl.perfringens* и *Cl.novyi* активностью 10, 15 и 20 Длм/мл оставались живы в 100 % случаев при

Таблица. Определение дозы токсинов клостридий, нейтразуемых антитоксическими сыворотками

Контролируемый компонент	Дозы							
	10 Длм/мл	15 Длм/мл	20 Длм/мл	25 Длм/мл	30 Длм/мл	50 Длм/мл	100 Длм/мл	200 Длм/мл
<i>Cl. Perf. Тип A</i>	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	-	-	-
<i>Cl. Perf. Тип B</i>	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5	-	-	-
<i>Cl. Perf. Тип C</i>	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	-	-	-
<i>Cl. Perf. Тип D</i>	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	-	-	-
<i>Cl. Novyi</i>	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	-	-	-
<i>Cl. Tetani</i>	-	-	-	-	-	5/5	5/5	5/5

проверке активности компонентов *Cl.perfringens* тип В, С и *Cl.novyi* и в 80 % случаев по компонентам *Cl.perfringens* тип А и D. Также вакцина обеспечивала накопление антител у вакцинированных кроликов, позволяющих нейтрализовать токсин *Cl.tetani* с активностью 100 и 200 Длм/мл.

Помимо разработки методов контроля иммуногенной активности перечисленных компонентов, проведены опыты по оценке активности компонентов *Cl.chauvoei* и *Cl.septicum*. Оценку проводили существующими методами, предусматривающими заражение предварительно двукратно иммунизированных животных. Для определения иммуногенной активности компонента *Cl.chauvoei* вакцины использовались морские свинки, а для *Cl.septicum* – белые мыши. Для контроля активности компонента *Cl.chauvoei* вакцину вводили 10 морским свинкам двукратно подкожно в области холки интервалом 21 день в дозе 1,0 см³. Через 14 дней после второй вакцинации 10 иммунизированных и 10 контрольных морских свинок заражали лиофилизированной споровой культурой контрольного штамма *Cl.chauvoei* – R₁₅ в дозе 20 LD₅₀, которую предварительно устанавливали на животных-аналогах. Заражающую культуру вводили внутримышечно в дозе 0,1 см³ с добавлением 0,2 см³ 10 % раствора хлористого кальция. Срок наблюдения за животными устанавливали 5 суток.

Серия вакцины считается активной, если после заражения выживали не менее 80 % иммунизированных морских свинок при гибели 80–100 % контрольных животных. Оценку иммуногенности компонента *Cl.septicum* проводили путем заражения вакцинированных белых мышей контрольным штаммом *Cl.septicum* № 1098. Вакцину вводили 10 белым мышам массой 16–18 г двукратно подкожно с интервалом 21 день в области холки в дозе по 0,5 см³. Через 14–16 дней после второй вакцинации 10 иммунизированных и 10 контрольных белых мышей заражали лиофилизированной споровой культурой контрольного штамма *Cl.septicum* №1098 в дозе 3 LD₅₀. Заражающую культуру вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 см³. Учет результатов проводили через 72 часа. Серия вакцины считается активной, если после заражения выживают не менее 80 % иммунизированных белых мышей при гибели 80–100 % контрольных животных.

Проведенное исследование показало, что использование предложенного метода позволяет получить результаты, подтверждающие эффективность вакцины.

Заключение

Как видно из представленных данных, в результате проведенных опытов был отработан метод контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота. В полученных от кроликов, дважды иммунизированных испытуемым препаратом, сыворотках крови титры антитоксических антител в отношении альфа, бета и эпсилон токсинов *Cl.perfringens* и

токсина *Cl.novyi* позволяли нейтрализовать 20 Длм/мл, а *Cl.tetani* – 100 Длм/мл. Также получено подтверждение иммуногенности компонентов против эмфизематозного карбункула и бродзота в ранее описанном варианте, несмотря на большее количество компонентов в препарате.

Список литературы

1. Kapustin A.V. The study of immunogenic activity of anaerobic infection's experimental vaccine caused by *Clostridium sordellii* of cattle. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Т. 60. № 12. С. 241-246.
2. Kolesnikova Yu. N. The etiology of anaerobic infections of cattle and comparative characteristics of the isolated strains of clostridium// Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Vol. 56. №8. P. 39-48.
3. Kolesnikova Yu. Etiology and clinico-morphological manifestation of anaerobic enterotoxaemia of young cattle// International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. 2016. Vol. 7. №S2. P. 228-231.
4. Kovaleva E. Phage detection of pathogen microorganisms in agricultural ecosystems monitoring as part of sectoral foresight// International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. 2016. Т. 7. №S2. С. 247-249
5. Василевич Ф.И. Практическое руководство по борьбе с кровепаразитарными болезнями домашних животных. - М.: Зоо-ВетКнига. - 2015. - 86 С.
6. Гулюкин, М.И. Система ветеринарно-санитарных, профилактических и лечебных мероприятий против инфекционных болезней крупного рогатого скота в хозяйствах российской Федерации//М.И. Гулюкин, К.П. Юров, Ю.Д. Караваев и соавт.//ГНУ ВИЭВ, ФГУ "Центр ветеринарии". -М.-2007.-С.14.
7. Капустин А.В. Этиологическое значение клостридий при инфекционных заболеваниях крупного рогатого скота//В сборнике: Лекарственные препараты для животных (разработка, производство, эффективность и качество): Тезисы докладов международной научной конференции, посвященной 80-летию организации ВГНКИ. 2011. С. 53-54.
8. Максимович В.В. Эпизоотология и инфекционные болезни//Минск: ИВЦ Минфина, 2012. -775 с.
9. Моторыгин А.В. Видовой состав клостридий крупного рогатого скота.//Вестник ветеринарии, №1(64), 2013. С. 71-73
10. Скларов О.Д. Интерференция компонентов в поливалентной вакцине против клостридиозов крупного и мелкого рогатого скота.// Российский ветеринарный журнал. 2017. № 1. С. 20-23.
11. Скларов О.Д. Изучение иммуногенной активности столбнячного компонента в составе ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота//Ветеринария Кубани. 2016. №4. С. 15-17.
12. Скларов О.Д. Эффективность применения вакцины "кlostboвак-8" против клостридиозов крупного рогатого скота, вызванных различными видами *Clostridium spp.*//Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2016. №9. С. 6-11.
13. Скородумов, Д.И. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. /Д.И. Скородумов. -М.: ИзографЪ, 2005. -С. 344-346.

УДК 619:616:07.68.41.05

Эритроцитарные диагностикумы и применение в ветеринарии

¹Клюшинцева Н.С., соискатель,

²Мельник Н.В.,

¹Мельник Р.Н., кандидат биологических наук,

¹Гринь С.А., член-корреспондент РАН,

³Крюкова Е.Н., кандидат биологических наук,

⁴Питенкова И.Ю.,

Клюшинцева Н.С.,

Федорова О.Ю.,

⁵Дресвянникова С.Г.,

¹Самуйленко А.Я., доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН.

¹ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности"; 141142, Московская область, Щелковский район, пос. Биокомбината.

²"Национальная Ассоциация ветеринарно-биологической промышленности" ("Ветбиопром"), г. Москва;

³ФКП "Щелковский биокомбинат", Московская область, Щелковский район, пос. Биокомбината;

⁴ФКП "Щелковский биокомбинат", пос. Биокомбината;

⁵ГКУ КСББЖ "Краснодарская"; г. Краснодар

К форменным элементам крови относят эритроциты, лейкоциты и кровяные пластинки (тромбоциты). Эритроциты – красные клетки крови, свое название получили от греческого слова эритрос – красный. Каждый в отдельности эритроцит – зеленовато-желтый цвет, а в толстом слое вместе приобретают красный цвет. У млекопитающих животных эритроциты безъядерные, а в связи с вытравливанием

ем ядра на определенной стадии своего развития приобретают форму двояковогнутого диска, благодаря чему в 1,64 раза увеличивается их поверхность по сравнению с поверхностью шара, что создает благоприятные условия для диффузии газов через их оболочку. Поверхность эритроцитов большая и составляет 27–32 м²/кг массы животного.

У птиц, амфибий, рептилий и рыб эритроциты овальной формы и содержат ядро. Эритроциты животных других видов имеют тонкую, сетчатую строму (остов), ячейки которой заполнены гемоглобином. Белково-липидная оболочка эритроцитов обладает избирательной способностью к проникновению разных веществ, благодаря чему эритроциты сохраняют свой постоянный химический состав. Оболочка легко пропускает газы, воду, анионы хлора, угольной кислоты, глюкозу, мочевины, но через нее не проходят белки, гемоглобин и катионы, а ионы натрия и калия проникают очень медленно. Эритроциты очень эластичны, могут менять свою форму и проникать в капилляры, диаметр которых меньше диаметра эритроцитов.

Эритроциты выполняют следующие функции:

1. Перенос кислорода от легких к тканям и углекислого газа от тканей к легким.
2. Транспортируют по организму адсорбированные на их поверхности аминокислоты, липиды.
3. За счет наличия гемоглобина в поддержании постоянного реакции крови.
4. Адсорбируют яды, токсины, переносят их в систему мононуклеарных фагоцитов, где они нейтрализуются.

Ключевые слова: форменные элементы крови, эритроциты, животные, диагностические тесты, сенсibilизированные эритроциты, эритроцитарные диагностикумы, растворы: формалин, танин и т.д.

To formed elements of blood include erythrocytes, leukocytes and platelets (thrombocytes)

Erythrocytes- red blood cells, got its name from the Greek word erythros red. Individually, erythrocytes – greenish-yellow color, and in a thick layer all together become red. In mammals the nuclear-free erythrocytes, and in connection with the expulsion of the nucleus at a certain stage of its development take the form of a biconcave disk, so that in a 1.64 fold increase in the surface compared to the surface of the ball, which creates favorable conditions for diffusion of gases through their shell. The surface of erythrocytes is large and is 27 to 32 m²/kg weight of the animal (16). In birds, amphibians, reptiles and fish erythrocytes are oval in shape and contain a nucleus. Erythrocytes of animals of other species have a thin, reticulated stroma (the skeleton), whose cells are filled with hemoglobin. Protein-lipid sheath of red blood cells has a selective ability to penetrate different substances, allowing the red blood cells retain their constant chemical composition. Shell readily allows the movement of gases, water, anions of chlorine, carbonic acid, glucose, urea, but in it are not proteins, hemoglobin, and cations, and sodium and potassium ions penetrate very slowly. Erythrocytes are very flexible, can change shape and penetrate into the capillaries, whose diameter is smaller than the diameter of red blood cells.

Red blood cells perform the following functions:

1. The transport of oxygen from lungs to tissues and carbon dioxide from the tissues to the lungs.
2. Transporterowych the organism adsorbed on their surface amino acids, lipids.
3. Due to the presence of hemoglobin in the maintenance of a constant reaction of the blood.
4. Adsorbs poisons, toxins, and carry them into the system of mononuclear phagocytes, where they neytralizuya. For normal functioning it is necessary that the motion in the vessels, they were not bonded and not glued. Vzaimootnosheniya power of red blood cells is provided by the magnitude of the corresponding negative charge. Erythrocytes are formed in red bone marrow. Their life expectancy – in cattle – 120–160, sheep, 130 horses and 100 pigs and rabbits – 45–60 days.

Key words: blood cells, red blood cells, animals, diagnostic tests, sensitized erythrocytes, erythrocytic diagnosticums, solution of formalin, tannin, etc.

Для нормального функционирования необходимо, чтобы при движении в сосудах они не сближались и не склеивались. Взаимоотталкивающая сила эритроцитов обеспечивается величиной их одноименного отрицательного заряда. Эритроциты образуются в красном костном мозге. Продолжительность их жизни – у крупного рогатого скота – 120–160, овец – 130, лошадей – 100, свиней и кроликов – 45–60 дней.

Целью работы явилось изучение вопросов использования эритроцитов крови животных в конструировании эритроцитарных диагностикумов для создания быстрых, простых и экономических методов биологической экспресс-индикации микроорганизмов. Опубликовано немало статей о получении и применении эритроцитарных диагностикумов. Изготовление эритроцитарных диагностических препаратов и их применение в ветеринарной практике является весьма актуальной темой [4, 12]. Экспресс-диагностика болезней животных все шире входит в повседневную практическую работу клинико-диагностических лабораторий, вытесняя устаревшие громоздкие и трудоемкие методы. В этом плане наиболее перспективна реакция непрямой гемагглютинации (Indirecthemagglutinationtest) с антигенными диагностикумами [5, 13, 15]. Эта реакция проста по технике постановки и позволяет значительно быстрее выявлять антигена по сравнению с традиционно используемыми реакциями. Сущность указанной реакции заключается в том, что эритроциты животных после адсорбции на их поверхности антигенов различной природы, приобретают новую серологическую специфичность, вследствие чего могут агглютинироваться в присутствии специфических антител. Эта реакция испытана при диагностике ряда бактериальных и вирусных инфекций, в том числе и при бруцеллезе [1, 2, 3, 7].

Диапазон разработок в этой области необычайно велик. В настоящее время разработаны различные методы изготовления эритроцитарных диагностикумов, отличающихся по способам сенсibilизации эритроцитов (с помощью танина, глутарового альдегида, хлористого хрома, риванола и т.д.). Разработка диагностических тестов для мониторинга иммунного фона у животных дает возможность ветеринарным врачам своевременно организовать профилактические мероприятия, а специалистам лабораторий проводить экспресс-диагностику инфекций и оценивать качество опытных и производственных серий вакцинных препаратов [9, 14].

Постоянное изучение этиологической структуры желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных в различных регионах страны является вопросом первостепенной важности, определяющим эффективность серологической диагностики и специфической профилактики этих инфекций.

Разработка новых диагностических тестов достаточно чувствительных и простых в исполнении и стандартизированных для проведения эпизоотологического обследования, иммунологического мониторинга и изучения эффективности специфических мероприятий против сальмонеллеза является весьма актуальной задачей, так как до настоящего времени на практике применяется реакция агглютинации, которая является недостаточно чувствительной и специфичной.

В этой связи представляется актуальным разработка более специфического и чувствительного метода, каковым является реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). Использование антигенного эритроцитарного диагностикума позволит проводить серологическую диагностику сальмонеллеза, а также проводить оценку иммунного ответа на фоне применяемых ассоциированных и моновалентных вакцин против желудочно-кишечных заболеваний. Для инaktivации микроорганизмов при приготовлении диагностику-

мов чаще всего используются химические вещества, особенно формалин, являющийся лучшим консервантом. Убитые нагреванием микробы хуже сохраняют антигенные свойства и применяются редко.

В серологических реакциях (реакции агглютинации, реакции пассивной гемагглютинации, реакции связывания комплемента, реакции торможения гемагглютинации) для выявления специфических антител применяются: бактериальные, эритроцитарные и вирусные диагностикумы [6, 8, 16]. Бактериальные диагностикумы могут содержать инaktivированную микробную взвесь или отдельные антигенные компоненты бактерий: О, Н или Vi-антигены и используются в реакциях агглютинации.

Эритроцитарные диагностикумы представляют собой эритроциты (обработанные танином или формалином) с адсорбированными на них антигенами, извлеченными из бактерий, и применяются в РПГА (реакции пассивной гемагглютинации). В том случае, когда РПГА используется для выявления антигена в выделениях больных, в тканях и др., применяют "антительные диагностикумы", т. е. эритроциты, сенсibiliзирoванные антителами [11].

Известны многие методы лабораторной диагностики ВГБК, такие как реакция гемагглютинации (РГА), реакция длительного связывания комплемента (РДСК), реакция торможения гемагглютинации (РТГА), реакция иммуноферментного анализа (ИФА). Однако в некоторых случаях применение этих методов не дает четких результатов, например при исследовании разложившихся патматериалов или объектов ветсаннадзора. Кроме того, перед постановкой реакции требуется предварительное приготoвление суспензии органов, что достаточно трудоемко [10].

Диагностикум используется в РТГА и РСК с сывороткой больных при диагностике заболевания.

Материалы и методы

Работы выполнены в 2016–2017 г в соответствии с изучением литературных данных, как отечественных, так и зарубежных авторов, и собственных исследований на производственной базе ФКП "Щелковский биокомбинат" и ФГБНУ "ВНИТИБП". Процесс изготовления диагностикумов включает: стабилизацию эритроцитов формальдегидом, обработку фиксированных эритроцитов танином, сенсibiliлизацию специфическим антигеном, консервирование сенсibiliзированных эритроцитов.

Стабилизация эритроцитов формальдегидом. Для приготовления эритроцитарного диагностикума используют эритроциты барана, формализированные по методу Вайнбаха в модификации Меньшова и Шмутера.

С этой целью дифибринированную кровь барана центрифугируют при 1500–2000 об/мин с экспозицией 10 мин. Полученный осадок эритроцитов трижды отмывают 0,85% физиологическим раствором путем центрифугирования при 1500–2000 об/мин в течение 20 мин. Из осадка готовят 8% взвесь эритроцитов на физиологическом растворе. К 150 мл 8% взвеси эритроцитов капельно добавляют при постоянном перемешивании равный объем изотонического раствора формалина (рН 7–7,2), содержащего 3% формальдегида. Смешивание происходит на магнитной мешалке, после чего смесь помещают в термостат при 37–38°C на 16 часов. По истечении времени выдерживания в термостате формализированные эритроциты фильтруют через 2–3 слоя рыхлой ваты и трижды отмывают центрифугированием десятикратным объемом физиологического раствора при 1500 об/мин по 10 мин. Осадок ресуспендируют физиологическим раствором хлористого натрия в 5% взвесь эритроцитов и консервируют 1% раствором формалина. Эритроциты, обработанные описанным способом, сохраняются при 4°C не менее 6 месяцев, не лизируются в гипотоническом растворе поваренной соли и практически не обладают способностью агглютинироваться гетерофильными антителами.

Обработка формализированных эритроцитов танином. С этой целью берут равные объемы (1:1) раствора танина (1:20000) и 5% взвеси эритроцитов. Обе части смеси нагревают в термостате или водяной бане при 37°C, затем

тщательно смешивают и выдерживают при этой же температуре 15 минут. После этого обработанные танином эритроциты 3–4кратно отмывают от избытка танина в шестикратном объеме ФБР (рН 7,2) с помощью центрифугирования при 2000 об/минуту в течение 10 минут. Отмытые эритроциты собирают с центрифужных пробирок и доводят их до первоначального объема (5% взвесь) 5%-ным раствором хлорида натрия туда же вносят 0,25% – детергент вторичного алкилсульфата натрия с рН=6,2–6,4.

Сенсibiliзация формализированных и танизированных эритроцитов R-антигеном. Антиген для сенсibiliзации эритроцитов готовят из штамма *V. ovis* 63/290 путем предварительного замораживания при температуре -20°C, после чего оттаивают с последующим воздействием на бруцеллезную взвесь ультразвуковых волн частотой 22 кГц и мощностью 90 Вт/см² трехкратно в течение 15 минут, затем озвученную бактериальную взвесь подвергают центрифугированию при 6000 об/мин в течение 30 минут, осадок отбрасывают, а надосадочную жидкость декантируют и используют в качестве сенситина на эритроциты.

Для определения минимальной сенсibiliзирующей дозы R-антигена (сенситина) проводят его сенсibiliлизацию возрастающими дозами, при температуре 45–50°C, в течение одного часа, при периодическом встряхивании каждые 5–8 минут. За 10 минут до конца сенсibiliзации для закрепления сенситина на эритроцитах добавляют формалин из расчета 1 см³ на 200 см³ смеси. Для этого в пробирки с 1 см³ 5%-ной взвеси эритроцитов добавляют 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5... до 4,0 см³ R-антигена, смесь перемешивают и выдерживают на водяной бане в течение одного часа при 45–50°C. Затем сенсibiliзированные эритроциты отмывают от избытка R-антигена в течение 30 минут трехкратно физиологическим раствором с добавлением к нему 1% нормальной инaktivированной кроличьей или 2,5% лошадиной сыворотки крови.

Физиологический раствор для отмывания берут в десятикратном объеме. Затем в каждую пробирку с осадком отмытых сенсibiliзированных эритроцитов вносят по 2 см³ физиологического раствора со стабилизатором (свежая кроличья или лошадиная сыворотка крови). Полученные 2,5%-ные взвеси эритроцитов, сенсibiliзированные разными дозами R-антигена (R-сенситина), гомогенизируют встряхиванием пробирок и проверяют в РНГА на активность и специфичность. Консервирование сенсibiliзированных эритроцитов. После приготовления для консервации применяют 0,3% формальдегид. Готовый препарат хранят в холодильнике при 4–6°C.

Проверка активности и специфичности полученного эритроцитарного R-антигенного диагностикума в РНГА. Эритроцитарный антигенный диагностикум проверяют на активность и специфичность с заведомо известными позитивными, негативными сыворотками.

Берут положительную, отрицательную сыворотки разводят их физиологическим раствором с добавлением в качестве стабилизатора сыворотки крови кролика 1% или лошади 2,5%.

Преимущество диагностикумов перед живой культурой заключается в стабильности их агглютинабельных свойств, стандартности, безопасности и простоте обращения с ними. Использование диагностикумов дает возможность широко применять серологические методы в практике массовой работы. Особое значение имеют диагностикумы в случаях, когда работа с живыми бактериями или вирусами опасна из-за их высокой инфекционности (например, с бруцеллами, туляремиями, бактериями, вирусами клещевого японского энцефалитов и др.). Диагностикумы, используемые для распознавания инфекционных заболеваний, делятся на бактериальные, риккетсиозные и вирусные. С их помощью в сыворотке больных можно определить наличие антител по отношению к определенному виду микроба-возбудителя.

Заключение

Ежегодно в нашей стране миллионы людей сельскохозяйственных животных болеют различными инфекциями.

Экономический ущерб от этих заболеваний огромен.

В связи с этим, одним из важных этапов борьбы с инфекциями является их ранняя диагностика. Наиболее длительным и трудоемким этапом микробиологического исследования при проведении лабораторной диагностики того или иного инфекционного заболевания является изучение биохимических свойств патогенных микробов. Каждый микроорганизм характеризуется специфическим спектром ферментов. Поэтому изучение биохимической активности микроорганизмов играет важную роль в лабораторной практике при идентификации микроорганизмов. Биохимическая активность положена в основу их классификации и всегда используется для установления родовой и видовой принадлежности выделяемых возбудителей.

Бурный научно-технический прогресс во всех областях знаний, в том числе и в области микробиологических исследований, сопровождается разработкой и созданием быстрых, простых и экономичных методов биохимической экспресс-индикации микроорганизмов.

Список литературы

1. Kapustin A.V. Pasteurellosis of cattle caused by *Mannheimia haemolytica*. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Т. 52. № 4. С. 3-12.
2. Kolesnikova Y.N. Prophylaxis of salmonellosis of farm animals and poultry: the main directions and means. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Т. 60. № 12. С. 247-254.
3. Pimenova V.V. The role of farming poultry's salmonella pathogens in infection and pathology of human disease. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017. Т. 62. № 2. С. 282-289.
4. Биотехнология /Под ред. Н.Е.Егорова и Самуилова - М., Высш.шк., 1987. 235с.
5. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. - МИА, 2005. С. 154-156.
6. Гулюкин, А.М. Эпизоотологический мониторинг и совершенствование серологического контроля эффективности

вакцинопрофилактики бешенства: автореф. канд. биол. наук: Казань, 2011. -23 с.

7. Капустин А.В. Диагностика пастереллёза сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей. Методические указания. ФГБНУ ВИЭВ им. Коваленко Я.Р. 2016

8. Елаков А.Л. Контроль эффективности вакцинопрофилактики бешенства дикой фауны на территории Калининградской области РФ. // Ветеринарный врач. 2012. №6, С. 8-11

9. Елаков А.Л. Разработка и применение блок-иммуноферментной тест-системы для контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства. // Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. Вып. 96. 2012 г. - Украина, г. Харків -С. 64-66.

10. Ефремова М.С. Сравнительная характеристика показателей иммунного ответа на Т-зависимый и Т-независимый антигены у кур // Ветеринария и кормление. -2014. №5. С. 74-75

11. Лощинин М.Н. Количественная характеристика Т-, В-клеток в процессе поствакцинального иммунного ответа // Труды ВИЭВ-2010. -Т. 76. -С. 29-33.

12. Медицинская вирусология /Под редакцией Д.К. Львова. М.: Медицинское информационное агентство, 2008. С. 24-38.

13. Медицинская и санитарная микробиология - Воробьев А.А. - Учебное пособие, Высш.шк., 2003. С. 543.

14. Сабирова В.В. Оценка эффективности вакцинопрофилактики бешенства с помощью иммуноферментной тест-системы // Биотехнология: экология крупных городов: Материалы Московской Международной научно-практической конференции. М., 2010. С. 465-466.

15. Тутов И. К., Ситьков В. И. Основы биотехнологии ветеринарных препаратов // Учебное пособие для вузов. Ставрополь 1997. С. 159-179.

16. Хисматуллина Н.А. Эпизоотическая ситуация и контроль эффективности вакцинопрофилактики бешенства животных в Республике Татарстан // В сборнике: Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных. Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию ВНИИВВиМ. 2014. С. 331-338.

УДК 619:616.9-036.22; 619:616.9; 619:577.27

Иммунный ответ у телят, вакцинированных вакциной "Виропаст" против вирусных и бактериальных инфекций

Красочко П.А.¹ – доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры эпизоотологии, krasochko@mail.ru;

Нестерович С.Г.¹ – кандидат ветеринарных наук, директор колледжа.

Борисовец Д.С.² – кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией вирусных инфекций свиней

Красочко И.А.² – доктор ветеринарных наук, профессор, ученый секретарь

Новикова О.Н.² – кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник отдела бактериальных инфекций крупного рогатого скота

¹О "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", 220026, г. Витебск, ул. 1-я Доватора 7/11, Республика Беларусь, Тел. +375-29-615-67-34

²УП "Институт экспериментальной ветеринарии. им. С.Н.Вышелесского", 210003, г. Минск, ул. Брикета, 28, Тел. +375-17-508-83-52

Аннотация. Приведены результаты изучения иммунного ответа у телят и коров после иммунизации вакциной инактивированной эмульгированной для профилактики вирусно-бактериальных пневмоний крупного рогатого скота "Виропаст". Вакцина создана на основе штаммов инфекционного ринотрахеита, вируса диареи, парагриппа-3 и

бактерий – *Mannheimia haemolytica* и *Pasteurella multocida* тип А, инактивированных теотропином или формальдегидом, эмульгированных в масляном адьюванте. Установлено, что применение биопрепарата не оказывает негативного влияния состояние и продуктивность иммунизированных животных, а ее применение приводит к достоверному повышению титров противовирусных и антибактериальных антител к вирусу ИРТ – на 33,52% блокировки, к ВД s/р-соотношение – на 0,36; к ПГ-3 - на 2,2 log₂, к М. haemolytica – на 3,7 log₂, снижению заболеваемости телят вирусно-бактериальными респираторными заболеваниями на 24,23%.

Ключевые слова: иммунный ответ, телята, коровы, вакцина инактивированная эмульгированная, профилактика вирусно-бактериальных пневмоний.

Immune response at the calfs vaccinated by the vaccine "ViroPast" against viral and bacterial infections

Krasochko P. A., Nesterovich S.G., Borisovets D.S., Krasochko I.A., Novikova O.N.

Results of studying of an immune response at calfs and cows after immunization are given by a vaccine of the inactivated "Viropast" emulsified for prophylaxis of virus and bacterial pneumonia of cattle. The vaccine is framed on the basis of strains of an infectious rhinotracheitis, a virus of a diarrhea, parainfluenza-3 and bacteria - *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* type A inactivated teotropiny or a formic aldehyde, emulsified in an oil adjuvant. It is established that use of a biological preparation doesn't exert negative impact a state and efficiency the immunizirovannykh of animals, and its use leads to reliable rising of credits of antiviral and antibacterial

antibodies to the IRT virus – for 33,52% of interlocking, to VD a s/p-ratio – on 0,36; to PG-3 – on 2,2 log₂, to M. haemolytica – on 3,7 log₂, to depression of a case rate of calfs virus and bacterial respiratory diseases for 24,23%.

Key words: immune response, calfs, cows, inactivated emulsified vaccine, prophylaxis of virus and bacterial pneumonia.

Введение

Рост числа респираторных заболеваний крупного рогатого скота является острой проблемой во всем мире и одной из основных причин экономического ущерба в животноводстве. Как правило, первые признаки респираторной патологии появляются через 5–10 дней после технологической перегруппировки и перевода телят из родильного отделения в профилакторий. По широте распространения, смертности, вынужденному убою, снижению привесов заболевания органов дыхания у телят послеотъемного периода превалируют над всеми остальными патологиями [1, 6]. В отдельных хозяйствах до 80–100% телят послеотъемного периода подвержены респираторным заболеваниям, а гибель молодняка в совокупности с вынужденным убоем достигает 40–55%, а окупаемость корма у больных и переболевших животных снижается в 2–3 раза. Комплекс респираторных заболеваний крупного рогатого скота чаще всего представляет полиэтиологические инфекционные процессы, в которых на разных стадиях развития патологии принимают участие инфекционные агенты как вирусной, так и бактериальной этиологии [3, 6]. Как правило, респираторные заболевания молодняка крупного рогатого скота протекают по типу смешанных инфекций. Основную роль в возникновении вспышек первичных респираторных заболеваний молодняка крупного рогатого скота играют вирусы: парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, респираторно-синцитиальной инфекции, вирусной диареи и корона-вирус [4, 5]. Вирусы повреждают защитные механизмы дыхательной системы, чем облегчают размножение и колонизацию органов различных микроорганизмов (пастерелл, мангаймий, гемофиллюс, псевдомонас, микоплазмы и др.) [3, 6].

Сложность борьбы с заболеваниями крупного рогатого скота, обусловленными условно-патогенными бактериями, прежде всего объясняется тем, что пневмоэнтериты телят вызываются преимущественно ассоциацией вирусов и условно-патогенных бактерий, которые имеют лабильные факторы патогенности, обладают плюрализмом, что затрудняет диагностику и профилактику этих болезней [4, 5]. В этой связи, разработка и внедрение в практику ветеринарии новых отечественных высокоэффективных средств специфической профилактики вирусно-бактериальных инфекций телят является одной из наиболее актуальных задач.

Сотрудниками РУП "Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского" и УО "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины" разработана инактивированная вакцина для профилактики респираторных инфекций крупного рогатого скота "Виропаст" на основе штаммов инфекционного ринотрахеита, вируса диареи, парагриппа-3 и бактерий – *Mannheimia haemolytica* и *Pasteurella multocida* тип А, инактивированных теотропином или формальдегидом, эмульгированных в масляном адьюванте.

Целью настоящих исследований является и оценка иммунного ответа у крупного рогатого скота на введение

инактивированная вакцина для профилактики респираторных инфекций крупного рогатого скота "Виропаст".

Материалы и методы

Исследования проводились в условиях отдела вирусных инфекций и отдела бактериальных инфекций крупного рогатого скота РУП "Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского" и кафедры эпизоотологии УО "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины".

Инактивированная вакцина для профилактики респираторных инфекций крупного рогатого скота "Виропаст" изготовлена на основе штаммов инфекционного ринотрахеита (КМИЭВ-V123), вируса диареи (КМИЭВ - V120), парагриппа-3 (КМИЭВ - V124) и бактерий – *Mannheimia haemolytica* (КМИЭВ - B158), *Pasteurella multocida* тип А (КМИЭВ - B166). Накопление вирусов проводилось на культуре клеток МДБК. Накопление бактериальной массы штаммов для вакцины проводили на биоферментере "Biotech-8000". Отделение бактериальных клеток от питательной среды проводили путем центрифугирования на проточной ультрацентрифуге "Hahil Science Model-J075" при 15000 об/мин. Полученный осадок ресуспензировали в физиологическом растворе до концентрации 80–100 млрд. м.т. в см³ и хранили при 4±2 °С.

Инактивация вирусов осуществлялась, теотропином, бактерий – формальдегидом, в качестве адьюванта использован Монтанид ИЗА206. С соотношением монокомпонентов в вакцине следующее: вирусная часть : бактериальная часть – 2:1. Оптимальной схемой применения вакцины для телят является двукратная иммунизация в дозе 2,0 см³ с интервалом 14–21 день оценке эффективности вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики вирусно-бактериальных пневмоний крупного рогатого скота "Виропаст" исследования проводили по следующей схеме (табл. 1).

До введения у животных взята кровь и изучены основные показатели специфического и неспецифического иммунитета. Кровь у животных опытных и контрольных групп брали до иммунизации, через 28 и 56 дней после первичной иммунизации. В крови титр антител к вирусам инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи определяли в ИФА, парагриппа-3 – в РЗГА, *M. Haemolytica* – в РА. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ Stat Biom 2720.

Результаты изучения титров противовирусных и антибактериальных антител организма телят и коров, иммунизированных разработанной инактивированной вакциной представлены в таблице 22.

Результаты исследований

Введение телятам и коровам вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики вирусно-бактериальных пневмоний крупного рогатого скота "Виропаст" не вызвало реакции на месте введения, животные оставались подвижны, охотно принимали корм, продуктивность не снижалась. Анализ эффективности вакцины показал, что после ее использования отмечается снижение заболеваемости телят вирусно-бактериальными респираторными заболеваниями на 24,23%.

В табл.2 приведены результаты изучения титров поствакцинальных антител у коров и телят после введения вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики вирусно-бактериальных пневмоний крупного рогатого скота "Виропаст".

Таблица 1. Схема опыта по оценке эффективности вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики вирусно-бактериальных пневмоний крупного рогатого скота «Виропаст»

Группа животных	Животные	Кол-во голов	Доза и кратность введения вакцины
Опытная группа 1	Телята 8-12-дневного возраста	5	1,0 см ³ однократно
Опытная группа 2	Телята 8-12-дневного возраста	5	1,0 см ³ двукратно с интервалом 21-28 дней
Опытная группа 3	Телята 30-35-дневного возраста	21	2,0 см ³ однократно
Опытная группа 4	Телята 30-35-дневного возраста	21	2,0 см ³ двукратно с интервалом 21-28 дней
Опытная группа 5	Коровы в период сухостоя	9	3,0 см ³ однократно
Опытная группа 6	Коровы в период сухостоя	11	3,0 см ³ двукратно с интервалом 21-28 дней
Контрольная группа 1	Телята 8-12-дневного возраста	5	Физ. раствор
Контрольная группа 2	Телята 30-35-дневного возраста	6	Физ. раствор
Контрольная группа 3	Коровы в период сухостоя	5	Физ. раствор

Оценка результатов изучения титров противовирусных и антибактериальных антител организма телят и коров, иммунизированных разработанной инактивированной вакциной приведенных в таблице 22, показала, что достоверное увеличение уровня противовирусных антител отмечено в крови однократно иммунизированных коров к вирусу парагриппа-3 до уровня $8,75 \pm 0,25 \log_2$ ($P < 0,01$); уровня антибактериальных антител до значения в крови однократ-

но иммунизированных телят 8–12-дневного возраста и коров до значений $6,0 \pm 0,32$ и $5,6 \pm 0,6 \log_2$ соответственно ($P < 0,05$) на 56-е сутки исследований.

Заключение Клинические испытания вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики вирусно-бактериальных пневмоний крупного рогатого скота "Виропаст" показали, что биопрепарат не оказывает негативного влияния состояние и продуктивность иммунизированных животных, а ее применение приводит к достоверному повышению титров противовирусных и антибактериальных антител к вирусу ИРТ – на 33,52% блокировки, к ВД s/p-соотношение – на 0,36; к ПГ-3 – на $2,2 \log_2$, к *M. haemolytica* – на $3,7 \log_2$, снижению заболеваемости телят вирусно-бактериальными респираторными заболеваниями на 24,23%.

Список литературы

1. Биологические препараты для профилактики вирусных заболеваний животных: разработка и производство в Беларуси / П. А. Красочко, Н. А. Ковалев, И. В. Насонов, А. С. Ястребов, Д. В. Бучукири, М. М. Усея, П. П. Красочко, Д. С. Борисовец, В. П. Красочко, Н. М. Авласко; под ред. Н. А. Ковалева. - Минск: Беларуская навука, 2016. - 492 с.
2. Ковалев Н.А., Красочко П.А. Вирусы и прионы в патологии животных и человека: монография. - Минск: Беларуская навука, 2012. - 426 с.
3. Частная эпизоотология: учебное пособие / В.В. Максимович, Н.В. Саница, В.Ф. Багрецов и др. - Минск, 2010. - 628 с. 4
4. Красочко П.А. Вирусные пневмоэнтериты телят / П.А. Красочко, Ю.Г. Зелютков, И.А. Красочко. - Минск, 1999. - 168 с.
5. Красочко П.А. Моно- и ассоциативные вирусные респираторные инфекции крупного рогатого скота (иммунологическая диагностика, профилактика и терапия): автореф. дис. ... д-ра вет. наук / П.А. Красочко. - Минск, 1997. - 37 с.
6. Ветеринарная энциклопедия в 2-х т. / С.С. Абрамов и др.; под ред. А.И. Ятусевича. - Минск, 2013. - Т. 2: К-Я. - 597 с.

Таблица 2. Динамика титров поствакцинальных антител у коров и телят после введения вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики вирусно-бактериальных пневмоний крупного рогатого скота «Виропаст»

Сроки взятия крови	Группа животных	Титр антител			
		ИРТ % блокир.	ВД S/P	ПГ-3 log ₂	<i>M. haemolytica</i> log ₂
До введения	ОГ 1	91,53±2,83	1,33±0,07	8,4±0,51	10,8±0,58
	ОГ 2				
	КГ 1	76,71±9,77	0,3±0,07	3,83±0,4	2,0±0,37
	ОГ 3				
	ОГ 4	78,61±14,24	0,6±0,17	5,66±0,99	2,0±0,26
	КГ 2	72,09±10,94	0,26±0,11	3,83±0,31	2,5±0,22
	ОГ 5	93,87±0,58	1,19±0,04	9,6±0,24	4,0±0,32
	ОГ 6				
КГ 3					
Через 28 дней после первичной иммунизации	ОГ 1	86,21±8,42	1,27±0,25	6,8±0,58	9,0±0,55
	ОГ 2	95,78±0,04	1,28±0,08	7,2±0,49	8,8±1,39
	КГ 1	94,89±0,76	1,18±0,18	8,0±0	9,6±0,68
	ОГ 3	55,94±14,30	0,17±0,06	5±0,58	2,67±0,21
	ОГ 4	70,6±15,38	0,44±0,14	5,6±1,17	3,0±0,26
	КГ 2	52,2±10,83	0,15±0,06	4,25±0,48	3,0±0
	ОГ 5	74,5±18,7	1,13±0,09	-	5,6±0,51
	ОГ 6				
КГ 3	94,4±0,14	0,96±0,16	-	4,5±0,29	
Через 56 дней после первичной иммунизации	ОГ 1	75,6±15,6	0,92±0,21	6,25±0,85	7,5±0,96
	ОГ 2	95,5±0,4	0,91±0,11	6,67±0,67	8,25±0,85
	КГ 1	93,03±2,76	0,91±0,16	7±0,58	9,5±1,04
	ОГ 3	48,0±8,9	0,08±0,04	6,4±0,24	6,0±0,32*
	ОГ 4	81,5±6,0	0,3±0,14	6,8±0,37	2,4±0,24*
	КГ 2	52,5±14,5	0,09±0,07	6,75±0,48	4,25±0,63
	ОГ 5	95,21±0,67	1,04±0,13	8,75±0,25 **	5,6±0,6*
	ОГ 6	74,06±20,9	0,78±0,23	8±0,84	4,8±0,58
КГ 3	60,34±33,28	0,97±0,16	6±0,58	3,33±0,33	

Примечание - P - * - $\leq 0,05$; ** - $\leq 0,01$; *** - $\leq 0,001$.

УДК 619:616.9-036.22; 619:616.9; 619:577.27

Эффективность иммунокорректирующего препарата при профилактике вирусных и паразитарных болезней животных

Красочко П.А.¹ – доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры эпизоотологии, krasochko@mail.ru;

Якубовский М.В.² – доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий отделом паразитологии;

Красочко И.А.² – доктор ветеринарных наук, профессор, ученый секретарь

Борисовец Д.С.² – кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией вирусных инфекций свиней

Щемелева Н.Ю.² – кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник отдела паразитологии;

Толяронок Г.Е.² – кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник отдела вирусных инфекций

Василькова В.П.² – кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник отдела паразитологии

¹УО "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", 220026, г. Витебск, ул. 1-я Доватора 7/11, Республика Беларусь, Тел. +375-296156734

²РУП "Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского" 210003, г. Минск, ул. Брикета, 28, Тел. +375-17-508-83-53

Аннотация. Профилактическая эффективность препарата "Имуновет" при вирусных пневмоэнтеритах составляет 75, экстенсивность при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта телят: при стронгилоидозе – 42,28%, при трихостронгилоидозах – 62,32%, при эймериозах – 63,32%, при балантидиозе – 65,52%

Ключевые слова: вирусные и паразитарные болезни, иммуностимулятор, крупный рогатый скот

The effectiveness of immunocorrective drug in the prevention of viral and parasitic diseases of animals

Krasochko P.A., Jakubowski M.V., Krasochko I.A., Borisovetz D.S., Shemeleva N.Yu., Toleronok G.E., Vasilkova V.P.

Abstract. Prophylactic efficacy of the drug "Immunovet" viral pneumoenteritis is 75, extended request with the associative parasitise the gastrointestinal tract of calves: strongyloidiasis – of 42.28%, trichostrongylidae – 62.32%, eimeriozoa – of 63.32%, balantidioza – 65.52% Key words: viral and parasitic diseases, immune stimulant, cattle

Широкое распространение болезней животных, в т.ч. вирусных и паразитарных, приводит к существенным потерям в животноводстве, опасности заражения людей возбудителями зоонозов, потерей сырья промышленностью. Подсчитано, что болезни животных наносят экономический ущерб, достигающий 40% стоимости животноводческой продукции, поэтому проведение ветеринарных мероприятий по профилактике всегда рентабельно. Для предупреждения болезней животных в арсенале ветеринарных специалистов имеется достаточно широкий спектр средств – химио- и биопрепараты, диагностикумы и др.

Однако важнейшим способом профилактики ряда вирусных, бактериальных, паразитарных и других болезней является стимуляция иммунитета животных. Известно, что в настоящее время более 80% животных имеют отклонения в работе иммунной системы организма, что приводит к риску их заболеваемости. Развитию иммунодефицитных состояний способствуют также нарушения условий кормления и содержания животных, несвоевременное проведение ветеринарно-санитарных мероприятий, недостаточный моцион и др. Снижение иммунитета животных происходит при бесконтрольном применении ряда антибиотиков, использовании некоторых антгельминтиков, обладающих иммуносупрессивными свойствами, при чрезмерной эксплуатации животных. Известно также, что при ряде паразитарных болезней у животных снижается иммунитет, в т.ч. поствакцинальный (1, 2, 3). Поэтому есть необходимость применения иммуностимуляторов с целью повышения иммунитета, в т.ч. и поствакцинального, сохранения здоровья и продуктивности животного. Важным является разработка экологически чистых иммуностимуляторов, не оказывающих отрицательного воздействия на продукцию животных и не сдерживающих ее использование. В течение 2013–2015 гг. сотрудниками отделов вирусных инфекций и паразитологии РУП "Институт экспериментальной ветеринарии. им. С.Н.Вышелеского" разработана композиция иммуностимулирующего препарата "Иммуновет". В качестве активнo-действующего вещества был выбран липополисахарид бактериальной клеточной стенки (ЛПС) непатогенных спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis*, который не является патогенным для теплокровных животных.

Целью настоящего исследования явилось изучение профилактической эффективности иммуностимулирующего препарата "Иммуновет" при вирусных и паразитарных болезнях крупного рогатого скота.

Материалы и методы

Источником иммуностимулятора были использованы непатогенные спорообразующие бактерии *Bacillus subtilis* КМИЭВ- В 177, который не является патогенным для теплокровных животных.

Из *Bacillus subtilis* КМИЭВ- В 177 выделялся липополисахарид методом щелочного гидролиза по В.М.Никитину (1986) в нашей модификации. Для работы готовили раствор липополисахарида в концентрации 500 мкг/мл.

Производственные испытания иммуностимулятора при вирусных (вирусные пневмоэнтериты телят) и паразитарных болезнях сельскохозяйственных животных проводили в СК "Трайпл-Агро" Логойского района Минской области.

Для проведения опыта были сформированы 2 группы телят – опытная и контрольная по 20–22 головы. Телятам опытной группы, применили иммуностимулятор в дозе 10 мкг АДВ/кг живой массы один раз в день три дня подряд. Контрольной группе телят использовали комплекс лечебных средств, используемых в хозяйстве (антибиотики,

антгельминтики и т.д.). Период наблюдения составил 30 суток. Результатом эффективности применяемого препарата служили показатели заболеваемости телят пневмоэнтеритами и сохранность животных. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что препарат обладает профилактической эффективностью при вирусных пневмоэнтеритах телят снижает заболеваемость телят 80 до 17,7%.

Испытания по изучению эффективности при паразитарных болезнях проводили в УП "Экспериментальная база им. Котовского" Узденского района Минской области. Из телят 4 – 4,5 месячного возраста, спонтанно инвазированных ассоциациями паразитов желудочно-кишечного тракта, сформировали 2 группы. Для установления уровня инвазии использовали методы Г.А. Котельникова – В.М. Хренова (4) – для обнаружения яиц гельминтов и ооцист эймерий и А.Ф. Манжоса – для определения числа балантидий в 1 мл фекалий. Исходное заражение (экстенсивность инвазии) телят опытной группы (58 головы) составило – стронгилоидами – 100 %, трихостронгилидами – 39,65 %, эймериями – 82,75 %, балантидиями – 50,0 %. Инвазированность телят группы контроля (15 голов) составила – стронгилоидами – 100 %, трихостронгилидами – 40,0 %, эймериями – 53,33 %, балантидиями – 40,00 %. Животным опытной группы внутримышечно ввели иммуновет в дозе 10 мкг/кг живой массы трехкратно один раз в сутки с интервалом 24 часа. Группе контроля препарат не применяли. После применения иммуностимулирующего препарата отклонений от физиологической нормы у животных не наблюдали.

Экстенсивность иммуновета через 20 дней после последнего введения препарата составила при стронгилоидозе – 42,28%, трихостронгилоидозах – 62,32%, эймериях – 63,32%, балантидиозе – 65,52 %. Экстенсивность телят группы контроля в этот период стронгилоидами составляла 100%, трихостронгилидами – 60,0%, эймериями – 66,66%, балантидиями – 60,0%.

Определение эффективности иммуностимулятора при ассоциативных нематодозах и протозоозах желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота проводили также в хозяйстве Узденского района Минской области. Телят в возрасте 4 – 4,5 месяца исследовали на зараженность желудочно-кишечными нематодами и эймериями по вышеуказанным методам, после чего сформировали опытную и контрольную группы по 30 голов в каждой. Заражение (экстенсивность инвазии) телят опытной группы составило – стронгилоидами – 100%, стронгилиями желудочно-кишечного тракта – 30,3%, эймериями – 100%. Зараженность телят группы контроля составило – стронгилоидами – 100%, стронгилиями желудочно-кишечного тракта – 42,4%, эймериями – 100%. Телятам опытной группы, спонтанно инвазированной желудочно-кишечными паразитами применили иммуностимулятор в дозе, отработанной ранее в исследованиях по изучению иммуногенности препарата, а именно 10 мкг АДВ/кг живой массы один раз в день три дня подряд. Контрольной группе препарат не применяли.

После введения препарата за опытными животными вели постоянное наблюдение в течение 2 суток. Все исследуемые животные имели нормальные реакции, хороший аппетит, здоровый внешний вид. В дальнейшем, за период наблюдения по общему состоянию и поведению опытная группа не отличалась от контрольной. Достоверной разницы по потреблению воды и корма в группах не отмечалось.

Оценку эффективности проводили через 14 дней по

Таблица 1. Изучение профилактической эффективности иммуностимулирующего препарата при вирусных пневмоэнтеритах телят

№ п/п	Показатели	Единицы измерения	Результат по группам телят			
			Опытная		Контрольная	
			До обработок	Через 30 дней	До обработок	Через 30 дней
1	количество животных в группе	голов	20	20	22	22
2	зарегистрировано пневмоэнтеритов	голов	16	1	18	5
		%	80	5	81,8	22,7
3	непроизводительное выбытие	голов	-	-	-	-
		%	-	-	-	-

наличию в пробах фекалий телят опытной и контрольной групп яиц гельминтов и ооцист эймерий согласно методик указанных выше. Экстенсэфективность нового иммуностимулятора на основе бактериального липосахариды *B.subtilis* 22 при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта телят составила – при стронгилоидозе – 76,7%, при стронгилятозах желудочно-кишечного тракта – 65,0%, при эймериозе – 50,0%, таблица 23. В этот период инвазированность контрольной группы составила – стронгилоидами – 100%, стронгилятами желудочно-кишечного тракта – 66,67%, эймериями – 100%.

Заключение

Профилактическая эффективность препарата "Иммуновет" при вирусных пневмоэнтеритах составляет 75, экстенсэфективность при ассоциативных паразитозах желудочно-кишечного тракта телят: при стронгилоидозе – 42,28%, при трихостронгилоидозах – 62,32%, при эймериозах – 63,32%, при балантидиозе – 65,52%, отрицательного

воздействия препарата на организм животных выявлено не отмечено.

Список литературы

1. Красочко П., Якубовский М., Ятусевич А. Эффективность иммуномодуляторов при паразитарных болезнях животных // Ветеринария сельскохозяйственных животных. 2011. № 12. С. 4-7.
2. Болезни крупного рогатого скота и овец // П.А.Красочко, З.М.Джамбулатов, К.Б.Курбанмагомедов, М.В.Якубовский, А.И.Ятусевич, И.А.Красочко и др. Махачкала, 2007 - 657 с.
3. Иммунокоррекция в клинической ветеринарной медицине / П.А.Красочко, М.В.Якубовский, И.А.Красочко, и др. /Под ред. П.А.Красочко. - Минск: Техноперспектива, 2008. - 507 с.
4. Якубовский М.В. Диагностика, терапия и профилактика паразитарных болезней животных / М.В. Якубовский, Н.Ф. Карасев. - Минск : Хата, 2001. - 384 с.

УДК 619:616.9-036.22; 619:616.9; 619:577.27

Интенсивность антителообразования на введение рекомбинатных и вирусных белков вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота

Красочко П.П. – кандидат ветеринарных наук, доцент, старший научный сотрудник НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии

Яромчик Я.П. – кандидат ветеринарных наук, доцент, доцент кафедры фармакологии

Красочко В.П. – кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии

УО "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", 220026, г. Витебск, ул. 1-я Доватора 7/11, Республика Беларусь, Тел. +375-3361314-15

Аннотация. Целью исследования послужило изучение интенсивности антителообразования на введение рекомбинатных и вирусных белков вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Проведенным скринингом 70 изолятов бацилл серологическими тестами у 10 выявлено наличие вирусоспецифических в отношении возбудителя инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота белков. С помощью полимеразной цепной реакции у 3 установлены *gB* и *gD* гены, кодирующие биосинтез белков. Для дальнейших исследований был использован наиболее активный штамм, идентифицированный как *Bacillus licheniformis*. При сравнении антителообразования у животных иммунизированных вирусвакциной и суспензией *Bacillus licheniformis* уровень антител после введения живой вирусвакцины возрос к 60 дню наблюдения с $8,79 \pm 2,75$ до $82,15 \pm 1,84 \Delta E$, а введение суспензии инактивированных теотропином *Bacillus licheniformis* с адьювантом ИЗА-15 способствовало увеличению уровня антител – их количество возросло с $14,21 \pm 3,39$ до $45,37 \pm 10,76 \Delta E$.

Ключевые слова: рекомбинатные белки, вирусные белки, вирус инфекционного ринотрахеита, крупный рогатый скот.

Antibody formation in cows for introduction of recombinant and viral proteins of a virus in infectious rinitraheitis of large cattle

Krasochko P.P., Yaromatchik Ya.P., Krasochko V.P.

The purpose of the study was to study the intensity of antibody formation on the introduction of recombinant and viral proteins of the virus of infectious rinitraheitis of cattle. A screening of 70 isolates of bacilli with serological tests in 10 revealed the presence of virospecific for the causative agent of infectious rinitraheitis of cattle proteins. With the polymerase chain reaction, *gB* and *gD* genes encoding the biosynthesis of proteins are established in 3. For further studies, the most active strain identified as *Bacillus licheniformis* was used. When comparing antibody formation in animals immunized with virus vaccine and suspension of *Bacillus licheniformis*, the level of antibodies after administration of live virus vaccine increased by the day of observation from 8.79 ± 2.75 to $82.15 \pm 1.84 \Delta E$, and the introduction of a suspension of teotropin-inactivated *Bacillus licheniformis* with an adjuvant IZA-15 promoted an increase in the level of antibodies - their number increased from 14.21 ± 3.39 to $45.37 \pm 10.76 \Delta E$.

Key words: recombinant proteins, viral proteins, infectious rinitraheitis virus, large cattle.

Введение

В комплексе ветеринарно-санитарных мероприятий при инфекционном ринотрахеите специфическая профилактика занимает одно из ведущих мест. В арсенале ветеринарной службы имеется ряд биопрепаратов, основанных на использовании эпизоотических и аттенуированных штаммов вирусов, которые используются для изготовления живых и инактивированных вакцин [1, 2, 3]

В литературе имеются сведения об общности антигенов вирусов и бактерий, обусловленных наличием генома вирусов в бактериальной клетке, который спонтанно персистирует в клетку. Это устанавливается с помощью точечной гибридизации с радиоактивной меткой, используя ДНК-зонд, постановкой полимеразной цепной реакции (ПЦР) при установлении комплементарности участков ДНК вируса [4, 5]. Современные достижения молекулярной биологии и генной инженерии позволили получать рекомбинатные бактерии, которые в своем составе имеют искусственно введенный геном других организмов (вирусов, животных, насекомых, растений и т.д.).

В процессе исследований, направленных на скрининг штаммов бацилл, имеющих в своем составе персистирующий геном вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, нами проведена работа по выделению и идентификации штамма с вышеуказанными свойствами [6]. Иммунизация животных с использованием противовирусных вакцин вызывает активный иммунный ответ, сопровождающийся выработкой специфических антител. Одна-

ко исследований по определению сравнительного иммунного ответа на вирусные белки и на белки из бактерий, имеющих в своем составе геном вируса в доступной нам литературе не отмечалось. В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования послужило изучение интенсивности антителообразования на введение рекомбинантных и вирусных белков вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

Материалы и методы

Исследования проводились в условиях НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии УО "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины" и животноводческих хозяйствах Витебской области. Для подтверждения наличия антигенов вируса ИРТ в бациллах использовали специфическую антисыворотку против вышеуказанного вируса, полученную путем гипериммунизации серонегативных в отношении ИРТ бычков. Активность полученной сыворотки проверяли в реакции нейтрализации (РН) и иммуноферментном анализе (ИФА) с использованием тест-системы производства фирмы IDEXX.

Антигенное родство бацилл и вируса ИРТ изучали путем постановки реакции агглютинации макрометодом в объеме 0,25 мл по общепринятой методике. Подтверждением наличия в бактериях антигенов, родственных вирусам, использовали реакцию торможения непрямо́й гемагглютинации. Наличие участков генома вирусов в бактериях, имеющих антигенное родство с вирусами, осуществляли с помощью методов молекулярной биологии – полимеразно-цепной реакции (ПЦР).

Для выявления комплексных участков ДНК вируса инфекционного ринотрахеита в бациллах использовали две пары праймеров, гомологичных консервативным участкам генов гликопротеина D и гликопротеина В.

Подбор праймеров и зонда осуществлялся с помощью программы "AlleleID" v6.0 на основе полных и частичных нуклеотидных последовательностей различных штаммов и изолятов вируса ИРТ из международного банка нуклеотидных последовательностей (GenBank). Синтез праймеров проводили фосфорамидитным методом на автоматическом синтезаторе олигонуклеотидов "BIOSYSTEMS ASM 800" (Био-Рад). Выделение ДНК осуществляли с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN, а также набора реагентов для выделения ДНК "Нуклеосорб. Комплектация С" (Праймтех, РБ). Постановку ПЦР проводили в real-time амплификаторе "Rotor Gene 3000" и термоциклере CG1-96 производства "Corbett Reserch", Австралия по двум методикам: с использованием зонда Taqman для гликопротеина В и рутинной ПЦР для гликопротеина D.

Для оценки интенсивности антителообразования на введение рекомбинантных и вирусных белков вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в работе использовали живую моновакцину против ИРТ и штамм бацилл, в котором персистирует геном вируса ИРТ инактивированный теотропином с масляным адъювантом ИЗА-15.

Для изучения гуморального иммунного ответа крупного рогатого скота на введение структурных рекомбинантных белков и антигенов вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого проводили вакцинацию животных, отбор крови и получали сыворотку по общепринятой методике.

Опыты проводили в хозяйстве, где вакцинируют животных против ИРТ КРС живыми вакцинами. При постановке опыта из клинически здоровых коров были сформированы 3 группы животных по 10 голов в группе. Животные опытной

группы № 1 подвергались вакцинации вирус-вакциной живой культуральной против ИРТ КРС двукратно с интервалом 21 день, животные 2 опытной группы были подвержены обработке суспензией бацилл со структурными рекомбинантными белками вируса ИРТ двукратно с интервалом 21 день, животные третьей группы – контроль. Отбор крови проводили в первый день опыта, на 10, 21 (день ревакцинации), 35 и 60 день.

При использовании метода иммуноферментного анализа был выбран коммерческий набор реагентов IDEXX IBR X3, принцип которого основан на блокирующем ИФА, что позволяет использовать сыворотки любых видов животных для выявления антител. Принцип метода основан на конкуренции антител исследуемой сыворотки и конъюгата за связь с антигеном, сенсibiliзирующим планшет. Оптическая плотность при этом обратно пропорциональна количеству антител в сыворотке.

Постановку ИФА осуществляли в соответствии с инструкцией к набору. Сыворотки разводили 1:2 и использовали в реакции. Время первичной инкубации составляло 2 часа. Далее вносили их в лунки планшета, инкубировали в термощейкере Dialab, далее промывали в автоматическом промывающем устройстве Diawasher, после вносили конъюгат и инкубировали в термощейкере, промывали планшет. После этого вносили субстрат, выдерживали определенное время и останавливали реакцию добавлением стоп-раствора. Учет реакции проводили с помощью спектрофотометра Diareader при длине волны 450 нм. Обсчет значительных оптических плотностей проводили с помощью программы Excel пакета MS Office. При обработке результатов использовали формулу расчета коэффициента блокирования антител, выраженную в процентах. Высокий коэффициент блокирования свидетельствует о более высоком содержании антител.

Результаты исследований

При подборе рекомбинантных микроорганизмов-носителей антигенов вируса ИРТ КРС на первом этапе исследований с помощью реакции агглютинации выявляли наличие общих антигенов вируса ИРТ в 70 штаммах бацилл, выделенных из объектов животного происхождения, с помощью моновалентной гипериммунной сыворотки против ИРТ. В гипериммунной сыворотке титр антител в РНГА к вирусу был от 8,0 \log_2 , в РН – 5,0 \log_2 .

Из представленных данных видно, что из 70 штаммов 20 (28,6%) прореагировали в РА с гипериммунной сывороткой в титрах 6,3 – 7,3 \log_2 , \log_2 , 11 сывороток (15,7%) – в титрах 8,3 \log_2 , 3 (4,3%) – 9,3 \log_2 , 3 (4,3%) – 11,3 \log_2 , что может служить предположением о широком наличии в клеточной стенке бактерий общих антигенов с вирусами. При этом у 6 штаммов (8,6%) не реагировали сыворотками, а 14 штаммов (20%) реагировали в титрах от 3,3 до 4,3 \log_2 .

Дальнейшая работа проводилась по выявлению способности сорбировать противовирусные антитела на клеточной поверхности с использованием реакции торможения непрямо́й гемагглютинации (РНГА). РНГА ставили в 2 этапа. На первом этапе в гипериммунную моноспецифическую сыворотку против вируса ИРТ вносили суспензия суточных культур 15 штаммов бацилл в соотношении 1:1, показавших максимальный титр в РА с гипериммунной сывороткой и 2 штамма, отрицательно реагировавшие в РА. После взаимодействия антител с бактериальными антигенами и седиментации бактерий в сыворотке, с оставшимися в надосадке антителами, ставили РНГА.

Таблица 1. Результаты серологического исследования при изучении особенностей гуморального иммунного ответа на различные типы биопрепаратов (А-Е)

№ группы	Наименование вакцины	День отбора крови				
		1	10	21	35	60
1	Биопрепарат на основе инактивированных теотропином <i>Bacillus licheniformis</i> с адъювантом ИЗА-15	14,21±3,39	13,19± 2,24	16,43±8,62	23,82± 9,45	45,37± 10,76
2	Вирус-вакцина живая культуральная против ИРТ КРС	8,79±2,75	88,04±2,44	13,75±3,97	81,34±0,04	82,15±1,84
Контроль	-	10,21±1,81	19,07±5,31	33,00±8,59	28,15± 8,00	31,85±9,14

Коэффициент достоверности $P < 0,01$

Из 15 штаммов бацилл практически все сорбировали антитела к вирусу ИРТ на поверхности бактерий. Так, у 10 штаммов было падение титра антител в 32–64 раза, у 4 штаммов – в 16 раз, у 1 штамма – в 8 раз. Далее нами проведены исследования по изучению наличия генома вируса инфекционного ринотрахеита в бактериальных клетках путем идентификации участков ДНК вируса ИРТ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для определения наличия генома вируса ИРТ в изучаемых бациллах были отобраны изоляты, которые в предыдущем опыте показали наиболее высокое падение титра антител. Из суточных культур бацилл на МПА были приготовлены смывы, из которых выделяли тотальную ДНК. Далее ее тестировали параллельно в ПЦР на наличие гликопротеина В и D. Установлено, что в изолятах бацилл С4, С5 и С7 имеется геном вируса ИРТ – как gВ, так и gD генов. Полученные данные свидетельствуют, что вирус ИРТ способен персистировать в геноме бактерий и бациллы являются носителями генетического материала вируса. В этой связи наличие в бактериальных клетках вирусспецифических белков, выявляемых в иммунологических реакциях, а также генома вируса, могут стимулировать выработку вирусспецифических антител у животных, иммунизированных данными бактериями. В дальнейшей работе нами использован изолят бацилл С5. Штамм идентифицирован как *Bacillus licheniformis* и задепонирован в коллекции микроорганизмов РУП "Институт экспериментальной ветеринарии. им. С.Н. Вышелеского".

Для изучения гуморального иммунного ответа на введение структурных рекомбинантных белков из бактерий со спонтанной персистенцией геномом вируса ИРТ и противовирусной вакциной против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого в хозяйстве, в которых вакцинируют животных против ИРТ КРС живыми вакцинами.

При проведении опыта не отмечались какие-либо отклонения в состоянии животных по отношению к физиологической норме. В местах введения биопрепаратов образования абсцессов не выявлено. При постановке ИФА были получены данные, которые при статистической обработке приведены в таблице 1.

Как видно из таблицы, что вирус-вакцина живая культуральная против ИРТ КРС обладает должной иммуногенностью и увеличивает титр антител до практически максимального уровня. Так, уровень противовирусных антител после введения живой вирусвакцины возрос к 60 дню наблюдения с $8,79 \pm 2,75$ до $82,15 \pm 1,84$ ΔЕ. Отмечено, что введение животным суспензии инактивированных теотро-

пином *Bacillus licheniformis* с адьювантом ИЗА-15 также способствовало биосинтезу антител – их количество возросло с $14,21 \pm 3,39$ до $45,37 \pm 10,76$ ΔЕ. Увеличение уровня антител в контрольной группе свидетельствует о циркуляции вируса ИРТ в стаде животных и в этой связи отмечено возрастание антител, но ниже, чем у животных вакцинированных вакциной против ИРТ ($50,3$ ΔЕ) и у животных, получавших суспензию инактивированных теотропином *Bacillus licheniformis*.

Биопрепарат на основе штамма *Bacillus licheniformis*, спонтанно персистированного геномом вируса ИРТ КРС обладают иммуногенностью, но при этом уровень антител достигает только минимального значения защитного титра антител. Испытанный биопрепарат на основе штамма *Bacillus licheniformis*, спонтанно персистированного геномом вируса ИРТ КРС, имеет потенциал для использования в качестве биопрепарата при иммунотерапии молодняка на ранних стадиях заболевания инфекционным ринотрахеитом.

Список литературы

1. Биологические препараты для профилактики вирусных заболеваний животных: разработка и производство в Беларуси / П. А. Красочко, Н. А. Ковалев, И. В. Насонов, А. С. Ястребов, Д. В. Бучукури, М. М. Усеня, П. П. Красочко, Д. С. Борисовец, В. П. Красочко, Н. М. Авласко; под ред. Н. А. Ковалева. - Минск : Беларуская навука, 2016. - 492 с.
2. Ковалев Н.А., Красочко П.А. Вирусы и прионы в патологии животных и человека : монография. - Минск: Беларуская навука, 2012. - 426 с.
3. Частная эпизоотология: учебное пособие / В.В. Максимович, Н.В. Синеца, В.Ф.Багрецов и др. - Минск, 2010.-628 с.
4. Красочко П.А., Лысенко А.П., Волосянко Е.В. Спонтанная персистенция генома инфекционных вирусов в бактериальных клетках, приводящая к биосинтезу вирусспецифических белков // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. Минск, № 2, 2004. - С.34-40
5. Красочко П.А., Лысенко А.П., Волосянко Е.В. Явление спонтанной персистенции генома инфекционных вирусов в бактериальных клетках / Диплом на открытие № 291 Российской академии естественных наук и Международной академии авторов научных открытий и изобретений / Москва, 18 октября 2005 г. Москва, 2005. 25 с.
6. Скрининговые исследования по изучению наличия в бациллах генома вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота / Красочко П.П., Журавлева Е.С., Борисовец Д.С. Чайковский П.С., Радько В.Л. //Вестник Новосибирского государственного аграрного университета №1(34) январь-март 2015.- С. 75-82.

УДК: 612.017.3:616.2:636.4

Роль аутоиммунных процессов в патогенезе заболеваний легких у свиней

Крячко О.В. - доктор ветеринарных наук, профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии; e.mail: okriatchko@list.ru;

ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины", 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д.5; Россия; телефон (812) 388-20-86.

Аннотация. Цель нашего исследования - выявить наличие аутоиммунных реакций при острой неспецифической бронхопневмонии свиней. Исследование проводилось на 12 поросятах в возрасте 3,5 месяца (6 больных, 6 здоровых). Свиньи содержались на крупном свиномкомплексе. Сенсибилизация Т-лимфоцитов определялась по уровню продукции лимфокинов в реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) с антигеном из легочной ткани (Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт пульмонологии), антиген был использован в разведении 1:20.

Реакцию проводили по методу J. Bendixen и соавт. (1980) в модификации В.Морозова и В.Хавинсона (1980). Было установлено, что в начале болезни сенсибилизация Т-лимфоцитов к легочной ткани отсутствовала: процент миграции лейкоцитов составил $100,3 \pm 5,45$ %. В процессе лечения сенсибилизация Т-клеток к антигену из тканей легких увеличивалась. На 21-й день от начала лечения процент миграции в РТМЛ составил $68,3 \pm 4,27$ %, что было выше в 1,5 раза ($p < 0,05$), чем в начале заболевания. Таким образом, по нашему мнению нарастание аутосенсибилизации к тканям легких связано с изменениями в структуре и антигенных свойствах клеточной мембраны. Это может привести к тому, что иммунная система будет атаковать не только поврежденные альвеолоциты, но и здоровые клетки в областях легких, не затронутых воспалительным процессом, каскаду вторичной альтерации, приводящей к хроническому аутоиммунному воспалению, нарушению внешнего дыхания, нарастающей гипоксии и гибели животных.

Ключевые слова: бронхопневмония, патогенез, аутоиммунное воспаление.

The role of autoimmune processes in the pathogenesis of lung disease in pigs

Kryachko O. V.

The purpose of this study was to detect the presence of autoimmune reactions in acute nonspecific pneumonia of pigs. The study was conducted on 12 pigs at the age of 3.5 months (6 patients, 6 healthy). Pigs were kept on a large farm. Sensitization of T-lymphocytes was determined by the level of production of lymphokines in response inhibition of migration of leukocytes (RTML) with antigen from the lung tissue (St-Petersburg Scientific Research Institute of pulmonology), the antigen was used at a dilution of 1:20. The reaction was performed according to the method of J. Bendixen et al. (1980) in modification of V. Morozov and V.Khavinson (1980). It was established that in the beginning of the disease sensitization of T lymphocytes to the lung tissue were absent: the percentage of migration of leukocytes amounted to 100,3±5,45 %. In the treatment process, sensitization of T cells to the antigen of lung tissue increased. On the 21st day from the start of treatment percentage of migration in RTML amounted to 68,3±4,27 %, which was 1,5 times higher ($p<0.05$) than in early disease. Thus, in our opinion, the increase of autosensibilization to the lung tissue due to changes in the structure and antigenic properties of the cell membrane. This can lead to the fact that the immune system will attack not only damaged alveolocytes, but also healthy cells in areas of lung not affected by the inflammatory process. The cascade of secondary alteration can lead to a chronic autoimmune inflammation and in the end, the violation of external respiration, increasing hypoxia and death of animals.

Key words: bronchopneumonia, pathogenesis, autoimmune inflammation

В последнее время растет число аутоиммунных заболеваний как органоспецифического, так и системного характера у людей и животных. Это может быть связано как со срывом толерантности к антигенам забарьерных тканей (миелин нервной ткани, белки хрусталика, тиреоглобулин, белки половых клеток) при повреждении гистогематических барьеров, так и с изменением собственных антигенов под влиянием вирусов, микроорганизмов, химических веществ, лекарственных препаратов. В итоге собственная иммунная система уничтожает свои и измененные, и измененные клетки, начинается аутоиммунное воспаление (2). В связи с этим, целью наших исследований являлось выявление наличия аутоиммунных реакций при остром течении неспецифической бронхопневмонии у свиней.

Материалы и методы

Объект исследования - свиньи 3,5 мес. возраста, больные неспецифической бронхопневмонией. Животные содержались в условиях свинокомплекса на стандартном рационе и подбирались по принципу аналогов (порода, живая масса, общее развитие). Были сформированы две группы по 6 животных: 1-я - с клиническими признаками заболевания легких (пороссятам этой группы вводили внутримышечно бициллин-3 в дозе 10 000 ЕД/кг и тривитамин в дозе 0,1 мл/кг по 5 инъекций в течение 15 суток) и 2-я - клинически здоровых, в дальнейшем именуемые "интактные". Диагноз "бронхопневмония" ставился на основании результатов клинического осмотра, термометрии, наличия кашля, истечений из носовых ходов. Для исключения спе-

цифической бронхопневмонии проводились бактериологические исследования бронхиальной слизи, в результате которых специфического возбудителя выделено не было.

Пробы крови отбирали у пороссят из орбитального венозного синуса по методике Дж.Понда (1983). Кровь от 6 животных каждой группы исследовали до лечения и через 7, 14 и 21 сутки после его начала. Сенсibilизацию Т-лимфоцитов определяли по уровню выработки лимфокинов в реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) с антигеном из легочной ткани (Санкт-Петербургский НИИ пульмонологии), антиген использовали в разведении 1:20. Реакцию проводили по методу Дж.Бендиксена и соавт.(1980) в модификации В.Г.Морозова и В.Х.Хавинсона (1980) с использованием капилляров из набора для определения С-реактивного белка (длина 150 мм, диаметр 1...1,2 мм) (3).

Цифровой материал, полученный во всех сериях опытов, был обработан статистически с использованием пакета прикладных программ на персональном компьютере.

Результаты исследований и обсуждение. Выбор методики реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) основан на том, что сенсibilизированные к определенному антигену лимфоциты резко снижают скорость подвижности в среде, в которую вносят этот антиген.

При проведении РТМЛ с антигеном из легочной ткани было установлено (таблица), что в начале заболевания сенсibilизация Т-лимфоцитов к нему отсутствовала - процент миграции составлял 100,3±5,45 %. В процессе лечения сенсibilизация Т-клеток к антигену из легочной ткани нарастала и к 21-м суткам показатель достиг 68,3±4,27 %, что было в 1,5 раза выше ($P<0,05$) уровня, определенного в начале лечения.

Сенсibilизация лимфоцитов к антигену из легочной ткани нарастала в процессе заболевания, что являлось подтверждением развития в организме животных аутоиммунных процессов. Более 80 % легочной ткани составляют белки, воспалительный процесс в легких денатурирует их, наделяя свойствами, антигенными в отношении собственного организма. Часть аутоантигенов, соединяясь в крови с легочными аутоантителами, может входить в состав комплексов антиген-антитело, которые выводятся из организма. Другие противолечные антитела, вступающие в реакцию с легочными аутоантигенами или "антигенным материалом" нормальных легких, могут вызвать повреждение нормальных клеток эпителия (1). В процессе гибели клеток легочной ткани следует ожидать выделения ряда медиаторов, увеличение содержания в крови которых ведет к повышению проницаемости легочных капилляров, нарушению микроциркуляции и расстройству функции гистогематических барьеров легких как бронховаскулярного, так и аэрогематического.

Заключение

Таким образом, нарастание аутосенсibilизации к тканям легких на наш взгляд связано с изменением структуры органа и антигенных свойств мембраны клеток. Это может привести к атаке со стороны иммунной системы не только поврежденных альвеолоцитов, но и здоровых клеток в участках легких, не затронутых воспалительным процессом, каскаду вторичной альтерации и хроническому аутоиммунному воспалению, нарушению внешнего дыхания, нарастающей гипоксии, и в конечном итоге гибели животных.

Список литературы

1. Борохов А.И. Иммунизация при неспецифических заболеваниях легких. - М.: Медицина, 1973. - С. 130-142.
2. Клиническая иммунология и аллергология. /Под ред. Г. Лолора-младшего, Т. Фишера и Д. Адельмана. Пер. с англ.-М.: Практика, 2000.-806 с.
3. Методические рекомендации по проведению иммунологических исследований: Методы оценки Т- и В-систем иммунитета/ Воен.-мед. акад. Подгот. В.Г.Морозов, В.Х.Хавинсон. - Л., 1980. - 43 с.

Таблица. Оценка аутосенсibilизации Т-лимфоцитов крови пороссят при остром течении бронхопневмонии. (M±m)

Группы животных		РТМЛ с антигеном из легочной ткани, %
Интактные		100,8 ± 11,31
Больные	1 сутки	100,3 ± 5,45
	7 сутки	98,5 ± 5,23
	14 сутки	78,7 ± 4,27
	21 сутки	68,3 ± 4,27*

Примечание. Различия статистически достоверны ($P<0,05$) при сравнении показателей: * - больных животных до и в процессе лечения.

УДК 57.043:53

Изменение белкового состава сыворотки крови лабораторных животных под влиянием диоксида кремния "Альфа-Кварц". Квантовая нелокальность

Кулагин М.В.¹,
Ездакова И.Ю.²

¹ФГБУ "НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сысина" Минздрава РФ, Москва,

²ФГБНУ Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии имени Я.П. Коваленко, Москва

Аннотация. Представлены результаты лабораторных и натурных исследований доказывающих, что макроскопическая квантовая нелокальность объективна и реальна. Через передачу спиновых состояний электронов, возможно взаимодействие между минеральной и органической формами жизни на сколь угодно удаленных друг от друга расстояниях. Иммунотропные препараты, колебательность биосистемы, квантовая нелокальность, природные минералы, SiO₂ "Альфа-Кварц", энтропийность, альбумин и гамма-глобулины, физиологический раствор, иммуноэлектрофорез, газоразрядная визуализация, жидкостная хроматография.

Ключевые слова: диоксид кремния, сыворотка крови, белки, квантовая нелокальность

Change the protein composition of blood serum of laboratory animals under influence of silica "alpha-Quartz". Quantum nonlocality

Kulagin M.V. , Ezbekova I.Yu

Abstract. The results of laboratory and field experiments prove that the macroscopic quantum nonlocality is objective and real. Through the transfer of spin States of electrons, it is possible the interaction between mineral and organic forms of life on arbitrarily remote from each other distances. Immunotropic drugs, the oscillatory Biosystems, quantum nonlocality, natural minerals, SiO₂ "Alpha-Quartz", entropist, albumin and gamma-globulin, saline, immunoelectrophoresis, gas discharge visualization, liquid chromatography.

Key words: silicon dioxide, serum, proteins, quantum nonlocality

Как известно, взаимодействие наук формирует междисциплинарные и проблемно ориентированные исследования, удельный вес которых возрастает по мере развития науки. Новое знание в современной науке является результатом, внутри- и междисциплинарных взаимодействий.

Становление и развитие иммунологии как раздела фундаментальной биологии неразрывно связано с именами И.И. Мечникова, Роберта Коха, Пауля Эрлиха, Карла Ландштайна, Луи Пастера. Несмотря на более чем вековую историю и динамично развивающуюся науку (27 лауреатов Нобелевской премии за 110 лет), иммунология по-прежнему остается "молодой" наукой, во многом не до конца исследованным и независимым разделом биологии и медицины. Каждые четверть века происходят качественные революционные изменения в теоретических представлениях и теории иммунологии, начиная с открытия антител и фагоцитоза, клеточных реакций иммунитета, иммунологической толерантности и пересмотра многих других проблемных вопросов [1].

До настоящего времени, в силу сложности организации иммунной системы и дискуссионности значения тех или иных иммунных реакций в патогенезе иммунозависимых заболеваний, отсутствуют, созданные на основе механизма их действия, классификации иммунотропных препаратов. Обычно используются классификации по происхожде-

нию препаратов, например, растительные, экстракты иммунных органов, микробные иммуномодуляторы цитокины, которые, в принципе, важны, но не определяют механизм действия, не указывают "точку приложения" при введении препарата в организм [1, 2].

Некоторые иммунотропные препараты оказывают влияние, действуя не прямо на органы и клетки иммунной системы, а опосредованно, через нервную систему, вызывают активацию соответствующих структур мозга, влияющих на иммунные реакции. По этой причине, целесообразно разделить иммунотропные препараты прямого и непрямого действия, где эффект достигается за счет изменения нейрогуморальной регуляции и антиоксидантного действия, активации метаболических процессов в организме, стимуляции пролиферативных процессов и регенерации и т. д.

Одно из фундаментальных эмпирических обобщений современности состоит в том, что все кристаллические и биологические системы, начиная от биохимических макромолекул и кончая биосферой, представляют собой колебательные системы с собственными колебаниями. Колебательность биосистемы означает, что такая система находится в постоянном ожидании самых разных внешних воздействий и в постоянной готовности, так или иначе, ответить на эти воздействия. Следовательно, биосистема как бы выбирает возможные варианты взаимодействия с окружающим миром и варианты своих возможных ответов. Поэтому, видимо, внешние воздействия не ведут к пассивному изменению, а оказываются чем-то вроде пускового толчка, начиная с которого биосистема может выбрать одно изменение из спектра возможных. Именно поэтому резко возрастает роль случайных, и в том числе очень малых, воздействий и взаимодействий. Случайные взаимодействия оказываются необходимыми для нормальной жизнедеятельности биосистем, они и только они представляют материал и богатое поле выбора возможных вариантов ответов, они способны резко ускорить процесс самоорганизации и, следовательно, эволюции [3].

Данные исследования посвящены экспериментальному подтверждению существования макроскопической квантовой нелокальности на примере взаимодействия минеральной и органической форм жизни. Проведены поисковые исследования влияния кристаллического диоксида кремния, предварительно обработанного ЭМИ по программе частот "Альфа-Кварц", на белковый состав сыворотки крови лабораторных животных (2 овцы и 4 кролика).

Как было показано ранее [4], при обработке ЭМИ SiO₂, происходит возбуждение атомов кремния и кислорода. Анализ данных ЭПР, полученных в ИБХФ РАН им. М.Н. Эмануэля, образцов минералов "Альфа-Кварц", показывает изменение спин-орбитального взаимодействия электронов. Происходят существенные изменения энергетических параметров атомов кислорода и кремния внутри кристалла (данные спектрального рентгеновского микроанализа, полученные при поддержке ЦИАМ, г. Лыткарино, МО), это подтверждается и данными комбинационного рассеяния, полученными при активном содействии компании Renishaw (Великобритания) г. Москва.

Квантовое состояние электронов "Альфа-Кварц", через устройство сопряжения минерал – объект, дистантно-

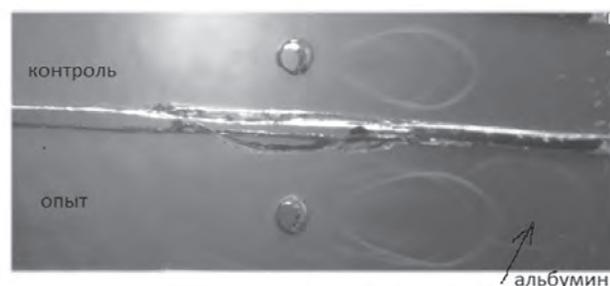


Рис.1. Имуноэлектрофореграмма. В лунках - образцы сыворотки крови кроликов, в траншеях - антисыворотка к гамма-глобулинам кролика.

Таблица 1. Зависимость оптической плотности водного раствора NaCl от квантового состояния внутренней среды

Объект	длина волны λ, (нм)						
	200	254	260	270	381	384	389
Опт.плотность D контроль	2,2815	0,0968	0,0942	0,0908	0,0511	0,0506	0,0503
Опт.плотность D опыт	2,3403	0,1082	0,1056	0,1022	0,0524	0,0518	0,0515
Δ, (%)	102,6	111,8	112,1	112,5	102,5	102,4	102,4

Таблица 2. Результаты статистического сравнения.

	Площадь	Средняя интенсивность	Коэффициент формы	Энтропия по изолинии	Длина изолинии
контроль	155	55	137	142	154
опыт	55	155	73	68	56
критерий	100	100	82	87	99
z-значение	3,78	3,78	2,419	2,797	3,704
p-значение	0,0001571	0,0001571	0,01556	0,005159	0,0002122

адресным методом передавалось на сам объект. Расстояние при этом составляло 350 км.

В аналогичных экспериментах [4], проводимых на бактериальной культуре, в непосредственной близости от объектов-реципиентов выставленные образцы деионизованной воды – "свидетели", существенно изменяли свои структурно-энергетические параметры, определяемые методами жидкостной хроматографии и дифференциальной кондуктометрии, при времени экспозиции (воздействия) более 21 суток.

Материалы и методы

В эксперименте было использовано:

– 2 овцы Романовской породы, возраст 6 лет (нелокальный метод воздействия SiO2 "Альфа-Кварц" на протяжении 4-х недель, расстояние 350 км);

– 4 кролика породы Советская шиншилла, возраст 1 год (4-х кратное введение 0,9 % водного раствора NaCl, обработанного нелокально SiO2 "Альфа-Кварц" на протяжении 6-ти недель, расстояние 350 км). После снятия воздействия в эксперименте с физиологическим раствором (ФР), контроль изменения структурно-энергетических параметров ФР проводился в течение 6 мес. по оптической плотности на спектрофотометре SHIMADZU UV-1800 в ультрафиолетовом диапазоне, кварцевые кюветы с толщиной светопоглощающего слоя 10 мм и методом газоразрядной визуализации (ГРВ) на программно-аппаратном комплексе "Камера ГРВ" [5, 6].

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что белковый спектр сыворотки опытного кролика был представлен тремя линиями преципитации, а контрольного - двумя (рис.1). Белок в сыворотке опытного кролика находился в зоне альбуминов и появился на иммунограмме только после 4-го введения обработанного физ. раствора. У опытной овцы также изменился белковый спектр сыворотки крови. Появились дополнительные линии преципитации в зоне гамма-глобулинов.

Известно, что при пропускании света через слой веще-

ства его интенсивность уменьшается. Уменьшение интенсивности является следствием взаимодействия световой волны с электронами вещества, в результате которого часть световой энергии передается электронам. Оптическая плотность (D) – это десятичный логарифм отношения интенсивности света, падающего на образец, к интенсивности света, выходящего из образца. В таблице 1 представлены результаты исследования оптической плотности ФР в ультрафиолетовом диапазоне до и после нелокальной обработки SiO2 "Альфа-Кварц" (контрольный и опытный образцы соответственно, температура 20°C).

Из таблицы видно, что образец физиологического раствора, прошедший нелокальное воздействие, имеет более высокую оптическую плотность. На спектре 250 - 270 нм эта разница существенна – более 10%. Поскольку замеры проводились в абсолютно одинаковых условиях, то увеличение коэффициента светопоглощения опытного образца могло произойти только из-за увеличения его внутренней энергии, структурированности, снижения энтропии внутренней среды.

Свечение объектов различной природы в электромагнитных полях высокой напряженности было обнаружено более 200 лет назад и с тех пор постоянно привлекало внимание исследователей. Большой вклад в исследование этого явления внесли в 30-х годах прошлого века советские учёные Семён и Валентина Кирлиан. Супруги Кирлиан экспериментировали с электромагнитным полем и зафиксировали свечение органических и неорганических объектов. Физическая природа обнаруженного явления состоит в том, что вокруг каждого объекта существует слабое электромагнитное поле, находящиеся в воздухе электроны, попадая в это поле, начинают ускоряться и ионизируют молекулы воздуха. Те, в свою очередь, начинают испускать фотоны в ультрафиолетовой части спектра. Поле "втягивает" частицы из объекта и усиливает их в газовом разряде [6,7].

Ниже представлены данные обработки ГРВ-грамм нелокального действия "Альфа-Кварц" на ФР с последующей неконтактной передачей потенциала на бидистиллированную воду (БДВ). Результаты статистического сравнения по критерию Стьюдента (таблица 2) образцов БДВ, экспонированных вблизи ФР, Тэ 33 суток. Выборка 1 – БДВ контрольный (К) – действия не оказывалось, выборка 2 – БДВ опытный (О) – нелокальное действие 4 мес., последствие 2 мес. В каждой выборке по 10 замеров, время подачи импульсов напряжения на электрод ГРВ камеры – 60 сек., величина напряжения – первый уровень, объём образца – 0,06 гр. с расположением в лунке стеклянного электрода. Температура образцов 20°C. Замеры проводились с использованием программы "GDV-Capture".

Из таблицы 2 видно, что образцы достоверно различимы, кроме того, полученные данные свидетельствуют о

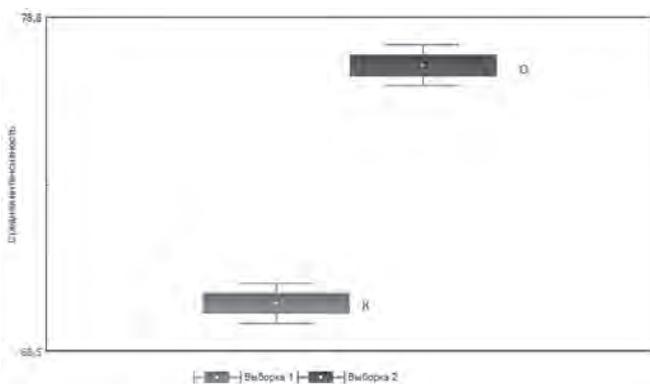


Диаграмма 1. Средняя интенсивность свечения

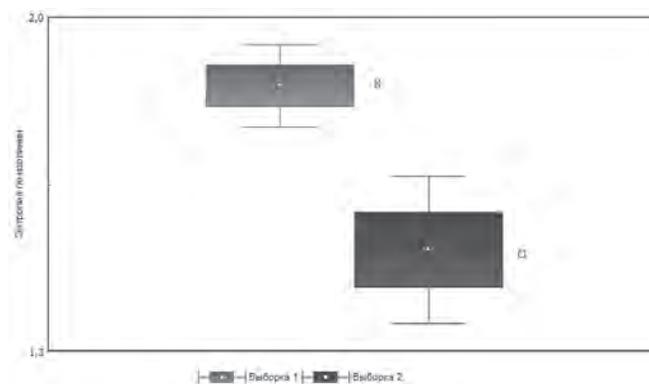


Диаграмма 2. Энтропия по изолинии

более высокой степени структурированности и энергетической насыщенности (диаграмма 1) образцов БДВ, экспонированных на ФР, подвергнутому нелокальному действию "Альфа-Кварц". Энтропия по изолинии (диаграмма 2), свидетельствует также о наличии в ФР информации, вероятно, определяющей биологические эффекты.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, макроскопическая квантовая нелокальность – реальное явление, нелокальное квантовое воздействие препарата "Альфа-Кварц" на удаленный макроскопический объект вызывает соответствующее изменение белкового состава сыворотки крови у лабораторных животных и структурно-энергетические изменения с уменьшением энтропии внутренней среды минеральных объектов.

В этом случае, становится возможным управление на квантовом уровне органической жизни процессами, происходящими в минеральной среде, которые в свою очередь, подвержены космо-геофизическим связям. В настоящий период крайнего истощения энергоресурсов планеты возникает необходимость перехода к новым энергиям, которые могут быть освоены людьми лишь при условии их высокого сознания, при соблюдении паритета во взаимоотношениях с Природой и соответствующем этическом поведении. Не случайно, именно в 20-м веке великими учёными – космостами была предложена новая энергетическая концепция мироздания, согласно которой Вселенная, Земля и человек есть сложная единая энергетическая структура, между частями которой происходит постоянный энергообмен, создавая возможность их эволюционного продвижения [8].

Список литературы

1. Лисяный Н.И. Проблемы иммунологии в свете доказательной медицины, г. Киев. <https://www.health-ua.org/>
2. Ездакова И.Ю. Актуальные направления ветеринарной иммунологии // Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел": Сб. науч. тр. - М:ВИЭВ. 2011. С.243-245.
3. Яхонтова Л. К., Зверева В. П. Основы минералогии гипергенеза: Учеб. пособие. Владивосток: Дальнаука, 2000.С.3.
4. Денисова Н.А. "В чем заблуждаются физики?", 2000. [newphysics.h1.ru> Denisova / Denisova.htm](http://newphysics.h1.ru/Denisova/Denisova.htm)
5. Кулагин М.В., Кузнецова К.Ю. и др. "Влияние SiO2 "Альфа-Кварц" на биообъекты. Нелокальные взаимодействия" //Материалы Международного Форума Научного совета Российской Федерации по экологии человека и гигиене окружающей среды, посвященного 85-летию ФГБУ "НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сысина" Минздрава России. 15-16 декабря 2016 г., М. 2016.С. 332-334.
6. Рахманин Ю.А., Стехин А.А., Яковлева Г.В. Биофизика воды: квантовая нелокальность в технологиях водоподготовки; регуляторная роль ассоциированной воды в клеточном метаболизме; нормирование биоэнергетической активности питьевой воды. М.: ЛЕНАНД, 2016 - 352 с
7. Коротков Г.К. "Загадки живого свечения" //Материалы X Международного научного Конгресса по ГРВ Биоэлектрографии "Наука Информация Сознание", Тезисы. Сп.-Б., 7 - 2006. С. 7 - 10.
8. Урикова Н.В. Факторы, влияющие на экологическое состояние системы, [lib-rus.ru>URIKOVA/newekolo.txt.html](http://lib-rus.ru/URIKOVA/newekolo.txt.html).

УДК 575:57.01/08

К вопросу об иммуномодулирующих свойствах меда

Курманова А. Ю. – аспирант отдела клеточной биотехнологии

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко, 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1, ayana788@mail.ru

Аннотация. В статье изложены результаты начального этапа исследования действия биогенных веществ насекомых на живые системы, на примере меда. Проанализированы исторические сведения об иммунологическом воздействии меда на человека, а также значение и классификация меда в жизни древнего человека, в которой прослеживается учет не только экологических, но и этических отношений – соблюдения закона Божьего, с четким разделением понятий "здоровый-нездоровый", "лекарство-яд" и т.п. Это требует дальнейшего анализа применительно к живым организмам, которые согласно Библии подразделялись на чистые и нечистые. Показана важность учета происхождения продукта и характера взаимоотношений продуцента биогенного вещества (меда) и его потребителя, что оказывает влияние на иммунологические реакции последнего. Такие отношения позволяют конструировать модельные эколого-генетические системы для эксперимента и решения практических задач в различных областях, например, в экологической иммунологии, в нутригеномике, нутригенетике и организации здорового питания животных и человека. Предложено проведение дальнейших экспериментов с биогенными веществами насекомых на базе Всероссийской специализированной коллекции постоянных линий клеток беспозвоночных, с учетом экологических взаимоотношений организмов-продуцентов (донора вещества) и их потребителей (донора клеток). Результаты исследований могут использоваться для построения моделей иммуно-

модулирующего воздействия продуктов пчеловодства, продуктов питания, медицинских препаратов, а также для оптимизации питательных сред в клеточной биотехнологии.

Ключевые слова: мед, продукты пчеловодства, иммуномодуляторы, исторические сведения, библейское мировоззрение, пищевые связи, экологические отношения, продукты питания, питательные среды, культуры клеток, беспозвоночные.

To the question about the immunomodulatory properties of honey

Kurmanova A. Yu.

The article describes the results of the initial stage of the researching the effects of biogenic substances of the insects on living systems, the example of bee honey. The historical data on the immunological effects of honey on the human body, as well as the value and classification of honey in the life of ancient people is analyzed. That takes into account not only environmental, but also ethical relationships – respecting the laws of God, with a clear separation of the concepts "healthy-unhealthy", "remedy-poison" etc. This requires further analysis as it relates to living organisms, which according to the Bible were divided into clean and unclean. The importance of taking into account the origin of the product and the character of the relationship between nutrient producer (honey) and its customer is shown; that may have an impact on immunological reaction of the latter. These relationships enable us to design a model ecological-genetic system for experiment and practical applications in various fields, such as the ecological immunology, nutrigenomics, nutrigenetics and healthy animal and human nutrition. Further experiments based on Russian specialized collection of permanent invertebrates' cell lines are proposed to do with the nutrients of insects taking into account ecological relationships of organisms-producers (the extracts' donor) and its consumer (cell line donor). The results of the research can be used to build models of immunomodulating effects of bee products, foods, medicines, as well as to optimize the culture medias in cell biotechnology.

Key words: honey, products of honey bees, immunomodulators, historical information, biblical worldview, nutritive connections, ecological relations, nutrients, nutritive media, cell cultures, invertebrates.

Известно, что мед оказывает лечебное и иммуномодулирующее действие на другие организмы в различных диапазонах: от антигенного воздействия до повышения резистентности к инфекционным возбудителям. Мед может повысить показатели иммунологической реактивности (фагоцитарную активность, содержание гемоглобина, число тромбоцитов) и изменить в благоприятную сторону чувствительность к действию других аллергенов и антигенов. Но все чаще говорят об аллергических реакциях на мед, что связано с различными факторами. Необходимость проработки методологической части исследования: разрешения спорных формулировок понятий "правильный-неправильный", "положительный-отрицательный", "здоровый-нездоровый", "лекарство-яд" привела к рассмотрению истории изучения данного вопроса с древнейших времен, для построения модели дальнейшей экспериментальной работы.

Часть 1. Исторические сведения о воздействии меда на организм человека. В мировой литературе встречаются сообщения о ядовитом меде. Первым описывает массовое отравление медом древнегреческий полководец и писатель Ксенофонт в сочинении "Отступление 10 000 греков". Весной 401 г. до н. э. его отряд остановился в местности с развитым пчеловодством в Малой Азии. Воины, наевшись меда, стали проявлять признаки пищевого отравления, терять сознание, это длилось в течение четырех дней. В 1877 г. ядовитый мед был найден в долине Батуми, недалеко от места, где пострадало войско Ксенофонта. Население этого края использует пчел только для получения воска, так как местный мед вызывает отравление [5].

В Болгарии, в Закавказье и на Черноморском побережье отмечено отравление людей пчелиным медом с растения рододендрон понтийский, который угнетающе действует на организм из-за содержания гликозида андромедотоксина. Такой "пьяный" мед вызывает головную боль, рвоту, потемнение в глазах, а иногда и обморочное состояние, то есть признаки, характерные для сильного опьянения [5].

В начале XX столетия ботаник Р.Э. Регель установил, что мед рододендрона вполне съедобен и имеет характерный терпкий вкус. Оказалось, что нагреванием до температуры 46° С при низком давлении можно разрушить ядовитые вещества, при этом вкусовые свойства сохраняются, что и делают в некоторых горных деревнях Кавказа [5].

Известные слова Парацельса (1493): "Всё есть яд, и ничто не лишено ядовитости; одна лишь доза делает яд незаметным" в популярном изложении звучат иначе: "Всё – яд, всё – лекарство; то и другое определяет доза". Таким образом, любое биологически активное вещество, в том числе мед, при определенном методе использования может быть как полезным, так и вредным. Необходим учет факторов, определяющих его полезные или вредные свойства.

Часть 2. Значение и классификация меда в жизни древнего человека. Следующей задачей был анализ понятия "мед", его значения и его классификации в древних источниках, с помощью информационных технологий. Для этого были использованы мобильные приложения с библейскими текстами в классических переводах, разработанные группами MartinVillar.com и Life.Church (YouVersion.com) [1].

При поиске слова "мед" система выдает все цитаты с этим словом, которых оказалось более 50. Далее найденная информация была собрана в таблицы и подвержена

анализу в контексте употребления каждого выражения о меде [4]. Обобщенный вид таблицы приведен ниже.

Мед показан в Библии в двух значениях: прямом и переносном. В каждом из вариантов есть два пути получения, использования или обращения с медом - положительный со знаком "+", и отрицательный, со знаком "-". Всего 8 классов, с некоторыми подклассами [4].

В прямом смысле мед – продукт, представляющий пищевую и лекарственную ценность, а также неотъемлемый компонент здорового биоценоза – "земли обетованной", "где течет молоко и мед". Мед можно есть умеренно (+), но также и злоупотреблять им (-). При этом, в зависимости от происхождения, это может быть как "чистый" продукт – к примеру, дикий мед, которым питался Иоанн Креститель (+), так и "нечистый" – мед из трупа льва, который нашел Самсон (-) [1].

В переносном смысле мед – некий образ нематериальных явлений – информации ("приятная речь – сотовый мед, сладка для души и целебна для костей") [1, Притчи, гл. 16] и взаимоотношений, которые могут быть как истинными, чистыми, так и ложными, незаконными: "Ибо мед источает уста чужой жены, и мягче елея речь ее, но последствие от нее горьки, как полынь, остры, как меч обоюдоострый" [1, Притчи, гл. 5]. Также "мед" как информация, указывает на истину, законы Бога и Его послания: "Как сладки гортани моей слова Твои! лучше меда устам моим. Повелениями Твоими я вразумлен; потому ненавижу всякий путь лжи" [1, Псалтирь, гл. 118]; "и сказал мне (Бог): сын человеческий! напитай чрево твое и наполни внутренность твою этим свитком, который Я даю тебе; и я съел, и было в устах моих сладко, как мед" [1, Иезекииль, гл. 3].

Так, видим междисциплинарный и системный подход в оценке качества меда в древних текстах, с учетом не только экологических, но и этических отношений - соблюдения закона Божьего, с четким разделением понятий "здоровый-нездоровый", "лекарство-яд" и т.п. Это требует дальнейшего анализа применительно к живым организмам, которые согласно Библии подразделялись на чистые и нечистые [1]. Были замечены параллели: положительное воздействие "меда"-истины на жизнь человека и дикого, чистого меда на его здоровье; отрицательное воздействие на человека "меда" беззакония и лжи, нечистого меда, а также злоупотребления каким бы то ни было медом.

Выводы

Таким образом, видна важность учета происхождения продукта и характера взаимоотношений продуцента биогенного вещества (меда) и его потребителя, что оказывает влияние на иммунологические реакции последнего. Такие отношения позволяют конструировать модельные экологическо-генетические системы для эксперимента и решения практических задач в различных областях, например, в экологической иммунологии, в нутригеномике, нутригенетике и организации здорового питания животных и человека; а также для решения одной из основных проблем клеточной биотехнологии – оптимизации питательных сред для культивирования клеток.

В лабораториях ВИЭВ ведутся работы по изучению экологических связей медоносной пчелы [3, 8], было проведено исследование образцов медов из разных районов Республики Алтай на предмет их действия на рост культуры клеток насекомых Sf9k [2], изучено действие биологически активных продуктов пчеловодства (мед, пыльца, перга, маточное молочко) на митотическую активность *in vitro* [7].

Работа проводится на основе Всероссийской специализированной коллекции постоянных линий клеток беспозвоночных, созданной профессором, д.б.н. В.Т.Какпаковым (1937–2012). Коллекция содержит 20 постоянных клеточных линий от представителей различных отрядов насекомых, которые позволяют получать большое количество одинаковых по геному клеток, доступных для экспериментального воздействия, удобных при изучении врожденного иммунитета насекомых, иммуногенного действия БАВ, индуцибельной экспрессии генов [6]. Следующим этапом ра-

Таблица 1. Значение меда в Библии.

Прямое				Переносное			
Продукт		Компонент биоценоза		Знание		Отношения	
+	-	+	-	+	-	+	-

боты предстоит экспериментальное воздействие биогенными веществами насекомых, в том числе - медом, на различные культуры клеток с учетом экологических отношений донора клеток и донора вещества.

Список литературы

1. Библия. Книги Священного Писания канонические. [Электронный ресурс]. - URL: <https://www.bible.com/ru> (дата обращения: 05.2016).
2. Какпаков, В.Т. Клеточная тест-система SF9K для выявления качества питательных сред и биобезопасности продуктов пчеловодства/В.Т.Какпаков, В.А.Васильев, А.Ю. Курманова//Пути совершенствования агротехнологий на Северо-Западе России. Псков, 2010. С. 261-262.
3. Коновалова Т.В. Видовой состав жуков (Coleoptera), связанных с гнездами медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.)/Т.В. Коновалова//Труды ВИЭВ, том 76. М.: ГНУ ВНИИЭВ им. Я.П. Коваленко, 2010. С. 172-178.
4. Курманова А.Ю. Междисциплинарный подход к изучению меда/А.Ю. Курманова// Экологические проблемы третьего тысячелетия: сборник научных трудов Международной молодежной научно-практической конференции. Москва, 25-

26 ноября 2016 г. - М.: РУДН, 2016. ил. С.22-25.

5. Леншин А.А. Опасный мед//Газета "Садовод". - 2010. - №12. [Электронный ресурс]. - URL: <http://gazetasadovod.ru/hels/601-opasnyj-med.html> (дата обращения: 05.2016).
6. Сайфутдинова З.Н. Культуры клеток беспозвоночных в решении биотехнологических и ветеринарных проблем пчеловодства//З.Н. Сайфутдинова, В.Т. Какпаков// Материалы III международного форума пчеловодов "Медовый мир". - 2012. [Электронный ресурс]. - URL: <http://www.apeworld.ru/1353573217.html> (дата обращения: 10.2016).
7. Сайфутдинова З.Н. Влияние продуктов пчеловодства (пыльцы, перги и маточного молочка) на рост культуры клеток позвоночных и беспозвоночных животных/З.Н. Сайфутдинова, Т.В. Гальнбек, В.А. Васильев//Ветеринария и кормление, №4-2013. - М.: Общество с ограниченной ответственностью "Агентство творческих технологий", 2013. С. 54-55.
8. Сайфутдинова, З.Н. Системный подход в изучении отношений медоносных пчел в биоценозе/З.Н. Сайфутдинова, Ю.А. Букурова//Труды ВИЭВ, том 78. М.: ГНУ ВНИИЭВ им. Я.П. Коваленко, 2015. С. 343-349.

УДК 619:616-084:579.843.95:636

Обзор современных средств специфической профилактики пастереллёза и манхеймиоза сельскохозяйственных животных

Лаишевцев А. И.¹ – научный сотрудник лаборатории микробиологии с музеем типовых культур, E-mail: A-Laishevtsev@bk.ru

Капустин А. В.¹ – кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии с музеем типовых культур, E-mail: kapustin_andrei@mail.ru

Пименов Н.В.² – доктор биологических наук, профессор кафедры биологии и патологии мелких домашних, лабораторных и экзотических животных, E-mail: pimenov-nikolai@yandex.ru

¹ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко", Рязанский проспект 24 к.1. 109428 Москва, Россия, +7(495)739-99-05

²ФГБОУ ВО "Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина", ул. Академика Скрябина, д. 23, 109472 Москва, Россия, +7(495)377-91-57

Аннотация. Проблема импортозамещения требует принятия мер направленных на разработку, производство и внедрение отечественных средств специфической профилактики инфекционных болезней животных, с целью частичного или полного отказа от импортной продукции. Данная необходимость обуславливается важностью достижения и обеспечения продовольственной безопасности и независимости страны, а в первую очередь отраслей агропромышленного комплекса, как основного источника продуктов питания. В данной работе проанализированы сведения обо всех зарегистрированных на территории РФ средствах специфической профилактики пастереллёза и манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота с обоснованием возможности отказа от импортных вакцин.

Анализ номенклатуры иммунобиологических лекарственных средств зарубежного и отечественного производства для ветеринарного применения, зарегистрированных и применяемых в Российской Федерации с целью профилактики инфекционных болезней животных разной этиологии, в том числе *Mannheimia haemolytica* и *Pasteurella multocida* показал, что отечественные биологические предприятия производят аналоги большинства препаратов, поступающих из-за рубежа. Однако следует учесть, что

большинство импортных препаратов являются ассоциированными, что позволяет в значительной степени упростить схемы вакцинопрофилактики инфекционных болезней животных, уменьшив количество обработок. Замена их отечественными монопрепаратами или вакцинами с меньшим количеством компонентов приведет к увеличению кратности обработок животных, а соответственно к уменьшению их продуктивности.

Ключевые слова: Манхеймиоз, пастереллез, специфическая профилактика, отечественные вакцины.

The review of modern agents of specific prevention of pasteurellosis and mankheimiosis of farm animals

Laishevtcev A. I., Kapustin A.V., Pimenov N.V.

The problem of import substitution demands taking measures referred on development, production and introduction of blighty agents of specific prevention of infectious diseases of animals, for the purpose of partial or full refusal of import production. This necessity is caused by importance of achievement and ensuring food security and independence of the country, and first of all industries of agro-industrial complex as main source of food. In this article are presents the results of data on all agents of specific prevention of pasteurellosis and a manheimiosis registered in the territory of the Russian Federation cattle and small cattle with justification of a possibility of refusal of import vaccines are analyzed. The analysis of the nomenclature of the immunobiological medicines of foreign and domestic production for veterinary use registered and applied in the Russian Federation for the purpose of prevention infectious diseases of animals in a different etiology including Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida showed that the domestic biological enterprises make analogs of the majority of the drugs arriving from abroad. However, it is necessary to consider that the majority of import drugs are associated that allows to simplify substantially schemes of a vaccinal prevention of infectious diseases of animals, having reduced the number of processings. Substitution with their domestic monodrugs or vaccines with smaller quantity of components will lead to augmentation of frequency rate of processings of animals, and respectively to decrease of their efficiency.

Key words: Манхеймиоз, пастереллез, специфическая профилактика, отечественные вакцины.

Обеспечение продовольственной безопасности является важной задачей любого государства, главной целью которого является гарантированное стабильное снабжение населения страны продовольствием, с минимизацией

влиятельный неблагоприятных внутренних и внешних факторов. В первую очередь продовольственная безопасность зависит от эффективности агропромышленного комплекса, в котором достаточно давно наблюдается неоднозначная ситуация. Так, имея огромный потенциал самостоятельного развития и природные ресурсы пока не удается в полной мере обеспечить население России необходимыми продуктами и сырьём, что приводит к неизбежности импортирования, а по некоторым продуктам животного происхождения – к доминированию импорта над собственным производством. Потребность в иностранных продуктах и товарах подрывает продовольственную независимость нашей страны и развитие сельскохозяйственной отрасли, делая её не конкурентоспособной среди стран с развитыми агропромышленными технологиями.

Для обеспечения продовольственной безопасности и независимости РФ не достаточно просто отказаться от ввозимой продукции, необходимо имеющийся дефицит продукции обеспечить собственными конкурентоспособными товарами. И этот аргумент одинаково приложен к товарам, необходимым для производства, в частности, для ветеринарных препаратов. Так, для обеспечения потребностей АПК и его независимости от иностранных производителей необходимо проанализировать и рассмотреть возможность частичного или полного отказа от иностранных средств специфической профилактики инфекционных болезней животных.

В животноводческой отрасли значимое место среди инфекционных заболеваний занимает пастереллез, встречаемый у всех видов сельскохозяйственных животных и птицы. Эффективность борьбы с пастереллезом имеет прямую зависимость от профилактических мероприятий, направленных на борьбу с данной инфекцией. При этом наибольшее внимание следует уделять специфической профилактике – вакцинации, так как именно вакцинация способствует достижению наибольшего эффекта нераспространения заболевания. Тем не менее, проведение профилактических мероприятий не всегда позволяет достичь необходимого результата, что связано с меняющейся эпизоотической обстановкой и циркуляцией новых серовариантов и видов возбудителей. Например, среди пастереллезной инфекции чаще регистрируют проблему увеличения случаев индикации *Mannheimia haemolytica*, при выделении которой не проводятся специфические лечебно-профилактические мероприятия как при заболевании, вызванном *Pasteurella multocida* [3, 4]. Данный вопрос активно рассматривается в ряде зарубежных стран, и уже было подтверждено отсутствие возможности формирования иммунитета к *Mannheimia haemolytica* при использовании вакцин, имеющих в своём составе *Pasteurella multocida* [5]. В связи с этим актуальным является обзор современных отечественных и зарубежных препаратов, способных к единовременному формированию иммунитета у животных к *Mannheimia haemolytica* и *Pasteurella multocida*, как наиболее часто встречаемым возбудителям респираторных заболеваний бактериальной природы на территории РФ.

Целью данной работы является изучение возможности полного или частичного отказа российских производителей сельскохозяйственной продукции от импортных средств для специфической профилактики пастереллеза и манхей-

миоза крупного и мелкого рогатого скота.

Результаты и обсуждение. На данный момент в России зарегистрировано большое количество вакцин против пастереллеза и манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота, при этом стоит обратить внимание на то, что основное количество данных препаратов в действительности производится на территории РФ (см. таблицу №1).

Основным, интересующим нас, критерием к данным препаратам являлось наличие в составе антигенов *P. multocida* и *M. haemolytica*.

Среди отечественных препаратов "Формолвакцина против пастереллеза жвачных", "Вакцина эмульгированная против пастереллеза", "Бовирет", а также "Пастос" не содержат антиген *M. haemolytica*, поэтому они не могут быть использованы для предупреждения манхеймиоза. Оставшиеся три отечественных биопрепарата: "Пульмовак", "Пастервакарм" и "Комбовак-Р" можно использовать при профилактике манхеймиоза и пастереллеза, но стоит отметить, что "Пульмовак" и "Пастервакарм", являясь относительно новыми вакцинами, не успели себя зарекомендовать с точки зрения практического применения, в отличие от "Комбовак-Р". В качестве недостатка вакцин "Комбовак-Р" и "Пастервакарм" можно привести отсутствие возможности использования их для вакцинации мелкого рогатого скота, не смотря на то, что данный вид животных подвержен манхеймиозу и пастереллёзу.

Иностранные препараты Ван Шот Ультра 8 и Бовилис® Бовипаст RSP по антигенному составу мало адаптированы для лечения респираторных инфекций пастереллезной этиологии на территории России, так как имеют в составе антиген *M. haemolytica*, но не содержат *P. multocida*, являющийся наиболее распространённым на территории нашей страны. Ввиду ранее сказанного препарат Ван Шот Ультра 8 (содержащий 7 клостридиозных антигенов и антиген *Mannheimia haemolytica*) целесообразнее, в первую очередь, использовать при профилактике клостридиозных инфекций, в то время как Бовилис® Бовипаст RSP (содержащий два вирусных антигена и *Mannheimia haemolytica*) – для профилактики респираторных вирусных заболеваний. Единственным импортным препаратом содержащий оба интересующие нас антигена, является Бар Вак® 10[2].

Препарат Бар Вак® 10, состоящий из 6 антигенов клостридий, а также из *Mannheimia haemolytica* и *Pasteurella multocida* может рассматриваться прямым конкурентом отечественным препаратам для единовременной профилактики пастереллеза и манхеймиоза жвачных животных. В качестве Российской альтернативы данного препарата стоит считать вакцина "Комбовак-Р". Кроме того, если принять к сведению, что препараты "Пульмовак" и "Пастервакарм" зарегистрированы в 2015–2016 году, это стоит считать хорошим показателем реализации программы импортозамещения, и позволяет обеспечить Российский агропромышленный комплекс собственными средствами профилактики инфекционных болезней животных.

С точки зрения практического применения стоит считать, что "Комбовак-Р" более адаптирован к применению в условиях России, так как направлен на профилактику ряда респираторных заболеваний вирусной и бактериальной этиологии, в частности инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи и вирусной респираторно-син-

Таблица №1. Зарегистрированные на территории Российской Федерации средства специфической профилактики пастереллеза и манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота на период 2017 года

Препарат, фирма производитель, страна производитель	Для КРС	Для МРС	Антиген <i>P. multocida</i>	Антиген <i>M. haemolytica</i>
Пульмовак - ФКП "Ставропольская биофабрика", Россия	+	+	+	+
Пастервакарм - ФКП "Армавирская биофабрика", Россия	+	-	+	+
Формолвакцина против пастереллеза жвачных - ФКП "Армавирская биофабрика", Россия	+	+	+	-
Вакцина эмульгированная против пастереллеза - ООО "Агровет", Россия	+	+	+	-
Комбовак-Р - ООО "Ветбиохим", Россия	+	-	+	+
Бовирет - ФКП "Ставропольская биофабрика", Россия	+	-	+	-
Пастос - ФКП "Ставропольская биофабрика", Россия	-	+	+	-
ВанШотУльтра 8 - "Zoetis Inc.", США	+	-	-	+
Бовилис® Бовипаст RSP - "Intervet International B.V.", Нидерланды	+	-	-	+
Бар Вак® 10 - "Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH", Германия	+	+	+	+

цитиальной инфекции, а также пастерелллёза вызванного сероварами А, В, Д и манхеймиоза вызванного *Mannheimia haemolytica*. Кроме того, на фоне учащающихся случаев выделения бактерий вида *Mannheimia haemolytica* от животных, препарат становится уникальным в отношении принципа профилактирования манхеймиоза. Поскольку манхеймиоз является факторным заболеванием, зависящим от наличия первичного вирусного антигена или стрессового воздействия, то единовременная вакцинация от данных болезней является средством достижения максимального профилактического эффекта [1, 6].

Препарат "Бар Вак® 10" менее адаптирован для использования в качестве средства профилактики респираторных болезней животных, так как основные его компоненты являются анатоксины против клостридиозов.

Заключение

Проведённый анализ состояния обеспеченности АПК России средствами специфической профилактики пастерелллёза и манхеймиоза отечественного производства позволяет утверждать о возможности полного отказа от использования аналогичных импортных препаратов. Сложности после разработки вакцины возникают при внедрении её в практическое использование, т.к. требует от российских производителей немалых усилий для восстановления доверия к себе со стороны потребителей, длительное время живущих по доктрине "лучше иностранное, чем отечественное". Этот стереотип в последнее время является не совсем достоверным. Кроме того, при выборе импортных средств и товаров для агропромышленного комплекса, стоит принимать во внимание, что импортозамещение является вопросом национальной безопасности и независимости страны. Среди препаратов Российского и импортного про-

исхождения для вакцинации против пастерелллёза и манхеймиоза крупного рогатого скота, наибольший профилактический эффект сможет продемонстрировать препарат "Комбовак-Р", что обуславливается его антигенным составом.

Список литературы

1. Laishevcev A.I. Features of biochemical identification and differentiation of *Mannheimia haemolytica*. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Т. 54. № 6. С. 70-77.
2. Pimenov N. Etiology and clinico-morphological manifestation of anaerobic enterotoxaemia of young cattle/N. Pimenov, Y. Kolesnikova, A. Laishevchev, M. Shariati, A. Glinushkin, A. Goncharov//International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy. -2016. -№7 (2). -P. 228-231.
3. Капустин А.В. Диагностика пастерелллёза сельскохозяйственных животных, птиц и пушных зверей. Методические указания. ФГБНУ ВИЭВ им. Коваленко Я.Р. 2016
4. Лаишевцев А.И. Капустин А.В. Pasteurellosis of cattle caused by *Mannheimia haemolytica*.// Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences, Т.52. №4. Стр. 3-12 2016г.
5. Лях Ю.Г. Распространение пастерелллёза в Беларуси и пути его ликвидации.// Ученые записки учреждения образования "Витебская ордена "Знак почета" государственная академия ветеринарной медицины". 2013. Т. 49. №2-1. С. 96-101.
6. Тухфатова Р.Ф. Средства и методы лечения молодняка сельскохозяйственных животных при желудочно-кишечных и респираторных болезнях смешанной этиологии. -учебно-методическое пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению подготовки (специальности) 36.05.01-Ветеринария (квалификация (степень) "ветеринарный врач")/ Москва, 2015.

УДК 619:616.98:578.835.2:616-085.371

Профилактическая иммунизация животных - важный элемент стратегии обеспечения благополучия страны по ящуру

Лозовой Д.А. - кандидат ветеринарных наук, директор, e-mail: mail@arriah.ru

ФГБУ "Федеральный центр охраны здоровья животных" (ФГБУ "ВНИИЗЖ"), 600901, г. Владимир, Россия, тел. (4922) 26-38-77

Аннотация. Описана эпизоотическая ситуация по ящуру в мире и России в 2015-2016гг., в том числе вспышки ящура в ряде стран Среднего Востока, обусловленные вирусом ящура типа А новой генетической линии G-VII. Показана эффективность инактивированных вакцин, приготовленных с использованием новых штаммов вируса ящура, обусловивших последние вспышки ящура на территории России. Представлены объемы профилактической вакцинации животных против ящура в 31 субъекте противоящурной буферной зоны России.

Ключевые слова: эпизоотическая ситуация, профилактическая иммунизация животных, вирус ящура.

Preventive immunization of animals - significant element of the strategy for ensuring FMD freedom of the Russian federation

Lozovoy D.A.

FMD epidemic situation in the world in 2015-2016 including FMD outbreaks in some Middle Eastern countries caused by type A G-VII genetic line FMD virus is described in the paper. Efficacy of inactivated vaccines produced on the base of new FMDV strains responsible for the last FMD outbreaks in the

Russian Federation is shown. Preventive anti-FMD vaccination coverage of animals in 31 Subjects included in the RF buffer zone is presented.

Key words: epidemic situation, preventive immunization of animals, FMD virus.

Широкое распространение ящура на обширной территории СССР в послевоенные годы диктовало необходимость создания противоящурных вакцин, способных вызывать у животных напряженный иммунитет и обеспечивающих их защиту. Во Всесоюзном институте экспериментальной ветеринарии, который являлся головным научным ветеринарным центром в стране, были начаты исследования по разработке противоящурных инактивированных вакцин (ГОАЛ-вакцина, лапинизированная, фреоновая, афтозная вакцина) (Ратнер Л.С., Грибанов В.Н., Малахов А.Г., Климов Н.М. и др.) [1]. Эти исследования были расширены после создания в ВИЭВ лаборатории иммунологии и назначения в 1955г. директором ВИЭВ академика Коваленко Я.Р. (Сергеев В.А., Лебедев А.И., Авилов В.С., Салажов Е.Л. и др.). Последующие обширные и всесторонние исследования по совершенствованию существующих и созданию новых противоящурных культуральных инактивированных сорбированных и эмульсионных вакцин были продолжены в специализированном Всесоюзном научно-исследовательском ящурном институте (Дудников А.И., Бондаренко А.Ф., Гусев А.А., Михалишин В.В., Мамков Н.С., Улупов Н.А., Онуфриев В.П., Бурдов А.Н., Диев В.И., Захаров В.М., Нерсисян С.Е. и др.) [3]. В институте, а затем и на биофабриках было организовано производство вакцин в необходимых количествах. Это позволило расширить зоны вакцинации животных, по сути дела перейти к сплошной профилактической вакцинации, что способствовало ликвидации эпизоотий ящура в стране и созданию устойчивого благополучия по данной инфекции. Это было отмечено в 1996 г. при вручении Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники группе ветеринарных специали-

стов, в том числе ведущим сотрудникам ФГУ "ВНИИЗЖ" (Гусев А.А., Дудников А.И., Шажко Ж.А.). По мере улучшения эпизоотической ситуации в стране объемы профилактической вакцинации животных против ящура сокращались [7].

В настоящее время, несмотря на принимаемые меры борьбы, эпизоотическая ситуация по ящуру в мире продолжает оставаться напряженной. Ящур относится к особо опасным трансграничным высококонтагиозным вирусным заболеваниям животных и подлежит обязательной нотификации. В соответствии с современной международной классификацией он включен в список болезней МЭБ в категорию "Болезни и инфекции и инфекации нескольких видов животных", т.к. им могут болеть сельскохозяйственные и дикие животные более 100 видов, принадлежащих к 33 семействам, относящихся к 14 отрядам (КРС, МРС, свиньи, буйволы, верблюды, яки, олени, козули, лоси, кабаны и др.) [2,4,9].

По официальным данным, в 2015-2016 гг. неблагополучными по ящуру были 64 страны, из них 27 азиатских, 35 африканских и 2 европейских. При этом регистрировали ящур 6 известных типов, в том числе типа О - в 38 странах, А - в 21, Азия-1 - в 6, САТ-1 - в 11, САТ-2 - в 12, САТ-3 - в 2, а в 13 странах тип возбудителя не был установлен. В ряде государств выделяли вирус ящура 2-3-х типов (Афганистан, Казахстан, Камбоджа, Китай, Монголия, Малайзия, Иран, Пакистан, Турция, Египет), а в отдельных - 4-5 типов (Бенин, Кения, Танзания, Эфиопия). Некоторые страны официально сообщали в МЭБ о возникающих ежегодно десятках и сотнях ящурных очагов разных типов [11,12]. Необходимо отметить, что вспышки последних лет были обусловлены в основном антигенно измененными штаммами вируса ящура, в связи с чем актуальным является оперативное выделение и изучение антигенного и генетического соответствия эпизоотических изолятов производственным штаммам, используемым для изготовления вакцин. Примером может служить выявление нового штамма вируса ящура типа А, генотипа G-VII, в ряде стран Среднего Востока (Турция, Иран, Саудовская Аравия). На основании результатов изучения этого штамма во Всемирной референтной лаборатории МЭБ по ящуру (WRL-FMD, Пирбрайт, Великобритания) сделано заключение, что противоящурные вакцины, изготовленные с использованием ранее применяемых штаммов вируса типа А, не эффективны или недостаточно эффективны против нового штамма [11].

В декабре 2015 г. в Армении, на границе с Турцией была отмечена вспышка ящура среди КРС и свиней. При детальном исследовании в ФГБУ "ВНИИЗЖ" в доставленном патматериале от КРС и свиней был установлен вирус ящура типа А генотипа G-VII, который после адаптации к культурам клеток и соответствующей подготовки был депонирован и использован для изготовления противоящурных вакцин. Разработанная в ФГБУ "ВНИИЗЖ" вакцина в марте 2016 г. была поставлена в Армению и применена с положительным эффектом [11,12].

Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации за последние 10 лет характеризуется в основном единичными вспышками заносного ящура типов О и А. Россия после ликвидации ящурных очагов, возникших в 2005-2006 гг. в Хабаровском и Приморском краях, Амурской и Читинской областях, граничащих с Китаем, вследствие заноса на их территории экзотического вируса ящура типа Азия-1, в 2007-2009 гг. была благополучной по этой болезни. Однако в последующем в 2010-2012 гг. в Забайкальском и Приморском краях, граничащих с Китаем и Монголией, были зарегистрированы 5 вспышек ящура типа О.

В 2013 г. в России в 4 пограничных с Китаем районах Забайкальского края отмечено 9 вспышек ящура [5,6,8]. При лабораторном исследовании в ФГБУ "ВНИИЗЖ" отобранных в этих районах проб патологического материала от КРС и свиней было установлено, что вызвавшие заболевание изоляты относятся к вирусу ящура типа А генетической линии "Юго-Восточная Азия" (SEA-97). Еще 6 вспышек, обусловленных этим вирусом, было зарегистрировано в Амурской области, граничащей с Китаем. По данным Все-

мирной референтной лаборатории МЭБ по ящуру, выделенные в России, а также в Казахстане и Монголии изоляты на 99% идентичны китайским изолятам A/QHXN-CHA-2013-B и A / GDMM-CHA-2013S.

В июне 2013 г. заболевание ящуром среди КРС отмечено и на Северном Кавказе России сначала в Карачаево-Черкесской Республике, граничащей с Грузией, а затем в Краснодарском крае и в Кабардино-Балкарской Республике, граничащими с Карачаево-Черкесской Республикой. При лабораторном исследовании проб патологического материала от животных из этих неблагополучных регионов, проведенном в ФГБУ "ВНИИЗЖ", был выделен вирус ящура типа А, но относящийся к генетической линии A/Иран/05. Изоляты данной генетической линии в 2013 г. вызывали вспышки ящура на территории стран Ближнего Востока [6]. Следует отметить, что ящур типа А в 2013 г. возник в России после 20-летнего отсутствия.

В 2014 г. в Забайкальском крае были отмечены единичные случаи заболевания КРС ящуром типа А в двух селах и типа О в одном селе Приаргунского района, граничащего с Китаем, а также типа А в одном селе Ононского района, граничащего с Монголией. Выделенные при этом изоляты вируса типа А отнесены к генетической группе A/SEA-97, а типа О - к генетической линии O/PanAsia [8,10].

В мае 2014 г. ящур типа О получил распространение среди свиноголовья в Спасском районе Приморского края, граничащем с Китаем. При лабораторном исследовании в ФГБУ "ВНИИЗЖ" по результатам нуклеотидного секвенирования с последующим филогенетическим анализом выделенный из патматериала от больных свиней изолят отнесен к генетической линии "Юго-Восточная Азия" O/SEA/Mya-98. Оперативное применение для вынужденной вакцинации в угрожаемой зоне эмульсионной моновалентной вакцины типа О производства ФГБУ "ВНИИЗЖ" позволило купировать и ликвидировать ящур в пределах неблагополучного района.

Возникновение ящура в 2013-2014 гг. в субъектах Российской Федерации, граничащих или расположенных вблизи с неблагополучными странами, генетическое родство выделенных изолятов со штаммами, циркулирующими в последних, дает основание предполагать занос в Россию экзотических вирусов из них различными путями, в том числе с инфицированными продуктами животноводства, кормами и с дикими животными.

Во все неблагополучные по ящуру пункты выезжали сотрудники ФГБУ "ВНИИЗЖ", которые совместно со специалистами местных ветеринарных органов оказывали помощь в проведении противозооотических мероприятий. Благодаря своевременной диагностике и принятым мерам (наложение карантина, ограничения на передвижения животных и перемещения животноводческой продукции, полный или частичный санитарный убой животных в очагах, проведение кольцевой вакцинации, дезинфекции помещений и инвентаря), вспышки были локализованы и ликвидированы. Было внесено предложение о необходимости включения в состав противоящурных вакцин новых штаммов возбудителя типа А, обусловивших вспышки ящура на территории России в 2013 г. Следовательно, оперативное выявление больных животных, отбор от них проб патматериала, идентификация возбудителя, изучение выделенных изолятов, срочное изготовление в ФГБУ "ВНИИЗЖ" 10 млн доз моно- и бивалентной вакцин с использованием новых штаммов и их применение в неблагополучных зонах позволило купировать и ликвидировать ящурные очаги, не допустить широкого распространения инфекции.

Учитывая, что большая роль в деле борьбы с ящуром принадлежит вакцинопрофилактике, был разработан и реализован план профилактической вакцинации КРС и МРС за счет средств федерального бюджета в буферной зоне, включающей 31 регион страны. В 2015 г. в них планировалось вакцинировать 27,3 % общероссийского поголовья КРС и 28,7 % поголовья МРС с использованием инактивированной сорбированной противоящурной вакцины АОАзия-

1. Фактически, по данным ФГБУ "Центр ветеринарии" МСХ РФ, было осуществлено 8456,1 тыс. прививок КРС и 11507,7 тыс. МРС с использованием 14209,9 тыс. доз такой вакцины производства ФКП "Щелковский биокомбинат" и ФГБУ "ВНИИЗЖ", в состав которой были включены новые производственные штаммы вируса ящура. Наряду с этим в 9 ранее неблагополучных или угрожаемых субъектах было осуществлено еще 1697,8 тыс. прививок КРС (16,5 % годового плана прививок КРС) с применением моно- и бивалентной вакцин типа А, при изготовлении которых в ФГБУ "ВНИИЗЖ" использовали новые производственные штаммы вируса ящура типа А. Как показали последующие мониторинговые исследования, проведенная дополнительная вакцинация обусловила повышение уровня иммунных животных к вирусу ящура типа А. Эти мероприятия способствовали тому, что в 2015 г. новых очагов ящура на территории России не регистрировали.

В мае 2016 г. на 84-й Генеральной сессии МЭБ Россия впервые получила сертификат о ее признании страной с зоной, благополучной по ящуру без вакцинации, включающей 50 регионов, которые более 20 лет являются благополучными по ящуру.

В 2016 г. (за 9 мес.) в буферной зоне было осуществлено 9712,9 тыс. прививок КРС и 22959,7 тыс. МРС с использованием около 21200 тыс. доз вакцины производства ФГБУ "ВНИИЗЖ" и ФКП "Щелковский биокомбинат", в состав которой были включены новые штаммы. К сожалению, несмотря на принятые меры в 2016 г. не удалось обеспечить благополучие России по ящуру. Вспышки его были зарегистрированы в двух субъектах России. После многолетнего благополучия впервые во Владимирской области на животноводческом комплексе зарегистрирован ящур типа Азия-1, источник которого не установлен. Три вспышки ящура типа О среди КРС отмечены также в ранее неблагополучном Забайкальском крае вблизи границы с Китаем. Возбудитель их отнесен к генетической линии O/ME-SA/Ind-2001, который ранее не регистрировался в России. Все упомянутые вспышки ящура благодаря принятым мерам были локализованы и ликвидированы в первичных очагах.

Заключение

Эпизоотическая ситуация по ящуру в мире остается напряженной, в том числе и в нашей стране. Как следует из

опыта борьбы с ним в России, своевременное выявление больных животных, отбор от них проб патматериала и доставка их для исследования, идентификация возбудителя, изучение выделенных изолятов, срочное изготовление вакцин с использованием новых штаммов и их оперативное применение в неблагополучных зонах позволяет купировать и ликвидировать ящурные очаги, не допустить широкого распространения инфекции. Этому же во многом способствует и осуществление плановой профилактической вакцинации животных в противоящурной буферной зоне России.

Список литературы

1. Гулюкин М.И., Жидков С.А. Первые научные подходы в разработке средств диагностики и специфической профилактики ящура в стране // Ветеринария и кормление. 2007. №6. С. 8-10.
2. Инфекционная патология животных. Руководство в 7 т. Т.1. Ящур / ред. А.Я. Самуйленко. М.: ВНИТИБП. 2014. 264 с.
3. История Федерального центра охраны здоровья животных (ФГУ "ВНИИЗЖ"). Владимир. 2008. 304 с.
4. Критерии включения болезней, инфекций и инфестацій в список МЭБ/МЭБ. Кодекс здоровья наземных животных. 25-е изд. Т.1. Париж. 2016. С.4-7.
5. Лозовой Д.А., Рахманов А.М. Эпизоотическая ситуация по ящуру в мире в 2013-2015 гг. и меры борьбы с ним / Ветеринария сегодня. 2016. №1(16). С.38-42.
6. Мищенко А.В., Мищенко В.А., Дрыгин В.В. [и др.] Эпизоотологические особенности ящура типа А, вызванные гетерологичными штаммами вируса // Ветеринария. 2014. №11. С. 20-24.
7. Рахманов А.М. Эпизоотология ящура в СССР и России и эффективность противоящурных мероприятий // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. Владимир. 2008. Т.6. С. 43-64.
8. Щербakov А.В. Молекулярная эпизоотология ящура в России (филогенетический анализ российских изолятов вируса ящура) // Ветеринария сегодня. 2015. №3(14). С.30-36.
9. Ящур / под ред. А.Н. Бурдова. М.: Агропромиздат. 1990. 320 с.
10. OIE. Disease Information. 2014. Vol.27. №1-52.
11. OIE. Disease Information. 2015. Vol.28. №1-53.
12. OIE. Disease Information. 2016. Vol.29. №1-52.

УДК 619:619.937.5

Использование нагрузочных тестов для оценки иммунореактивности организма животных

Лощинин М.Н. – кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии с музеем типовых культур, lshinin@rambler.ru

Ездакова И.Ю. – доктор биологических наук, заведующий лаборатории иммунологии, ezdakova.i@viev.ru

Попова Е.В. – младший научный сотрудник лаборатории иммунологии.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.П. Коваленко, г. Москва

Аннотация. Целью данной работы было изучение влияния метаболитов сальмонелл сероваров *S.choleraesuis*, *S.typhimurium*, *S.dublin*, *S.infantis* на преципитирующую активность иммуноглобулинов класса G крупного рогатого скота в реакции радиальной иммунодиффузии (РИД). По результатам нагрузочных тестов с метаболитами сальмонелл на основе реакций по определению концентрации иммуноглобулина класса G и фагоцитарной активности, можно сделать вывод о том, что сальмонеллы сероваров *S.choleraesuis* (10,7 мг/мл) и *S.typhimurium* (9,05 мг/мл) обладают наиболее значительным влиянием на иммунные функции *in vitro*.

Ключевые слова: метаболиты сальмонелл, культивирование, фагоцитоз, нагрузочный тест, гельфилтрация, реакции иммунодиффузии.

The use of stress tests to assess the immunoreactivity of the animal body

Loschinin M.N., Ezdakova I.Yu., Popova E. V.

The aim of this work was to study the effect of salmonella serovar metabolites *S.choleraesuis*, *S.typhimurium*, *S.dublin*, *S.infantis* on precipitating activity of immunoglobulin class G cattle in the reaction of radial immunodiffusion (RID). Based on the results of load tests with salmonella metabolites based on reactions to determine the class of immunoglobulin G concentration and phagocytic activity, it can be concluded that the salmonella serovars *S.choleraesuis* (10,7 mg / ml) and *S.typhimurium* (9,05 mg / ml) have the most significant influence on the immune function *in vitro*.

Key words: salmonella metabolites, culturing, phagocytosis, load test, gel filtration, immunodiffusion reaction.

Гуморальный иммунный ответ на определенный антиген передается потомству в качестве генетической программы, по которой могут быть синтезированы специфические белки к данному антигену, т.е. гены иммуноглобулинов возникают *de novo* во время онтогенеза. Поэтому набор антител для каждого организма неповторим. Из этого следует, что иммунореактивность организма индивидуаль-

на, а ее оценка может показать различия в способности давать сильный или слабый иммунный ответ, что важно при проведении иммунопрофилактики [1].

Целью данной работы было изучение влияния метаболитов сальмонелл на преципитирующую активность иммуноглобулинов класса G крупного рогатого скота в реакции радиальной иммунодиффузии (РИД).

Сальмонеллы грамотрицательные микроорганизмы семейства Enterobacteriaceae являющиеся факультативными анаэробами, мезофиллами и хемоорганотрофами. Оптимальная температура культивирования 37 °С, но могут размножаться при температуре от 7 до 45 °С, а при + 5 °С их рост прекращается. Была изучена Кауфманом и Уайтом, которые установили, что в состав бактериальных клеток сальмонелл входят следующие типы антигенов: О-антиген (соматический), который представляет собой термостабильный липополисахаридно-белковый комплекс, входящий в состав клеточной стенки; Н-антиген (жгутиковый) – термолабильный, состоит из белка; Vi-антиген (антиген вирулентности) – расположен более поверхностно, чем О-антиген, термолабилен; М-антиген (слизистый), выявляется у некоторых слизистых штаммов сальмонелл сероваров *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. anatum* и др. Эти микроорганизмы занимают ведущее место среди возбудителей пищевых токсикоинфекций [5]. Сальмонеллы образуют термостабильный эндотоксин, который выделяется из клеток при их разрушении. Он представляет собой глицидо-липидо-протеиновый комплекс, соответствующий полному соматическому О-антигену. Токсичность придает липид-А. При внутривенном введении чистых фракций эндотоксина у животных появляются парезы, судороги, падает температура, животные погибают. У сальмонелл также выявлены энтеротоксины (Stn) и энтеротоксино-подобные вещества. По данным Houston et al. (1981) энтеротоксин – это термолабильный белок с молекулярной массой 90 000–110 000, функционально и иммунологически родственен с А-субъединицей холерного токсина (СТ) и термолабильным токсином *E. coli* (LT). Проявляется в течение нескольких часов в жидкой фазе растущей культуры, при этом синтез его обусловлен природой питательной среды, аэробностью, рН, температурой и длительностью выращивания в термостате (D'Aoust, 1989).

В организме сальмонеллы инфицируют макрофаги, способны размножаться в фагосомах. Способность размножаться в макрофагах по данным Finlay and Falkow (1989) частично происходит за счет синтеза ферментов супероксида дисмутазы, каталазы и пероксидазы. Под действием эндотоксинов, энтеротоксинов и других метаболитов сальмонелл происходит гибель части фагоцитов. Белковые метаболиты *S. typhimurium* обладают негативными регуляторными свойствами, т.е. снижают продукцию микробицидных пептидов в клетках Панета кишечника мышей [2,6].

Ashkenazi et al. (1988) было установлено, что большинство штаммов синтезирует цитотоксический фактор, связанный с наружной мембраной клеточной стенки (белок м.м. 56 000-78 000), который родственен нейротоксину шигелл. На поверхности бактериальных клеток также присутствуют гидрофобные белки порины (м.м.34000-36 000), функционирующие как каналы трансмембранной диффузии и по данным Tufano et al. (1988) увеличивающие вирулентность сальмонелл посредством подавления фагоцитоза.

Таблица 1. Результаты реакции иммунодиффузии с метаболитами сальмонелл

Серовары сальмонелл	Образцы сыворотки крови телят				M±m
	№208	№209	№210	№211	
	Концентрация IgG в мг/мл				
<i>S. choleraesuis</i>	8,4	12,2	10,0	12,2	10,7±1,5
<i>S. typhimurium</i>	7,0	7,0	10,0	12,2	9,05±2,0
<i>S. infantis</i>	8,4	12,2	12,2	12,2	11,3±0,9
<i>S. dublin</i>	8,4	12,2	14,5	12,2	11,8±0,4
МПБ	8,4	10,0	12,2	14,5	11,3±0,9
0,9% NaCl	10,0	14,5	14,5	17,0	14,0±0,5

Материалы и методы

В эксперименте использовали клеточные культуры сероваров *S. choleraesuis* (штамм 14K), *S. typhimurium*, *S. dublin* и *S. infantis*. Штамм *S. choleraesuis* по антигенной структуре относится к группе C₁ (O9, Hgm); *S. typhimurium* – группа B (1,4,12; i 1,2); *S. infantis* – группа C₁ (O6,7; r 1,2); *S. dublin* – группа D₁ (O9,12;gp). Их серологическую идентификацию проводили в РА на стекле при помощи сывороток сальмонеллезных О-комплексных и монорецепторных О- и Н- агглютинирующих (ФГУП "Курская биофабрика – фирма "Биок"). Ферментативную активность сальмонелл изучали с использованием теста для биохимической идентификации микроорганизмов "ENTERO-Rapid-24" ("Lachema", Чехия).

На МПБ изучаемые штаммы сальмонелл давали рост в виде равномерного помутнения среды, а на МПА в виде небольших диаметром 2–3 мм круглых, гладких, полупрозрачных колоний серовато-белого цвета с ровным краем (S-формы). В косопроходящем свете колонии имели голубоватый оттенок. На среде Эндо образовывались полупрозрачные бледно-розовые колонии (отсутствие ферментации лактозы). Культуры сальмонелл выращивали на МПА в течение 24 ч., с последующим смывом 0,9% раствором NaCl и получением концентрации 40 млрд. м.к./мл. Полученные культуры центрифугировали при 3000 об./мин -20 мин.

Культуральную жидкость микроорганизмов фильтровали (Millex-GS 0,22 μm) и концентрировали в Eppendorf concentrator plus при 45 °С – 3 ч. Определяли содержание общего белка по методу Лоури. Затем анализировали в ПААГ-ДСН в горизонтальной камере на приборе "Midget Electrophoresis Unit" ("LKB") при постоянной силе тока 25mA 2 ч. Для исследования использовали сыворотки крови телят в возрасте 6 мес.

Сыворотки крови телят инкубировали с различными метаболитами сальмонелл (*S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. dublin*) 1 час при 37 °С. В качестве контроля использовали МПБ и 0,9% раствор натрия хлорида. Затем определяли концентрацию Ig методом простой радиальной иммунодиффузии.

Результаты и обсуждение

Электрофоретический спектр белков метаболитов сальмонелл был представлен 4 компонентами, основная часть которых была сосредоточена в области молекулярных масс (м.м.) 25–55 kDa, а также в меньшей области 10 kDa. Все серовары сальмонелл характеризовались присутствием полипептида с м.м. 55 kDa. В таблице представлены результаты нагрузочного теста на основе РИД с метаболитами сальмонелл различных сероваров. В результате проведенных исследований установлено, что метаболиты *S. typhimurium* (9,05 мг/мл) и *S. choleraesuis* (10,7 мг/мл) обладают выраженным блокирующим действием на преципитирующую активность иммуноглобулинов класса G (таб. 1)

В наших предыдущих исследованиях нагрузочный тест проводили на основе реакции по определению фагоцитарной активности [3,4]. Фагоцитарная активность иммунокомпетентных клеток крови овец под влиянием метаболитов сальмонелл составила от 37,7% до 48%. Для каждого серовара вычисляли индекс сдвига, так для метаболитов *S. choleraesuis* индекс сдвига составил 0,71; *S. typhimurium*–0,73; *S. infantis*–0,88. Таким образом, установлено негативное влияние метаболитов сальмонелл на функциональные свойства фагоцитов, а наиболее неблагоприятное воздействие на процесс фагоцитоза оказали метаболиты *S. choleraesuis* и *S. typhimurium*.

Анализируя результаты нагрузочных тестов с метаболитами сальмонелл на основе реакций по определению концентрации иммуноглобулина класса G и фагоцитарной активности, можно сделать вывод о том, что сальмонеллы сероваров *S. choleraesuis* и *S. typhimurium* обладают наиболее значительным влиянием на иммунные функции *in vitro*.

Вопрос о влиянии метаболитов на иммунные реакции требует дальнейших исследований, так как представляет глубокий научный интерес не только в познании механиз-

мов иммунной защиты организма от инфекционных агентов, но и в создании новых методов иммунодиагностики.

Список литературы

1. Ездакова И.Ю., Попова Е.В. Параметры сывороточных антител как маркеры иммунореактивности организма животных // Международный научно-исследовательский журнал. №9(40). Часть 3. Октябрь. С.102-103
2. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. Врожденный иммунитет противоопухолевый и противои инфекционный. - М.: Практическая медицина, 2008. - 256 с.
3. Ездакова И.Ю., Лощинин М.Н., Журавлева М.С., Попова Е.В. Использование нагрузочных тестов для оценки фаго-

цитарной активности клеток крови животных // Ветеринария и кормление. 2015. № 1. С. 14-16.

4. Лощинин М.Н. Клеточный иммунный ответ у мышей при пероральной и подкожной вакцинации лизат-антигенами сальмонелл / М.Н. Лощинин // Журнал ветеринария и кормление. Ветеринария и кормление. - 2011. - №2. - С. 46-47.
5. Соколова Н.А., Абдуллаева А.М., Лощинин М.Н. Возбудители зооантропонозов, пищевых отравлений, порчи сырья и продуктов животного происхождения. М.: Делли плюс, 2015. - 170 с.
6. Salzman N.H., Ghosh D., Huttner K. M. Et al. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin // Nature. - 2003. - V. 422. - P. 522-526.

УДК 619:616-07-68.41.05

Изготовление и контроль сухого комплемента для реакции связывания комплемента при диагностике инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных

¹Мельник Р.Н., кандидат биологических наук,
¹Клюшинцева Н.С., соискатель,
 Киш Л.К.,
¹Гринь С.А., член – корреспондент РАН,
¹Самуйленко А.Я., академик РАН,
²Савина Е.П., соискатель

¹ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности". 141142, Московская область, Щелковский район, п. Биокомбинат; тел. +7 (496) 56-7-32-63.

¹ФКР "Щелковский Биокомбинат".

Препарат представляет собой сыворотку крови морских свинок стабилизированную сернокислым магнием и высушенную методом лиофилизации. Комплемент обладает способностью связываться с комплексом антиген-антитела, не обладает гемолитической активностью титрование комплемента проводят перед каждой постановкой реакции [2, 3, 5]. Комплемент титруют в гемолитической системе в соответствии с инструкцией по постановке РСК при диагностике той или иной болезни. Основной раствор комплемента и его разведение готовят и используют непосредственно перед постановкой реакции. Реакция связывания комплемента (РСК) – это метод серологического анализа, который по своей чувствительности сравним с методами преципитации, агглютинации и нейтрализации.

Комплементарная функция выражена наиболее интенсивно в сыворотках млекопитающих животных, особенно в сыворотке морской свинки [4, 7, 8]. Вот почему в качестве комплемента и применяется активная сыворотка морских свинок. Сыворотку получают при помощи пункции сердца у трех-пяти здоровых небеременных и не подвергавшихся обработке человеческим белком морских свинок, смешивая отдельные порции вместе. После образования сгустка фибрина последний отделяют от стенок пробирки, которую помещают в ледник. На следующий день отсасывают прозрачную сыворотку, которая называется комплементом. Для реакции необходимо употреблять только тот комплемент, который получен накануне, так как активность его сохраняется на леднике один-два дня [1, 6].

Ключевые слова: Морские свинки, сыворотка крови, корм, холодильники, лиофилизация, титрование, флаконы, ампулы, температурный режим, вакуум.

Manufacture and control of dry complement for the complement fixation reaction in the diagnosis of infectious diseases of farm animals

Melnik R.N.

Complementary function is expressed most intensively in serums of mammals and especially in serum of a guinea pig. That is why as a complement active serum of guinea pigs is also applied. Serum is received by means of a heart puncture at a trephynata of the healthy not pregnant and not being exposed to processing by human protein guinea pigs, mixing separate portions together. After formation of a clot of fibrin the last is separated from walls of a test tube which is placed in a glacier. Next day suck away transparent serum which is called a complement. For reaction it is necessary to use only that complement which is received the day before as his activity remains on a glacier one-two days.

Key words: Guinea pigs, blood serum, food, refrigerators, lyophilization, titration, vials, ampoules, temperature regime, vacuum.

Целью работы стало изготовление и контроль сухого комплемента для применения в реакции связывания комплемента при диагностике различных инфекционных заболеваний. Комплемент представляет собой высушенную сыворотку морских свинок.

Материалы и методы

Работа была выполнена 2016–2017 г в отделе противобактериальных препаратов в ФГБНУ "Всероссийского научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности" РАН.РФ в рамках задания Российской научно-технологической программы фундаментальных приоритетных и прикладных исследований по научно-обеспечению АПК РФ, совместно с на промышленной базе ФКР "Щелковский биокомбинат".

Результаты исследований

Для получения активного комплемента одним из основных условий является подбор и содержания морских свинок. Наиболее активный комплемент дают взрослые здоровые морские свинки (вес 500–600 г и выше), от которых за одно крововзятие брали от 5 до 8 мл крови. После крововзятия морским свинкам давали отдых 10 дней. Продолжительность эксплуатации морских свинок при таких условиях 2,5–3 месяца. Корм для морских свинок-производителей должен быть разнообразным и полноценным по содержанию витаминов. Лучшими кормами для них являются: овес, отруби, свежескошенная трава, овощная зелень, морковь, свекла и сено. В зимнее время года давали пророщенный овес и зелень злаковых культур, выращенных гидропонным способом, а также аскорбиновую кислоту по 10 мг ежедневно на одну голову. Кроме растительных кормов морским свинкам давали молоко, мясокостную муку, рыбий жир, кормовые дрожжи. В таблице №1 показаны суточные нормы кормления морских свинок.

Комбикорм использовали гранулированный без применения консервантов, сбалансированный по аминокислотному составу, минеральными веществами и витаминами. В таблице №2 состав и содержание используемых нами комбикорм гранулированный для производителей (доноров) используется каждый день.

Получение комплемента

Для получения комплемента брали кровь у морских свинок из сердца при помощи 10 мл шприца "Рекорд" с тонкой стерильной иглой. Взятие крови из сердца производят медленно. За 10–12 часов перед взятием морских свинок не кормили. Кровь, взятую от группы морских свинок, сливали по 150–200 мл в стерильные стеклянные банки и ставили в холодильник при температуре +4 +6 °С. Через 12–15 часов после крововзятия сыворотку отделяли от сгустков фибрина путем слива и центрифугирования при 1500–2500 оборотов в минуту. К полученной сыворотке добавляли 5% сухого кристаллического химически чистого сернокислого магния, после чего ее тщательно и осторожно смешивали до полного растворения магния. Допускали второй слив сыворотки не позже 16–18 часов после первого слива при условии хранения ее в холодильнике при температуре 4–6 °С. При двух сливах выход сыворотки достигает 45–50% от общего объема полученной крови. При проведении научно-исследовательской работы показали, что нативный комплемент при комнатной температуре сохраняет свою активность на протяжении 18–20 часов.

Составление серии и расфасовка

Серию комплемента составляли путем смешивания сывороток, полученных в течение 3–6 дней при хранении их в холодильнике при температуре 4–6 °С, в общую бутыль специально смонтированную для смешивания. Объем одной серии комплемента составлял 4–10 литров. Сыворотку расфасовывали по 2 мл в 10 мл пенициллиновые флаконы приспособленные для вакуумной запайки, через стерильную мерную баретку или разливочный дозирующий аппарат. Сразу после расфасовки ампулы закрывали стерильными ватными тампончиками. Перед замораживанием в цехе проводили проверку активности нативного комплемента в реакции связывания комплемента.

Высушивание комплемента

После расфасовки ампулы с комплементом укладывали в кассеты и после 2–4 часовой выдержки при температу-

ре 2–6 °С подвергали замораживанию при температуре –40–50 °С в течение не менее 4 часов.

Примечание: равномерное замораживание обеспечивается наличием в холодильных камерах специальных пропеллеров для перемешивания воздуха. Не менее чем через 4 часа после замораживания ампулы с комплементом быстро перегружали в сушильную камеру, закрывали ее крышкой и быстро включали вакуумный насос для создания в камере глубокого вакуума (200–300 микрон остаточного давления). Поглощение влаги при высушивании производится при помощи конденсаторов с температурой –40–75 °С. Первая фаза высушивания происходит при минусовой температуре, заканчивается высушивание при температуре 20–25 °С. Высушивание комплемента производили без подогрева за 48–72 часа. После окончания высушивания определяли в цехе активность и остаточную влажность так сухого комплемента, которая должна быть не выше 3%. Ампулы с высушенным комплементом запаивали на специальных коллекторах двух рожковыми горелками под вакуумом 200–250 микрон. Запаиваемые ампулы с комплементом проверяли на наличие в них вакуума при помощи аппарата Теста или Д, Арсенваля, при этом в ампулах в которых имеется вакуум проявляется зеленоватое или оранжевое свечение и легкое потрескивание. В ампулах без вакуума свечение и потрескивание отсутствует. Такие ампулы браковали. Каждую ампулу с сухим комплементом этикетировали с указанием номера серии и наименования биопрепарата. Этикетированные ампулы с комплементом укладывали в коробки, наклеивали этикетки с указанием наименования препарата и предприятия-изготовителя, номера серии и госконтроля, дата изготовления титра в бактериолитической системы, срока годности, количества доз. Серией считают партию комплемента одновременно смешанную, разлитую, замороженную и высушенную в одном или нескольких сушильных аппаратах при одном и том же режиме. Датой изготовления считают день окончания высушивания комплемента в камерном аппарате.

Список литературы

1. Belimenko V.V. Prospects for the use of Geographic Information Systems for risk-based monitoring of natural focal diseases of animals and humans//Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. -2016. -Vol. 56. -No. 8. -pp. 22-25.
2. Дикий И.Л., Холупяки Ю., Шевелева Н.Е., Стегний М.Ю. Микробиология. -Х.: Прапор, Издательство УкрФА, 1999. - С. 361-336.
3. Елинов Н.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. -М.: Медицина, 1988. - С. 190-191.
4. Попова Е.В. Параметры сывороточных антител как маркеров иммунореактивности организма животных. //Международный научно-исследовательский журнал. 2015. № 9-3 (40). С. 102-103.
5. Пятин К.Д. Микробиология уч. М., 1989.
6. Субботин В.В. Исследования сероспецифичности сыворотки крови новорожденных ягнят к адгезивным антигенам E. Coli. // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко. 2010. Т. 76. С. 126-130.
7. Складов О. Д. Изучение иммунной активности столбнячного компонента в составе ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота//Ветеринария Кубани. 2016. № 4. С. 15-17.
8. Кадыров С.О. Технология получения моноспецифических антисывороток к иммуноглобулинам животных. // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко. 1988. Т. 66. С. 41-46.

Таблица 1. Суточные нормы (временные) кормления морских свинок

Группа животных	Наименование корма(г)											
	Овес	Овес на раз-мол	Отруби	Молоко сухое 25%	Молоко для кроликов	Комбикорм гранул. для кроликов	Трава луговая	Рыбий жир	Соль	Мел	Меласса	Горючее
Взрослое поголовье	20	2,5	17	0,85	-	310	0,5	0,5	0,3	0,02	-	-
Ремонт	20	2,5	17	0,85	-	310	0,5	0,5	0,3	0,02	-	-
Молодняк	10	2,0	13	0,35	10	210	0,3	0,3	0,2	0,01	-	-
Продуценты (на сухом комплементе)	25	-	18	0,7	10	310	0,3	0,5	0,3	0,02	2	-

Примечание: Овес в размол, семенной овес, комбикорм гранулированный используется для кормления животных 5 дней в неделю, рыбий жир, мел.

Таблица 2

Гарантированные показатели			Содержание витаминов и макроэлементов на 1 кг комбикорма	
Наименование	Ед.изм.	Содержание	Наименование	Ед.изм.
Сырой протеин	%	18,50	Витамин А	тысМЕ
Сырая клетчатка	%	11,89	Витамин Д ₃	тысМЕ
Треонин	%	0,59	Витамин Е	тысМЕ
Лизин	%	0,69	Витамин К	мг
Са	%	1,00	Витамин В ₁	мг
Р	%	0,59	Витамин В ₂	мг
Na	%	0,20	Витамин В ₃	мг
Cl	%	0,07	Витамин В ₄	мг
Влага	%	14,00	Витамин В ₁₂	мг
Метионин+цистин	%	0,60	Витамин В _с	мг
Состав рецепта:			Fe	мг
Пшеница, ячмень, овес, отруби пшеничные, шрот подсолнечный сп 35%, травяная мука, масло растительное, соль, апсабонд, кеибитенксид, эндокс, лизин, известняковая мука 0,07 мм., премикс П 90-1 растительных животных.			Mn	мг
			Co	мг
			Zn	мг
			J	мг
			Cu	мг
			Антиоксидант	мг

УДК 636.2.064+636.2.034+636.2.082.13

Использование вакцины в системе мероприятий по профилактике и борьбе с некробактериозом животных

¹Мельник Н.В., профессор, доктор ветеринарных наук,¹Боровой В.Н., кандидат ветеринарных наук,²Самуйленко А.Я., доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН,²Мельник Р.Н., кандидат биологических наук,²Гринь С.А., член - корреспондент РАН,³Крюкова Е.Н., кандидат биологических наук,²Винников М.Г., соискатель,²Федорова Н.В., соискатель.¹"Национальная Ассоциация ветеринарно-биологической промышленности" ("Ветбиопром"), г.Москва;²ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности". 141142, Московская область, Щелковский район, п. Биокомбината; тел. +7 (496) 56-7-32-63.³ФКП "Щелковский биокомбинат"

В статье рассмотрены вопросы этиологии, профилактики, лечения и ликвидации некробактериоза крупного рогатого скота. В последние десятилетия чрезвычайно возросла частота некробактериоза крупного рогатого скота в копытной форме в условиях интенсивного животноводства. Предрасполагающими факторами является нарушение содержания животных, снижение резистентности организма животного, травмирование кожного покрова в области нижних фаланг конечностей. В качестве эффективного способа профилактики и лечения некробактериоза животных рассматривают инактивированную эмульсионную вакцину против некробактериоза животных ФКП "Щелковский биокомбинат".

Ключевые слова: высокопродуктивный молочный скот, некробактериоз, вакцина, иммунитет, интенсивное животноводство, лечение копыт.

The use of the vaccine in the system of measures for prevention and control of animal necrobacillosis

Melnik N.V., Borovoy V. N., Samoilenko A.Y., Melnik R. N., Grin S.A., Kryukova E.N., Vinnikov M.G., Fedorova N.V.

This article discusses the etiology, prevention, treatment and elimination necrobacillosis in cattle. In recent decades, the frequency of necrobacillosis in cattle is extremely increased and it is shown in the form of hoof disease in conditions of intensive stock farming. Predisposing causes are violation of animal welfare, reduced resistance of the animal organism and injuries of the skin in the lower extremities of the phalanges. Inactivated emulsion vaccine against animal necrobacillosis produced by FSE "Shchelkovo Biokombinat" is considered as an effective method for the prevention and treatment of animal necrobacillosis.

Key words: high-producing dairy cattle, necrobacillosis, vaccine, immunity, intensive stock farming, treatment of hooves.

В последние годы в связи с изменением технологии ведения животноводства, а именно в связи со строительством и эксплуатацией крупных животноводческих комплексов, где технологией содержания животных предусмотрено механизация основных трудоемких процессов, таких как раздача кормов, водопой, навозоудаление, содержание животных без подстилки, замена грубых кормов – сена, солома – на кукурузные корма – силос, сенаж, концентраты, при одновременном уменьшении доли грубых кормов в рационе, широкое распространение получили массовые болезни дистального отдела конечностей крупного рогатого скота, особенно молочных коров и племенных быков [1, 2, 8]. Некробактериоз как инфекционное заболевание конечностей представляет большую угрозу для экономической эффективности молочных ферм в России. Специалисты знают, что только здоровая корова может давать наи-

высшую продуктивность. Для движения и комфортного состояния корове необходимы хорошие, здоровые конечности. При болезненных конечностях коровы меньше едят, естественно, снижается их продуктивность. Чтобы уменьшить нагрузку на больную ногу, корова меняет позу, в связи с чем происходит неравномерное распределение массы тела на суставы ног. Она с трудом передвигается, чувствует себя угнетенно, залёживается. Удой её снижается на четверть, а иногда она совсем перестает давать молоко. В период переболевания коровы теряют 30–40% массы тела и до одной тонны молока [7, 10, 13].

К некробактериозу восприимчивы все виды сельскохозяйственных животных. Возбудителем инфекции является *Fusobacterium necrophorum* – неподвижный грамотрицательный токсинообразующий анаэроб. Он образует ряд сильных токсинов (гемолизин, лейкоцидин, цитоплазматический токсин) и ферментов (лецитиназа, гиалуронидаза), которые разрушают клетки организма и угнетают его иммунную систему. Естественным резервуаром *Fusobacterium necrophorum* является желудочно-кишечный тракт жвачных животных. Во внешней среде возбудитель может сохраняться длительное время, он выделяется со слюной, мочой, фекалиями больных животных. Заражение происходит по типу раневой инфекции через поврежденную кожу или слизистые оболочки, таким образом, пусковым механизмом эпизоотического процесса некробактериоза выступает потеря естественной непроницаемости кожи животных [5, 12]. В связи с этим некробактериоз принято относить к факторным инфекциям, и несмотря на то, что *F. necrophorum* является этиологическим агентом, проявление его патогенного действия во многом зависит от предрасполагающих факторов. Среди причин, обуславливающих развитие заболевания в животноводческих комплексах крупного рогатого скота, большинство исследователей отмечают:

1. Недостаточное и несбалансированное кормление (силосно-концентратный тип кормления), минеральное голодание, гиповитаминозы, что обуславливает снижение резистентности организма животного.

2. Нарушение технологии содержания животных на комплексах и фермах: гиподинамия, короткие стойла, отсутствие подстилки, щелевые, бетонные полы и другие причины, способствующие травматизму, сырость, несвоевременная уборка навоза и плохие санитарные условия в помещениях.

3. Несвоевременная и неправильная расчистка и обрезка копытного рога.

4. Механические травмы копытцев, половых путей, внутренних органов, повреждения, вызываемые кожными паразитами.

Клиническое проявление заболевания животных некробактериозом начинается сразу после растела животных. В начале заболевания у животных отмечается неправильная постановка задних конечностей (разножка), малозаметная хромота, которая в дальнейшем резко усиливается, появление язв в межкопытной щели на пяточной части копыт, коровы резко теряют в весе с нарастающей потерей продуктивности, становятся хозяйственно непригодными и без ветеринарного вмешательства погибают или сдаются на вынужденный убой. К сожалению, довольно часто некробактериозные поражения диагностируются как гнойно-некротические процессы, а не как инфекция, в результате заболевшее животное не изолируется, и инфекция распространяется по всему коровнику. Ферма становится неблагополучной по некробактериозу, так как заболевает до 70% поголовья, а это прямые убытки хозяйству.

Переболевшие животные выраженной невосприимчивости к повторному заболеванию не приобретают, поэтому систематическое применение современных вакцин против некробактериоза крупного рогатого скота и использование эффективного антисептического препарата в профилактических целях во время каждой обрезки копытцев, а также плановая дезинфекция мест содержания животных позволяют значительно сократить риск данного заболевания [11].

Профилактические и лечебные мероприятия должны проводиться комплексно с обязательной иммунизацией против некробактериоза крупного рогатого скота. На российском рынке представлена уникальная эмульгированная инактивированная вакцина против некробактериоза круп-

ного рогатого скота и северных оленей ФКП "Щелковский биокомбинат", не имеющая аналогов в России и за рубежом. Вакцина безвредна и ареактогенна. При приготовлении вакцины Щелковского биокомбината используется высокотоксигенный штамм "0-1". Выращенные клетки возбудителя подвергаются технологическим приемам, благодаря которым высвобождаемые токсины переводятся в анатоксины, очищаются, концентрируются. В результате доза вакцины составляет всего 0,4 мл для крупного рогатого скота. Иммунитет к некробактериозу у крупного рогатого скота формируется на 20-25 сутки – после двукратного введения и сохраняется в течение 6 месяцев. Вакцинации подлежат животные с 6-8 месячного возраста. Вакцину вводят животным внутривенно при помощи безыгольного инъектора Б-7М. Безыгольный метод введения значительно повышает производительность труда и снижает затраты на лечебно-профилактические мероприятия. Один специалист за 2 часа может вакцинировать 200-250 животных. При этом сохраняется стерильность инъектированного препарата, практически исключена возможность перезаражения прививаемых животных другими инфекционными болезнями [3, 6].

Вакцина против некробактериоза не только эффективно предохраняет от заболевания иммунизированных животных, но еще обладает лечебными свойствами. Использование вакцины Щелковского биокомбината против некробактериоза формирует высокий уровень иммунитета. Для лечения легкой и средней формы заболевания вакцина является эффективной заменой антибиотикам, недостатком которых является ограничение по использованию продуктов убоя и молока, высокая стоимость, нарушение микрофлоры кишечного тракта (дисбактериоз) и появление антибиотикорезистентности. Экономия материально-технических, финансовых, трудовых ресурсов, сокращение времени проведения ветеринарно-профилактических работ подтверждают высокую экономическую эффективность использования вакцины против некробактериоза [4].

Кроме вакцинации в комплексе лечебно-профилактических мер для ликвидации некробактериоза также необходимо провести клинический осмотр всего поголовья, выявить больных и подозрительных по заболеванию некробактериозом животных и изолировать их, провести расчистку и обрезку копыт, хирургическую обработку очага поражения, провести дезинфекцию дистальных отделов конечностей с использованием дезванн и дезовзвешивателей, дезинфекцию помещений и выгульных дворов, улучшить условия кормления и содержания. Для поддержания благополучия хозяйства по некробактериозу и повышения естественной резистентности организма животного, в первую очередь, необходимо ввести сбалансированный нормированный рацион, в том числе по минерально-витаминному соотношению. Животные должны содержаться в чистых, сухих стойлах и боксах. Ветеринарные специалисты на постоянной основе должны проводить клинический осмотр состояния дистальных отделов конечностей животных и профилактическую вакцинацию против некробактериоза животных согласно инструкции по применению препарата. Только комплекс мер в виде регулярной вакцинации, своевременной обработки копыт животных, улучшения условий кормления, содержания и эксплуатации, снижают риск поражения дистальных отделов конечностей, что в свою очередь, обеспечивает экономическую эффективность проводимых мероприятий [9].

Профилактические меры с использованием вакцины против некробактериоза приобретают особое значение при ввозе импортного поголовья крупного рогатого скота для его адаптации к новым условиям. Из-за стресса и перехода в другие условия кормления и содержания представители нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта животного претерпевают большие изменения, что позволяет активно размножаться различным патогенным микробам, в том числе возбудителю некробактериоза *F. necrophorum*.

Проведение профилактических мероприятий и внесение в схему вакцинации вакцины против некробактериоза, составление сбалансированного нормированного рациона в рамках программы адаптации крупного рогатого скота к новым условиям позволяет повысить резистентность организма животного, восполнить нормальную микрофлору и

уменьшить риск нарушения обмена веществ животного, вследствие чего и происходит адаптация крупного рогатого скота к новым условиям содержания.

Заключение. Некробактериоз широко распространен среди крупного рогатого скота. Причиной, способствующей распространению болезни, следует считать нарушение ветеринарно-санитарных и технологических нормативов, заключающихся в высокой концентрации животных на ограниченных площадях, отсутствие у животных сухой подстилки и моциона, укороченные стойла, сырости в помещениях, недостаток грубых кормов. В качестве эффективного способа профилактики и лечения некробактериоза у крупного рогатого скота эффективно применение инактивированной эмульсионной вакцины против некробактериоза животных ФКП "Щелковский биокомбинат". Высокие иммуногенные свойства вакцины позволяют значительно сократить заболеваемость некробактериозом, а в случае поголовной иммунизации практически полностью ликвидировать ее. Экономия материально-технических, финансовых, трудовых ресурсов, сокращение времени проведения ветеринарно-профилактических работ подтверждают высокую экономическую эффективность использования данной вакцины.

Список литературы

1. Антипов В.А., Сапунов А.Я., Турченко А.Н., Басова Н.Ю. Проблемы адаптации импортного молочного скота // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. -2009. -№ 5. -С.70-72.
2. Антипов В.А., Семенов М.П., Басова Н.Ю., Турченко А.Н., Сапунов А.Я., Кузьминова Е.В., Высокопоясный А.Н., Шевкопляс В.Н., Фонтанецкий А.С. Повышение сохранности и продуктивности здоровья импортного молочного скота. Краснодар, 2009. - 63 с.
3. Аракелова Н.Т. заболевание копыт: решение проблемы // Ветеринария. -2007. -№ 11. - С. 17.
4. Гулюкин, М.И. Методические рекомендации по расчёту годовой потребности в биопрепаратах для проведения профилактических и противозооценозных мероприятий в хозяйствах всех форм собственности // М.И. Гулюкин и др. // Рассмотрены и одобрены на секции "Инфекционная патология животных" отд. Ветеринарной медицины РАСХН. -Москва-2007. -24 с.
5. Еремина, М.А. Динамика иммунологических показателей коров в разные месяцы стельности // Зоотехния. -2013. -№ 10. -С. 25-26.
6. Караваев Ю.Д., Семенова И.Н., Мельник Н.В., Плохова А.А. Способ изготовления вакцины для профилактики и лечения некробактериоза животных, вакцина для профилактики и лечения некробактериоза животных и способ профилактики и лечения некробактериоза животных // Патент на изобретение RU 2329828 от 02.03.2007.
7. Мельник Н. В. Ветеринарно-санитарные и лечебно-профилактические мероприятия при некробактериозе крупного рогатого скота / Н.В. Мельник // Ветеринария. - 2009. -№ 10. -с. 10-12.
8. Мищенко В.А., Мищенко А.В., Думова В.В., Ермилов И.В., Якубяченко Е.В., Черных О.Ю. Анализ нарушения обмена веществ у высокоудойных коров // Ветеринария Кубани. -2012. -№ 6. -С. 15-16.
9. Практическое пособие по мониторингу бруцеллеза, туберкулеза, паратуберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота: организационно-хозяйственные, ветеринарно-санитарные и зооигиенические аспекты профилактики и ликвидации этих инфекций / под ред. М.И. Гулюкина. -М.: Агенство творческих технологий, 2014. -76 с.
10. Романенко Л.В., Волгин В.И., Федорова З.Л., Корочкина Е.А., Племяшов К.В. Состояние обменных процессов в организме высокопродуктивных молочных коров при адаптивном питании коров // Успехи современного естествознания. - 2015. -31 (ч. 7). -с. 1145-1149.
11. Самуйленко А.Я., Мельник Н.В., Денисов А.А., Тарасова И.И., Джавадов Е.Д., Попов Н.И., Гулюкин А.М., Денисова Е.А., Барсуков Ю.И., Никифоров А.Я., Шебекина М.В., Мельник Р.Н. Рекомендации по проведению ветеринарной дезинфекции на животноводческих комплексах и биопредприятиях / Рассмотрены на заседании секции ветеринарии НТС Минсельхоза России (протокол № 19 от 15 апреля 2014 г.). М., 2014.
12. Фёдорова Е.В. Диагностические критерии оценки состояния иммунной системы быков-производителей // Ветеринария и кормление, 2014. № 2. С.10-11.
13. Шабунин С.В., Алехин Ю.Н. Фармакологические аспекты "патологий высоких технологий" // Молочная промышленность. -2015. -№ 10. -С. 65-66.

УДК: 636.2.082.12:612.017:636.2.082.12:612.017:636.237.23

Иммунопрофилактический метод реализации генетического потенциала в стаде красно-пестрой породы крупного рогатого скота

¹Некрасов А.А. – кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник

¹Попов Н.А. – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории генетики сельскохозяйственных животных, главный научный сотрудник;

¹Федотова Е.Г. – научный сотрудник,

²Моисеев А.Н. – кандидат ветеринарных наук,

³Семичев А.С. – главный ветеринарный врач

¹ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 142132, п. Дубровицы, д. 60, г. Подольск, Московская область, Российская Федерация, +7 (4967) 65-13-65

²ООО "Биотех", 197198, ул. Большая Пушкарская, д. 20, офис 5-312, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, +7(905)212-99-99, +7(812)346-60-53

³ООО "Ермоловское", 397953, ул. Колхозная, д. 24, с. Ермоловка, Лискинский район, Воронежская область, тел.+7(47391)21111, факс+7(47391)61110, 6-1135

Аннотация. В статье анализируется один из методов повышения молочной продуктивности коров в ООО "Ермоловское" Воронежской области посредством проведения комплекса иммунопрофилактических мероприятий. Заболеваемость молодняка крупного рогатого скота острыми респираторными заболеваниями снизилась с 26–28% в 2007 году до единичных случаев в 2016 году. Оздоровительные мероприятия способствовали ежегодному улучшению производственных показателей в хозяйстве при минимальных затратах на иммунопрофилактические мероприятия. Среднесуточные приросты живой массы молодняка в 2016 году увеличились на 21% по сравнению с начальным периодом мероприятий. Значительно уменьшился отход и вынужденная выбраковка телят, тем самым снизился экономический ущерб, связанный с их выбытием. Повышение среднесуточных приростов привело к снижению возраста первого плодотворного осеменения тёлочек с 21,7 месяца в 2007 году до 18,1 месяца в 2016 году при достижении ими живой массы не менее 395 – 425 кг. Сокращение возраста осеменения обеспечило существенное снижение расходов на корма и содержание ремонтного молодняка. Высокая энергия роста тёлочек новых генотипов наилучшим образом способствовала проявлению их повышенной молочной продуктивности. При незначительном изменении качественного состава рациона удои первотёлочек суммарно возросли в среднем на 17,7%. За счёт улучшения сохранности тёлочек и молодых коров увеличилась продолжительность их продуктивного использования до 4,2 лактации. На фоне снижения затрат на выращивание представилась возможность реализации сверхремонтного молодняка. Всё это положительно отразилось на рентабельности молочного скотоводства в хозяйстве.

Ключевые слова: иммунопрофилактика, титр антител, энергия роста, снижение затрат, рентабельность отрасли.

The immunoprophylactic method of realization of the genetic potential in the herd of redmottley breed of cattle

Nekrasov A.A., Popov N.A., Fedotova E.G., Moiseyev A.N., Semichev A.S.

One of the methods for increasing milk production in cows on the Ermolovskoye Trading Stock Farm, LLC, in Voronezh oblast using the complex immunoprophylactic techniques has been analyzed. The incidence of respiratory diseases in the cattle young stock decreased from 26–28% in 2008 to some cases in 2016. The activities for health improvement contributed

to improving the production on the farm with the minimum costs of immunoprophylactic activities. The average daily live weight gains in the youngstock increased by 21% in 2016 as compared to that in the initial period of introducing the indicated activities. Youngstock leaving the herd for a health reason and forced culling considerably reduced; therefore, the economic losses caused by the youngstock losses significantly decreased. Increasing the average daily live weight gains in heifers resulted in decreasing the age at the first fruitful insemination from 21.7 months in 2007 to 18.1 months in 2016 with the heifer live weight of 395–425 kg. The earlier age at the insemination contributed to the reduction in the costs of their feeding and keeping. The high growth capacity of heifers improved the milk production in the first-calf cows. It averagely increased by 17.7% with the insignificant change in the dietary qualitative composition. The herd replacement costs were reduced due to the proper preservation of the youngstock and the mature animals and the improved productive lifetime yielded up to 4.2 lactations; the extra replacement youngstock could be offered for sale, which, therefore, increased the profitability of the dairy farming industry.

Key words: immunoprophylaxis, antibody titer, growth capacity, reduction of costs, industry profitability

Введение

Современный этап ведения животноводства привёл к резкому изменению условий существования животных. В то же время интенсификация и внедрение современных технологий предъявляет более высокие требования к состоянию здоровья и продуктивным качествам скота. Стратегия работы зооветспециалистов, направленная на достижение здоровья только посредством выделения средств на лечение заболевших животных уже не решает вновь возникающих проблем. Спасение больных от гибели или преждевременной выбраковки не приводит их к полному выздоровлению и реализации главной цели – проявлению генетически обусловленной высокой молочной продуктивности и воспроизводительной способности [8].

Исходя из вышеизложенного, особое значение приобретает другая стратегия достижения цели – охрана здоровья животных, т.е. создание условий, обеспечивающих сохранение и постоянное поддержание здоровья. Оптимизация условий существования более современных типов животных – основная задача зоотехнической и ветеринарной наук, всех специалистов и работников хозяйства, обеспечивающих функционирование этой экономически и социально значимой отрасли.

В этих условиях, прежде всего, необходимо проведение комплекса организационно-хозяйственных мероприятий, направленных на создание полноценной кормовой базы, оптимизацию факторов, влияющих на обмен веществ и микроклимат в помещениях [11]. Особо тревожат инфекционные заболевания, вызываемые возбудителями острых и хронических болезней. Среди них наибольшее отрицательное влияние на экономику хозяйств оказывают инфекционные заболевания молодняка и лейкоз крупного рогатого скота.

Проявление заболеваний и последующие тяжелые осложнения приводят к резкому снижению молочной продуктивности коров. Особое значение приобретает стимулирование клеточных и гуморальных факторов иммунитета у высокопродуктивных коров, особенно у молодняка [2, 3, 5]. Имеется множество данных о том, что большинство инфекционных болезней крупного рогатого скота возникают на фоне иммунной недостаточности, иммунных дефицитов [2, 3, 1, 5, 7, 9, 10]. Это явление ведёт к падежу молодняка и выбраковке взрослых животных, снижению продуктивности, ухудшению качества молока, а в итоге – к снижению эффективности производства и рентабельности ведения хозяйства [5].

В настоящее время вирусные респираторные заболевания широко распространены на территории Российской Федерации. В ООО "Ермоловское" Лискинского района Воронежской области серопозитивные по ИРТ, ПГ-3 живот-

Таблица 1. Титры противовирусных антител в сыворотке крови телят ООО «Ермоловское», выявленные после иммунизации противовирусными вакцинами в комплексе с иммуномодулятором ронколейкином

Группы опыта	Поголовье телят	Период	Титры противовирусных антител на введение вакцин		
			инфекционный ринотрахеит (ИРТ)	парагрипп-3 (ПГ-3)	вирусная диарея (ВД)
I – контрольная	45	до иммунизации	1:4 – 1:16	1:32 – 1:64	1:4 – 1:8
	45	после иммунизации	1:16 – 1:32	1:64 – 1:256	1:8 – 1:16
II – опытная (вакцина + ронколейкин)	10	до иммунизации	1:4 – 1:16	1:16 – 1:32	1:2 – 1:8
	10	после иммунизации	1:32 – 1:64	1:64 – 1:128	1:8 – 1:32

ные выявлялись с 2006 года, при этом инфекционные респираторные заболевания составили более 34% случаев от родившегося поголовья телят. Вирусологические исследования проводились в ГНУ ВНИВИПФиТ, где были подтверждены диагнозы.

Цель и задачи исследований

В связи со сложившейся в хозяйстве эпизоотологической ситуацией была поставлена цель: разработать систему мероприятий по ликвидации инфекционных респираторных заболеваний молодняка. Первоочередной задачей ставились исследования по установлению этиологических причин этих заболеваний, методы элиминации и профилактики их повторного возникновения. Выявленные особенности эпизоотического процесса и результаты серологических тестов должны были послужить основой для разработки системы иммунопрофилактических мероприятий при регистрации инфекционных заболеваний, применения вакцин, улучшения условий содержания и кормления телят.

Материал и методы исследований

При реализации разработанной программы на первоначальном этапе была разработана схема иммунизации против вирусов, вызывающих респираторные заболевания у животных красно-пестрой породы. Исследования в хозяйстве проводили в течение 9 лет. Согласно программе проведения исследований за 90 дней до отёла стельных коров и нетелей вакцинировали вакциной Комбовак-К, через 10 дней производили ревакцинацию, а спустя неделю проводили двукратную вакцинацию вакциной Комбовак-Р. Дозы вводимых вакцин были определены согласно наставлениям по их применению. Телята с первого дня жизни интраназально, однократно вакцинировались препаратом Инфорс-

3, который содержит антигены инфекционного ринотрахеита (ИРТ), парагриппа-3 (ПГ-3), респираторно-синцициальной инфекции (РС). С двухмесячного возраста телят вакцинировали с использованием вакцины Бови-Шилд-Голд. Для этого всё поголовье разделили на опытную и контрольную группы. В опытной группе, наряду с вакциной, за 24 часа до вакцинации вводили ронколейкин. Через три недели проводили ревакцинацию по прежней схеме. Через год, кроме глубоководных коров и нетелей, производили ревакцинацию ремонтного молодняка и всего взрослого поголовья. Водились антигены ИРТ, ПГ-3, РС, ВД (вирусная диарея) и лептоспироз. Ронколейкин – аналог эндогенного интерлейкина-2, ключевого компонента цитокиновой сети, определяющей оптимальное функционирование всей системы иммунореактивности [4].

Результаты исследований

Эффективность борьбы с инфекционными респираторными заболеваниями телят зависит от точной постановки эпизоотологической цели. Как свидетельствует международный опыт, инфекционные заболевания молодняка крупного рогатого скота нельзя ограничить лишь зоогигиеническими мероприятиями или только применением иммунопрофилактики. Руководствуясь опытом специалистов и результатами собственных исследований, можно утверждать, что невозможно достигнуть оздоровления животных всего стада посредством проведения единичных односторонних мероприятий.

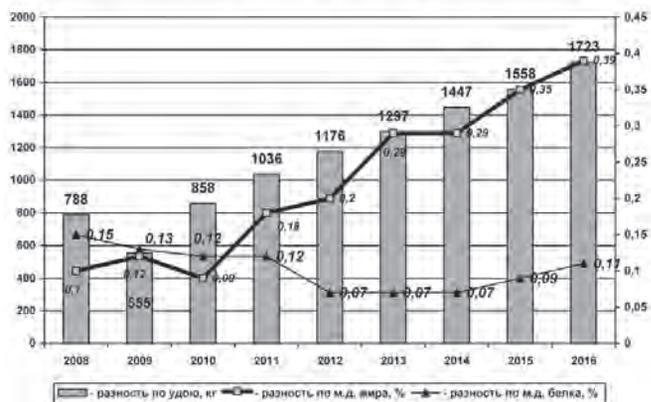
Первостепенное значение для профилактики инфекционных респираторных заболеваний телят имеют решение проблем кормления и содержания. Уровень колострального иммунитета и способность новорожденного телёнка противостоять возбудителям инфекций зависит от своевременности выпаживания первой порции высококачественного молозива, т.е. оно должно быть осуществлено не позднее 1–2 часов после рождения, объёмом 1,5 – 2,0 литра. Уровень и концентрация иммуноглобулинов в молозиве, а также специфичность антител зависели от проведения у глубоководных животных вакцинаций с целью выработки иммунитета на присутствующий микробный фон. Вакцина-

Таблица 2. Молочная продуктивность коров-первоотёлок в ООО «Ермоловское»: здоровых и переболевших респираторными заболеваниями

Группы первоотёлок и показатели (в среднем)	Годы								
	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Здоровые первоотёлки									
Число голов, п	116	112	119	124	128	131	135	142	148
Живая масса, кг	535	527	536	540	542	543	545	547	548
Удой за 305 дней лактации, кг	5384± 61***	5167± 62***	5468± 61***	5708± 57**	5850± 56***	5978± 54***	6142± 52**	6267± 49***	6435± 47***
Массовая доля жира в молоке, %	3,79± 0,07**	3,83± 0,06**	3,97± 0,06**	3,97± 0,07**	4,01± 0,07**	4,09± 0,06**	4,12± 0,05**	4,16± 0,05**	4,21± 0,05**
Массовая доля белка в молоке, %	3,13± 0,04**	3,14± 0,05**	3,15± 0,04**	3,18± 0,05**	3,17± 0,06**	3,18± 0,04**	3,19± 0,05**	3,20± 0,04**	3,21± 0,04**
Переболевшие первоотёлки									
Число голов, п	23	21	19	15	11	14	9	7	4
Живая масса, кг	467	474	473	478	483	484	490	489	488
Удой за 305 дней лактации, кг	4596± 96	4612± 97	4610± 97	4672± 101	4674± 102	4681± 99	4695± 112	4709± 115	4712± 132
Массовая доля жира в молоке, %	3,69± 0,11	3,71± 0,11	3,78± 0,12	3,79± 0,14	3,81± 0,15	3,80± 0,15	3,83± 0,16	3,81± 0,16	3,82± 0,17
Массовая доля белка в молоке, %	2,98± 0,07	3,01± 0,08	3,03± 0,08	3,06± 0,09	3,10± 0,10	3,11± 0,09	3,12± 0,10	3,11± 0,11	3,10± 0,12
Отношение между здоровыми и переболевшими первоотёлками:									
- разность по удою, кг	+788	+555	+858	+1036	+1176	+1297	+1447	+1558	+1723
- доля прироста по удою, %	17,1	12,0	18,6	22,2	25,2	27,7	30,8	33,1	36,5
- разность по м.д. жира, %	0,10	0,12	0,09	0,18	0,20	0,29	0,29	0,35	0,39
- доля прироста по м.д. жира в %	2,7	3,2	3,0	4,7	5,2	7,6	7,8	9,2	10,2
- разность по м.д. белка, %	0,15	0,13	0,12	0,12	0,07	0,07	0,07	0,09	0,11
- доля прироста по м.д. белка в %	5,1	4,3	3,9	3,9	2,2	2,2	2,2	2,6	3,5

Примечание: *** - P<0,001; ** - P<0,01.

Рис. 1. Разница между здоровыми и переболевшими первотёлками по удою, м.д. жира и белка



ция глубококостельных коров и нетелей направлены на создание пассивного иммунитета у новорожденных телят до наступления у них после вакцинации собственного активного иммунитета.

С целью контроля титра противовирусных антител в сыворотке крови через 2 недели после второй вакцинации у телят брали кровь. Титры антител проверяли в лаборатории вирусологии ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина.

При изучении поствакцинального иммунитета установили, что на повышение титра противовирусных антител оказало влияние применение иммуномодулятора ронколейкина (табл.1). Титр противовирусных антител после вакцинации в комплексе с иммуномодулятором оказался выше к вирусу ИРТ и ПГ-3 в 2–4 раза. Наименее выраженный стимулирующий эффект оказало применение иммуномодулятора при вакцинации против вирусной диареи.

Массовая комплексная вакцинация позволяет создать иммунитет у большого числа животных, в короткое время снизить выделение и циркуляцию вирусов, вплоть до их элиминации в контролируемой популяции.

Оздоровительные мероприятия против вирусных респираторных заболеваний способствовали ежегодному улучшению производственных показателей в хозяйстве. Среднесуточный прирост живой массы у здоровых тёлочек увеличился на 21%, а у переболевших за этот же период времени – на 9,5%. Значительно уменьшились отход и выбраковка тёлочек, тем самым значительно снизился экономический ущерб от их выбытия.

Себестоимость тёлки при рождении составляет около 6,5 тыс. рублей, а на её выращивание до нетели требуется ещё 37,5 тыс. рублей (с учётом ветеринарно-профилактических мероприятий). Таким образом, через 27 месяцев к моменту отёла на это животное будет потрачено около 45 тыс. рублей. Если тёлка пала или была выбракована до отёла, то для ремонта стада вынужденная закупка нетели из российских регионов составит 90–110 тыс. рублей, а из зарубежных стран – 135–160 тыс. руб. [6].

Повышение среднесуточных приростов живой массы тёлочек позволило снизить возраст их первого плодотворного осеменения с 21,7 месяца в 2007 году до 18,1 месяца в 2016 году при достижении ими живой массы не менее 395–425 кг. Высокая энергия роста тёлочек наилучшим образом способствовала проявлению их повышенной молочной продуктивности (табл. 2).

Если переболевшая в раннем возрасте тёлка содержится до плодотворного осеменения и первой лактации, то в связи с низкими приростами живой массы возрастают расходы на её содержание и кормление в течение 4,8 – 5,7 месяцев. При дальнейшем благоприятном стечении обстоятельств для таких первотёлочек мы получаем надой ниже на 14,7 – 26,8% при сравнительно низкой массовой доле жира 3,67 – 3,82%, белка 2,96 – 3,12%, тогда как у не переболевших сверстниц эти показатели составляли 3,75 – 4,21% и 3,11 – 4,21% соответственно (табл. 2, рис. 1). Надой не переболевших в раннем возрасте первотёлочек оказались

выше, чем у переболевших в среднем на 24,8%, жирность молока была у них выше, чем у переболевших сверстниц на 5,6%, а белкомолочность – на 3,32% (табл. 2).

Выводы

1. В производственных условиях – в хозяйстве, неблагополучном по вирусным респираторным заболеваниям телят – доказана эффективность иммунопрофилактических мероприятий, при этом заболеваемость респираторными инфекциями снизилась с 26–28% до единичных случаев в 2016 году.

2. Наибольшее повышение титров противовирусных антител в сыворотке крови телят выявлено при иммунизации вакциной в комплексе с иммуномодулятором ронколейкином.

3. Использование метода комплексной иммунопрофилактики тёлочек привело к снижению затрат на их содержание и кормление благодаря более раннему плодотворному осеменению тёлочек, а молочная продуктивность возросла на 786 – 1723 кг молока.

4. За счёт улучшения сохранности молодняка и взрослых животных снизились затраты на ремонт стада, появилась возможность реализации сверхремонтного молодняка, что повысило рентабельность молочной отрасли в хозяйстве.

Список литературы

1. Голенских А.Г. Иммунный статус и его коррекция у высокопродуктивного крупного рогатого скота импортной селекции в условиях Липецкой области / А.Г. Голенских, И.В. Жуков // Ветеринария и кормление.- 2011.- №3.- С.20-21.
2. Карпуть И.М. Механизм развития и биотехнологические способы профилактики дефицитов / И.М. Карпуть, М.П. Бабица.- Витебск: Учёные записки УО ВГАВМ, 2006.- Т.42.- Вып.1.- С.25-27.
3. Красочко П.А. иммунодефицит и его коррекция при ИРТ и ВД у телят / П.А. Красочко, И.А. Красочко, С.М. Усов // Ветеринарная наука - производству. Научные труды БелНИИЭВ.- Минск:Хата, 2000.- Т. 34.- С.40-50.
4. Моисеев А.Н. Эффективный способ профилактики инфекционных заболеваний / А.Н. Моисеев, А.А. Некрасов // Агрорынок.- 2011.- №1.- С. 18-21.
5. Некрасов А.А. Коррекция иммунного статуса телят черно-пестрой голштинской породы с целью профилактики респираторных инфекционных заболеваний / А.А. Некрасов, О.А. Артемьева, Н.А. Попов, Н.А. Некрасова, Е.Г. Федотова, А.Н. Моисеев, В.Н. Муравьев // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. Материалы междунар. науч.-практ. конф., посвященной 45-летию ВНИТИБП.- Щёлково, 2014.- С. 140-146.
6. Олейник А. Экономика в ветеринарии современного молочного комплекса / А. Олейник // Молочное и мясное скотоводство. Спецвыпуск по молочному скотоводству.- 2012.- С.37-39.
7. Придыбайло Н.Д. Иммунодефициты у сельскохозяйственных животных и птиц, профилактика и лечение их иммуномодуляторами. Обзорная информация.- М.:ВНИИ-ТЭИ агропром, 1991.- 44с.
8. Самохин В.Т. Критерии оценки продуктивного здоровья животных / В.Т. Самохин // В кн. "Профилактика нарушений обмена микроэлементов у животных".- Дубровицы, 2007.- С.7-13.
9. Фёдоров Ю.Н. Иммунодефициты домашних животных / Ю.Н. Фёдоров, О.Н. Верховский.- М., 1996.- 96с. Библиотека портала Ветеринарная энциклопедия. <http://web.vet.ru>
10. Шариков Д.В. Генетика - выгода по наследству / Д.В. Шариков // Животноводство России. Тематический выпуск. Молочное и мясное скотоводство.- 2015.- С.10-13.
11. Шахов А.Г. Методические рекомендации по оценке и коррекции иммунного статуса животных / А.Г. Шахов, Ю.Н. Масыанов, М.И. Рецкий.- Воронеж: Издательство "Истоки", 2005.- 115с.

УДК: 619: 615.371:616.98579.842.11:636

Генетикоиммунологическая обусловленность патологии особей высокопродуктивной черно-пестрой породы крупного рогатого скота – основа разработки ветеринарных препаратов

Объедков Г.А. – доктор ветеринарных наук, профессор РУП "Институт экспериментальной ветеринарии имени С.Н. Вышелесского", 220003, г. Минск, Беларусь, тел. (+37517)50-88 -357, e-mail: kratnost@tut.by

Аннотация. Длительное скрещивание особей с одинаковыми геномами по отдельным признакам (в частности, молочность) позволило создать высокопродуктивную черно-пеструю породу крупного рогатого скота и одновременно гомозиготность с выраженной патологией многих физиологических систем организма. Профилактику некоторых форм патологии можно обеспечить за счет препаратов, изготовляемых на основе теории о регулирующей роли главного комплекса гистосовместимости, что демонстрируется примером способности одного из них предупреждать у коров эмбриональную смертность.

Ключевые слова: Черно-пестрая порода, гомозиготность, эмбриональная смертность, крупный рогатый скот

Genetic-immunology conditionality pathology of productive animals of black-motley breed of cattle – the basis of the development of veterinary drugs

Obedkov G.A.

Long crossing of individuals with identical genomes on separate signs (in particular, a molochnost) allowed to frame high-milk black and motley breed of cattle and at the same time a homozygosis with the expressed pathology of many physiological systems of an organism. Prophylaxis of some forms of pathology can be provided at the expense of the drugs produced on the basis of the theory about the regulating role of the main complex of histocompatibility that is shown by an example of ability of one of them to warn at cows a fetal mortality.

Key words: Black-motley breed, homozygotes, embryonic mortality, cattle.

Черно-пестрая порода крупного рогатого скота развилась с 60-х годов 20-го столетия в СССР по Программе широкомасштабной селекции (руководитель - Л.К.Эрнст) на основе близкородственного разведения, т.е. скрещивания, точнее, искусственного осеменения высокопродуктивных коров, спермой быков, происходящих от высокопродуктивных матерей [9]. Вместе с признаком "высокая молочная продуктивность" селекционировались также признаки "удлиненное и хорошо омускуленное туловище, крепкая спина и поясница, хорошо развитые и правильно поставленные конечности с крепким копытным рогом, вымя больших размеров, железистое чашевидной формы" [4,7]. В результате 50-летней работы генетиков и зооинженеров (ветеринары не были исполнителями этой программы) была создана высокопродуктивная черно-пестрая порода крупного рогатого скота. В 1996 году Украина декларировала свою популяцию как "украинская черно-пестрая порода", в 2006 году утверждена "белорусская черно-пестрая порода"; не известно, декларирована ли своей российской частью породы. Указанная порода позволяет на практике получать до 5000 кг молока в год, обеспечивая экономическую безопасность народов указанных стран.

Вместе с тем, в процессе разведения в потомстве выявлялись аномалии и болезни:

- иммунной системы – иммунодефицит лейкоцитарной адгезии (BLAD);
- иммунодефицит – комплексный порок позвоночника (CVM);

– иммунодефицит фермента уридинмонофосфатсинтазы (DUMPS).

– системы воспроизводства – гипофункция, кистозность яичников, атония матки, персистенция желтого тела, обуславливающие удлинение срока сервис – и межотельного периода, эмбриональная смертность, аборт, мертворождаемость, рождение нежизнеспособных телят и телят гипертрофиков;

– нервно – мышечной, скелетной систем – атрофия, обуславливающая хромоту, болезни конечностей;

– обмена веществ – кетонурия, ожирение (Аксенов А.М. [1], Попков Н.А., Шейко И.П., Петрушко И.С. и др. [7], Зиновьева Н.А [3], Курак А.В. [5].)

Перечисленные признаки и пороки характеризуют генотип и фенотип высокопродуктивной черно-пестрой породы. Генетикоиммунологическая литература постулирует, что размножение плацентарных млекопитающих осуществляется под контролем главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex) и его генов, называемых антигенами HLA (Human leucocyte antigens). Система HLA обеспечивает регуляцию иммунного ответа, начиная с распознавания "своего и чужого", запуска и взаимодействия всех иммунокомпетентных клеток, включая процесс оплодотворения, имплантации зиготы, беременности, роста, рождения плода. Многообразие функций HLA обеспечивается его расширенным генным комплексом, называемым "полиморфной системой HLA" [8]. Вольная случка диких и полудиких животных обогащает HLA. Искусственное осеменение, да еще близкородственное по какому – то признаку домашних животных, обедняет HLA, что обуславливает все перечисленные выше формы патологии. В упрощенной форме можно сказать, что иммунитет у высокопродуктивных особей определяется степенью родственности спариваемых гамет отца и матери. Чем большая разница в их геномах, тем большим полиморфизмом МНС, характеризуется потомок. И, наоборот, при сближенных свойствах геномов отца и матери, тем меньший полиморфизм у их потомков.

Н.В. Казаровец [4], постулирует, что при разведении "в себе" (внутри группы) на втором этапе селекционного процесса наблюдается улучшение хозяйственно полезных признаков (количество молока), но одновременно начинает возрастать гомозиготность. Гомозиготность в генетике оценивается как конечный результат отбора в селекции особей с каким-либо признаком, так как характеризует уже нерасщепляющуюся линию с тем или другим желательным признаком [2].

Зиновьева Н.А [3] сообщает о поступательном росте гомозиготности в высокопродуктивных породах скота. Так, у голштинского скота США показатель гомозиготности вырос с 0,4 в 1970 году до 5,8 % в 2012 г. Причинами такого явления считаются низкий исходный уровень генетического разнообразия в большинстве молочных пород, ограниченного числа родоначальников практикуемое в течение более 50 лет. На основании изложенных теоретических воззрений был приготовлен ветеринарный препарат, предназначенный для предупреждения эмбриональной смертности у высокопродуктивных коров. Об эмбриональной смертности судили по показателю многократности охот с безрезультатными осеменениями (Нежданов). Разработали технологию применения, дозу введения препарата. В настоящее время препарат проходит производственные испытания. Проведенные испытания показали определенную эффективность профилактики эмбриональной смертности у высокопродуктивных коров. В таблице приведены примеры как эффективного, так и не эффективного (минус) действия препарата. Причем, профилактическое действие обнаруживается как у коров с 5 – 7, так и с 2 – 3 охотами и осеменениями.

Имеются основания считать, что препарат является иммуностропным, аналогом эмбриостабила, поддерживающим (хелпер) беременность.

Список литературы

1. Аксенов, А.М.. Задачи ветеринарной медицины в стабильном развитии животноводства республики// Международная научно-практическая конференция "Современные вопросы патологии сельскохозяйственных животных". - Мн.: 2003.- С.3 - 5.

2. Жигачев, А.И. О накоплении груза мутаций в породах крупного рогатого скота при интенсивных технологиях воспроизводства и улучшения по целевым признакам/ А.И. Жигачев, Л.К. Эрнст, А.С. Богачев//Сельскохозяйственная биология, 2008. - №6.

3. Зиновьева, Н. Моногенные наследственные дефекты и их роль в воспроизводстве/ Н. Зиновьева, Н.Стрекозов [и др.]. - Животноводство России. - Июнь. - 2015. - С.30-31.

4. Казаровец, Н.В. Теоретические и практические аспекты селекционно-племенной работы в скотоводстве: монография/ Н.В. Казаровец// Минск: БГАТУ, 2005. - 320 с.

5. Курак, О.П. Комплексный порок позвоночника крупно-

го рогатого скота/ О.П. Курак, Л.А. Баранова [и др.]//Тезисы докладов международной научно-практической конференции (14-15 сентября 2011 г.)//Повышение интенсивности и конкурентоспособности отраслей животноводства. - Часть 1.- Жодино.- 2011 г. - С.100-101.

6. Нежданов, А.Г. Эмбриональные потери и эндогенные факторы риска их проявления у молочных коров/ А.Г. Нежданов, В.И. Михалев, Е.Г. Лозовая, Ю.Н. Масьянов, О.Ю. Фоменко// Ветеринария.-2015.-№ 7.- С. 39 - 43.

7. Попков, Н.А. Республиканская программа по племенному делу в животноводстве на 2007 -2010 годы/ Н.А. Попков, И.П. Шейко, И.С. Петрушко [и др.]// Жодино, 2008. - 475 с.

8. Хаитов, Р.М. Физиологическая роль главного комплекса гистосовместимости человека/ Р.М. Хаитов, П.П. Алексеев/ Иммунология. -2001.- №3.

9. Эрнст, Л.К. Биологические проблемы животноводства в XXI веке/ Л.К.Эрнст, Н.А. Зиновьева.- М.,2008.- С.279 -280.

Таблица. Результаты применения препарата коровам с признаками эмбриональной смертности

№ инв.	год рождения	Дата последнего отела	Даты охоты и осеменения							Дата отела
			1-ая охота	2-ая охота	3-я охота	4-ая охота	5-ая охота	6-ая охота	7-ая охота	
517/ 14697	2010	01.09.12	17.12.12	08.02.13	20.03.13	08.05.13	11.06.13	13.07.13	<i>03.08.13</i> <i>24.08.13</i>	01.06.2014
573/ 01278	2011	19.04.13	03.06.13	25.06.13	06.08.13	<i>20.09.13</i>	<i>15.10.13</i>			18.07.2014
601/ 444	2006	18.02.13	16.04.13	05.06.13	04.07.13	19.08.13	<i>16.09.13</i>	<i>16.10.13</i>		18.07.2014
619/ 87384	2007	06.11.14	12.12.14	11.01.14	<i>02.02.15</i>	01.04.15		21.04.15	17.05.15	-
645/ 87401	2011	01.09.14	02.11.14	23.11.14	20.12.14	<i>10.01.15</i>	<i>24.02.15</i>	18.03.15	<i>04.05.15</i> и 17.07.15	-
558/ 87090	2011	17.07.14	26.10.14	02.02.15 аборт	<i>07.04.15</i>					08.01.2016
550871 03	2010	10.08.14 аборт	01.02.15	19.02.15	<i>11.03.15</i>					17.12.2015
539/ 87110	2009	27.10.14	18.12.14	28.01.15	14.03.15	<i>22.04.15</i>				17.01.2016
41/ 87209	2010	02.01.15	23.02.15	15.03.15	26.04.15	01.09.15 аборт	10.12.15			13.09.2016

Примечание: жирный красный курсив – дата очередной охоты, осеменения и введения препарата

УДК 619:616-002.5:616.9

Противовирусное действие препаратов фоспренил и гампрен в отношении флавивирусов

¹Ожерелков С. В.- доктор биологических наук, заведующий лабораторией иммунологии и культур тканей, E-mail: ozherelkov@yandex.ru

²Санин А.В.- доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета, E-mail: saninalex@inbox.ru

³Наровлянский А. Н.- доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией цитокинов, E-mail: narovl@yandex.ru

⁴Пронин А. В.- доктор биологических наук, профессор заместитель директора, E-mail: proninalex@yandex.ru

⁵Кожевникова Т. Н.- кандидат медицинских наук, тел: 8-499-190-58-51, E-mail: tatiana@micro-plus.ru

¹ФГБНУ "ФНЦИРИП им.М.П.Чумакова РАН", 142782, Москва, поселение Московский, пос. Институт полиомиелита, 27-й км Киевского шоссе;

²ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Аннотация. Показано, что препараты на основе фосфорилированных полиизопреноидов природного происхождения - Фоспренил и Гамапрен оказывают противовирусное действие против флавивирусов. Ингибирование репродук-

ции вирусов семейства Flaviviridae с помощью данных препаратов показано в отношении вируса клещевого энцефалита, вируса желтой лихорадки и вируса диареи крупного рогатого скота.

Ключевые слова: линия клеток, вирусы, иммуномодуляторы.

Phosphorilated polysoprenoids of natural origin exert antiviral effect against flaviviruses

Ozherelkov S.V., Kozhevnikova T.N., Narovlyansky A.N., Pronin A.V., Sanin A.V.

Phosprenyl and Gamapren (immunomodulators with antiviral activity obtained by phosphorylation of natural polysoprenoids) were shown to inhibit reproduction of several members of Flaviviridae family. This effect was shown with tick-borne encephalitis virus, yellow fever virus and virus of cattle diarrhea.

Key words: cell line, viruses, immunomodulators

Вирусы семейства Flaviviridae являются возбудителями опасных, социально значимых инфекций, распространенных в России (клещевой энцефалит), а также в регионах Азии, Африки и Латинской Америки (лихорадка Денге, желтая лихорадка, лихорадка Западного Нила). К числу флавивирусных инфекций, наиболее значимых в ветеринарной практике, относят в том числе вирусную диарею крупного

рогатого скота (ВД КРС), возбудителем которой является РНК-содержащий вирус, относящийся к роду Pestivirus, семейству Flaviviridae [1].

Значимость вируса клещевого энцефалита в ветеринарии значительно меньше, однако накапливаются данные о том, что он патогенен не только для людей, но и для собак, у которых способен вызывать менингоэнцефалит с летальным исходом.

В настоящее время для лечения и профилактики вышеперечисленных флавивирусных инфекций отсутствуют достаточно надёжные и эффективные противовирусные препараты.

Цель данной работы - изучение противовирусной активности препаратов, действующим началом которых являются полипренилфосфаты натрия (ППФ), полученные путём фосфорилирования полиизопреноидов, выделенных из хвои сосны (Фоспренил) или листьев шелковицы (Гамапрен) в отношении вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), вируса жёлтой лихорадки (ВЖЛ) и ВД КРС *in vitro*.

Материалы и методы

В опытах использовали перевиваемую линию клеток СПЭВ, полученную из лаборатории культур клеток ФГБНУ "ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН", а также перевиваемую линию клеток PS, полученную из American Cell Culture Collection (США) и перевиваемую культуру клеток коронарных сосудов телёнка (КСТ).

ВКЭ (вакцинный штамм Софьин) был получен из отделения энцефалитной вакцины ФГБНУ "ФНЦИРИП им.М.П.-Чумакова РАН". Вирус использовали в виде суспензии головного мозга заболевших мышей-сосунков, зараженных интрацеребрально разведенной в 10 раз средой в 10 раз на расторе Эрла. Вирус титровали в культуре СПЭВ методом бляшкообразования. Титры вируса выражали в Ig БОЕ/мл. Также в работе использовали ВЖЛ (штамм 17D), полученный из отделения жёлтой лихорадки ФГБНУ "ФНЦИРИП им.М.П.Чумакова РАН" и ВД КРС (штамм ВК-1), полученный из ВИЭВ им. Я.Р.Коваленко.

В работе использовали коммерческие препараты - Фоспренил (ФП) производства ЗАО "Микро-плюс" и препарат Гамапрен (ГП) производства ООО "ГамаВетФарм", действующим началом которого являются ППФ, выделенные из листьев шелковицы (*Morus spp*).

Противовирусную активность ФП и ГП оценивали по их способности подавлять инфекционность ВКЭ, ВЖЛ и ВД КРС в чувствительных культурах клеток - СПЭВ, PS и КСТ, соответственно. Препараты во всех случаях вносили в культуру клеток одновременно с вирусом.

Результаты и обсуждение

ФП и ГП в дозах 200 и 400 мкг/мл подавляли инфекционность ВКЭ в культуре клеток СПЭВ в 100 и более раз по сравнению с контролем - титры вируса во внелеточном урожае через 24 часа после инфицирования клеток в присутствии ФП или ГП были на 2,3-2,4 lg БОЕ/мл ниже, чем во внелеточном урожае вируса, полученного в клетках без добавления препаратов.

ФП и ГП в дозе 100 мкг/мл подавляли репродукцию ВЖЛ в культуре клеток PS более чем в 100 раз по сравнению с контролем (титры вируса в клетках в присутствии ФП или ГП были на 2,3 lg БОЕ/мл ниже, чем в клетках без добавления препаратов).

ФП и ГП в дозе 200 мкг/мл подавляли способность ВД КРС размножаться в культуре клеток КСТ в 30 раз по сравнению с контролем (титры вируса в клетках в присутствии ФП или ГП были на 1,5 lg (титры вируса в клетках в присутствии ФП или ГП были на 1,5 lg ТЦД₅₀/мл меньше, чем в клетках без добавления препаратов). При этом ни одна из испытанных доз препаратов не была токсичной для клеток.

Одним из механизмов ингибирующего воздействия полиизопреноидов на репродукцию флавивирусов может быть подавление созревания вирусных белков - предварительные экспериментальные данные свидетельствуют в пользу такого предположения.

Таким образом, в результате проведённых исследований было установлено, что препараты ФП и ГП, широко применяемые в ветеринарной практике [6], обладают существенной противовирусной активностью в отношении флавивирусов - возбудителей социально значимых инфекций (ВКЭ и ВЖЛ), а также ВД КРС - возбудителя заболевания крупного рогатого скота, широко распространённого во всём мире, в том числе и в России. Значимость вируса клещевого энцефалита в ветеринарии значительно меньше, однако накапливаются данные о том, что он патогенен не только для людей, но и для собак, у которых способен вызывать менингоэнцефалит с летальным исходом. Случаи излечения при этом довольно редки, однако такие данные есть [5]. В нашей стране подобных исследований, к сожалению, не проводилось. По нашему мнению, клещевой энцефалит может играть важную роль в инфекционной патологии собак как в России, так и странах ближнего зарубежья (Беларусь, страны Балтии), учитывая большое количество очагов клещевого энцефалита в этих странах и распространённость этого заболевания у людей (в том числе и владельцев собак) [3]. Гипотетически можно себе представить, что больная клещевым энцефалитом собака (или животное-носитель с высоким уровнем вируса в крови) способна представлять опасность для человека. В экспериментах по моделированию клещевого энцефалита у лабораторных животных было показано, что фоспренил, введённый в организм животных однократно одновременно с ВКЭ, обладает способностью защищать от клещевого энцефалита до 60% мышей [4].

Обследование внутренних органов (головной мозг, лимфоузлы, селезёнка), являющихся обычно резервуаром для длительного сохранения живого ВКЭ у выживших после заражения вирусом и лечения фоспренилом мышей, показало полное отсутствие живого ВКЭ в этих органах. Полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что фоспренил может быть рекомендован для профилактики клещевого энцефалита, например, в том случае, если собака укусила клещ. Помимо этого фоспренил обладает выраженной адьювантной активностью и значительно - в 8-10 раз - повышает эффективность активности вакцины против клещевого энцефалита [3]. Учитывая то обстоятельство, что в настоящее время отсутствуют лечебно-профилактические препараты против вышеуказанных флавивирусных инфекций (за исключением вакцин против ВКЭ и ВЖЛ), представляется возможным использовать для этой цели препараты фоспренил и гамапрен, широко применяемые в ветеринарной практике.

Список литературы

1. Глотова Т.И., Сильников В. Н., Королева Л. С., Кунгурцева О. В., Тихонов В. Л., Глов А. Г. Противовирусная активность нового химического соединения. Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2014 №3. С. 22-24.
2. Ожерелков С.В., Калинина Е.С., Кожевникова Т.Н., Санин А.В., Тимофеева Т.Ю., Тимофеев А.В., Стивенсон Д.Р. Экспериментальное исследование феномена антителозависимого усиления инфекционности вируса клещевого энцефалита *in vitro*. ЖМЭИ 2008 №6. С.39-43
3. Радюк Е. В., Василевич Ф. И., Волгина Н. С. Распространенность анаплазмоза, боррелиоза и клещевого энцефалита у собак в г. Иркутске // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. - 2015. - № 4. - С. 22-23.
4. Санин А.В., Суслев А.П., Третьяков О.Ю., Зварцев Р.В., Саличев А.В., Кожевникова Т.Н., Санина В.Ю., Смирнова Е.Г., Ожерелков С.В. Разнонаправленное влияние MIF и полипренилфосфата на течение экспериментальной флавивирусной инфекции у мышей. Ж.микробиол. 2011 №5, С.56-61.
5. Санин А.В., Липин А.В., Зинченко Е.В. Ветеринарный справочник традиционных и нетрадиционных методов лечения собак. М.Центрполиграф 2007, 580 с.
6. Санин А.В., А.Н.Наровлянский, С.В.Ожерелков, А.В.Пиронин, В.Ю.Санина. Иммуномодуляторы в ветеринарной практике - применение и противоречия. Ветеринарная клиника. 2008.№10-12.

УДК 619:616.5-085.322

Фоспренил стимулирует иммуногенность вакцин против бешенства и клещевого энцефалита

¹Ожерелков С. В. - доктор биологических наук, заведующий лабораторией иммунологии и культур тканей, E-mail: ozherelkov@yandex.ru

²Санин А. В. - доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета, Тел.+7(499)190-58-51 E-mail: saninalex@inbox.ru

³Наровлянский А. Н. - доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией цитокинов, Тел.: +7(499)1934306. E-mail: narovl@yandex.ru

⁴Пронин А. В. - доктор биологических наук, профессор, заместитель директора института, Тел.: +7(499)1905741, E-mail: proninalexander@yandex.ru

⁵Кожевникова Т. Н. - кандидат медицинских наук, тел: 8-499-190-58-51 E-mail: tatiana@micro-plus.ru

⁶ФГБНУ "ФНЦИРИП им.М.П.Чумакова РАН", 142782, Москва, поселение Московский, пос. Институт полиомиелита, 27-й км Киевского шоссе;

⁷ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Аннотация. Работа проведена с целью выявить возможный потенцирующий эффект препарата Фоспренил в отношении иммуногенности вакцин против клещевого энцефалита и бешенства. Показано, что фоспренил существенно повышал специфическую протективную активность антирабической вакцины: при совместном введении индекс иммунизации повышался в 1.9 раз по сравнению со схемой иммунизации без ФП. Введение ФП одновременно с вакциной КЭ приводило к увеличению значения PR_{50} в 1,5 раза. Соответственно, MID_{50} при использовании ФП оказалась на 50% меньше, чем при использовании одной лишь вакцины. Кроме того, показатель сравнительной иммуногенности вакцины КП был в 1,6 раза выше при схеме вакцинации с использованием ФП. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ФП способен потенцировать специфическую иммуногенность вакцин против клещевого энцефалита и бешенства. Эффект ФП наблюдался как при в/б, так и при п/к иммунизации.

Ключевые слова: Фоспренил, иммуногенность вакцин, бешенство, клещевой энцефалит.

Phosprenyl augments immunogenicity of rabies vaccine and tick-borne encephalitis vaccine

Ozherelkov S.V., Kozhevnikova T.N., Narovlyansky A.N., Pronin A.V., Sanin A.V.

The problem of new effective and potent adjuvants development able to augment immunogenicity of viral vaccines is still highly important. This study was carried out to identify the possible potentiating effect of Phosprenyl towards the immunogenicity of vaccines against tick-borne encephalitis and rabies. It is shown that Phosprenyl significantly increased specific protective activity of rabies vaccines: joint inoculation led to increase of the immunization index about 1.9-fold in comparison with the scheme of immunization without Phosprenyl. Similar results were obtained after inoculation of Phosprenyl simultaneously with TBE vaccine. Thus, the findings suggest that the Phosprenyl is able to potentiate the specific immunogenicity of vaccines against tick-borne encephalitis and rabies. The effect of FP was observed both after i.p. and s.c immunization. We conclude that Phosprenyl may be used in pets for enhancement of different viral vaccine effectiveness.

Key words: Phosprenyl, immunogenicity of vaccine, rabies, tick-borne encephalitis.

Проблема разработки и внедрения новых эффективных адъювантов для противовирусных вакцин по-прежнему

актуальна. Ее решение позволит сократить число ревакцинаций, что не только снизит антигенную нагрузку на организм, но также значительно упростит и удешевит сам процесс вакцинации домашних животных. К таким адъювантам предъявляются четкие требования: они должны значительно повышать иммуногенность вакцин и напряженность иммунитета, не обладать токсичностью и аллергенностью [2]. В настоящей работе изучали адъювантные свойства Фоспренила - иммуномодулятора с противовирусной активностью, широко применяемого в практической ветеринарии при лечении инфекционных заболеваний мелких домашних животных.

Цель данного исследования - выявить возможный потенцирующий эффект препарата Фоспренил в отношении иммуногенности вакцин против клещевого энцефалита и бешенства.

Материалы и методы

Животные. Использовали мышей линии Balb/c, массой 14-16 г., полученных из питомника "Столбовая".

Вакцина. Использовали коммерческую инактивированную вакцину против клещевого энцефалита производства ФГБНУ "ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН" и антирабическую вакцину производства ФГУП "НПО Микроген".

Препарат. Использовали коммерческий препарат фоспренил (ФП) производства ЗАО "Микро-плюс" г.Москва, Россия.

Схемы проведения экспериментов

1. Каждая группа состояла из 15 мышей линии Balb/c. Для оценки адъювантной активности ФП препарат согласно инструкции по применению вводили в дозе 0,05 мл/кг веса (4 мкг/мышь) однократно, в/м, во время вакцинации мышей, вакцину в соответствующих разведениях вводили по стандартной схеме. Контрольных мышей иммунизировали только вакцинами - дважды с 1-недельным интервалом. 7 дней спустя мыши были заражены одним из 2-х вирусов. Вирус клещевого энцефалита вводили в/б, в дозе 100 ЛД₅₀/0,2 мл, а вирус бешенства п/к, в дозе 600 ЛД₅₀/0,1 мл. За мышами наблюдали 14 суток, результаты обсчитывали по методу Рида и Менча и вычисляли следующие показатели: MID_{50} - минимальная иммунизирующая доза, обеспечивающая 50% защиты животных, PR_{50} - разведение вакцины, обеспечивающее 50% защиты животных, КП - коэффициент протективности вакцины.

Результаты

Показано, что фоспренил существенно повышал специфическую протективную активность антирабической вакцины: при совместном введении индекс иммунизации повышался в 1.9 раз по сравнению со схемой иммунизации без ФП. Введение ФП одновременно с вакциной КЭ приводило к увеличению значения PR_{50} в 1,5 раза. Соответственно, MID_{50} при использовании ФП оказалась на 50% меньше, чем при использовании одной лишь вакцины. Кроме того, показатель сравнительной иммуногенности вакцины КП был в 1,6 раза выше при схеме вакцинации с использованием ФП. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ФП способен потенцировать специфическую иммуногенность вакцин против клещевого энцефалита и бешенства. Эффект ФП наблюдался как при в/б, так и при п/к иммунизации. В предыдущих исследованиях мы показали, что известный иммуномодулирующий препарат ФП, применяющийся при лечении вирусных инфекций у собак, кошек и других животных [3,4,6,7,8], значительно усиливает биологическую активность ряда вакцин [1]. Показано также, что ФП как адъювант поляризует иммунный ответ в сторону Th1, повышает естественную резистентность, стимулирует продукцию интерферонов, интерлейкинов-1, -12, фактора некроза опухолей, активность естественных киллерных клеток и фагоцитоз [5].

Продемонстрированная в настоящей работе способность Фоспренила усиливать специфическую иммуногенность вакцин против клещевого энцефалита и бешенства позволяет рекомендовать его для применения в качестве адъюванта при соответствующих схемах вакцинации.

Список литературы

1. Кожевникова Т.Н., Воронич М.Ф., Козлов В.Г., Ожерелков С.В., Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Санин А.В. Использование фоспренила в качестве адъюванта для вакцин и стимулятора продукции специфических антител при изготовлении гипериммунных сывороток. ИРСО 2006 N2
2. Козлов В.Г., С.В.Ожерелков, А.В.Санин, Т.Н.Кожевникова. Адъюванты в современной медицине и ветеринарии. Журн.микробиол., 2014, #1, С.91-102.
3. Наровлянский А.Н., Березина Л.К., Веткова Л.Г., Степанова Т.Н., Савойская С.Л., Зубашев И.К., и др.; Лечение герпесвирусных инфекций с помощью препаратов полипренолов. Ветеринарная клиника, №2, 2005.
4. Переслегина И.О., А.А. Виденина, А.Н.Наровлянский, А.В.Пронин, А.В.Санин. Новое в лечении кошачьего инфекционного перитонита; Российский ветеринарный журнал. МДЖ; 2013; (1) 6-10.
5. Пронин А.В., Ожерелков С.В., Деева А.В., Санин А.В., Наровлянский А.Н. Полипренилфосфаты как адъюванты, поляризирующие иммунный ответ в сторону Th1. Инфекция и иммунитет. 2012. Т.2 N3, с.645-50
6. Руднева С.Ю., Наровлянский А.Н.,Пронин А.В., Степанова Т.Н., Санин А.В.; Лечение папилломатоза ротовой полости у собаки с использованием фоспренила; Российский ветеринарный журнал. МДЖ; 2016; (3) 9-11
7. Санин А.В.; Применение иммуномодуляторов при вирусных заболеваниях мелких домашних животных. Российский ветеринарный журнал. МДЖ; 2005 (1) 38-42.
8. Санин А.В., Пронин А.В., Наровлянский А.Н., Степанова Т.Н., Савойская С.Л., Зубашев И.К. и др. Влияние полипренилфосфата натрия на вирусный ринотрахеит кошек. Ветеринария; 2015; (11) 17-21.

УДК 619:616-002.5:616.9

Адъювантное действие фоспренила на иммуногенность антирабической вакцины у собак

¹Ожерелков С. В., доктор биологических наук, заведующий лаборатории иммунологии и культуры тканей,

E-mail: ozherelkov@yandex.ru

²Санин А. В., доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета,

E-mail: saninalalex@inbox.ru

³Наровлянский А. Н., доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией цитокинов,

E-mail: narovl@yandex.ru

⁴Пронин А. В., доктор биологических наук, профессор, заместитель директора института,

E-mail: proninalalexander@yandex.ru

⁵Кожевникова Т. Н., кандидат медицинских наук, Тел: 8-499-190-58-51

E-mail: tatiana@micro-plus.ru

¹ФГБНУ "ФНЦИРИП им.М.П.Чумакова РАН", 142782, Москва, поселение Московский, пос. Институт полиомиелита, 27-й км Киевского шоссе;

²ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Аннотация. Изучали возможный адъювантный эффект фоспренила (ФП) в отношении иммуногенности антирабической вакцины у собак породы кавказская овчарка. За 2 недели до начала испытаний всем собакам провели дегельминтизацию.

Схема эксперимента: собак разделили на 2 равные группы – контрольную и экспериментальную. В день 0 у каждой собаки из вены взяли кровь для проверки на наличие антител к вирусу бешенства (ВБ) в реакции РТГА с использованием стандартного антигена ВБ (штамм Внукovo-32) и свежих гусиных эритроцитов. В тот же день контрольных собак вакцинировали однократно в/м антирабической вакциной. Экспериментальным животным одновременно вводили ФП (2 мл, в/м). На 14-е сутки после вакцинации у контрольных и экспериментальных животных повторно брали кровь и обследовали на наличие антител к ВБ.

Установлено, что однократное введение ФП одновременно с антирабической вакциной приводит к более чем трехкратному повышению титра антител по сравнению с таковым у собак, которых иммунизировали только вакциной без ФП. Через 10 месяцев после иммунизации напря-

женность иммунитета у собак, иммунизированных антирабической вакциной совместно с ФП, достоверно выше, чем у собак, которых иммунизировали одной вакциной.

Ключевые слова: антирабическая вакцина, собаки, фоспренил

Phosprenyl exerts adjuvant effect on immunogenicity of the rabies vaccine in dogs

Ozherelkov S.V., Kozhevnikova T.N., Narovlyansky A.N., Pronin A.V., Sanin A.V.

We studied adjuvant effect of Phosprenyl (PP) towards immunogenicity of rabies vaccine in Caucasian shepherd dogs. 2 weeks before the tests all the dogs undergone deworming.

Experimental protocol: dogs were divided into 2 equal groups – control and experimental. On day 0 blood was taken from each dog to check for antibodies to the rabies virus (RV) in the hemagglutination braking reaction using standard RV antigen (strain Vnukovo-32) and fresh goose erythrocytes. On the same day, the control dogs were vaccinated i.m with rabies vaccine. Experimental animals were simultaneously injected with PP (2 ml, i.m). On the 14th day after the vaccination all the dogs in the control and experimental groups were re-bled and examined for the presence of antibodies to the RV.

We found that a single inoculation of PP simultaneously with rabies vaccine led to a more than 3-fold increase in antibody titer compared with control dogs. 10 months after immunization the immunity in dogs immunized with rabies vaccine in conjunction with PP was significantly higher than that of dogs, which were immunized with the vaccine only.

Key words: rabies vaccine, dog, fosprenil

В серии экспериментальных исследований на мышах было показано, что препарат фоспренил, известный иммуномодулятор с противовирусной активностью, широко применяемый в ветеринарной практике [1, 4,5], значительно повышает специфический протективный эффект моновалентной инактивированной антирабической вакцины и инактивированной культуральной вакцины против клещевого энцефалита. Полученные экспериментальные данные легли в основу проверки возможного адъювантного эффекта фоспренила (ФП) на иммуногенность антирабической вакцины у собак.

Материалы и методы. Испытания проводили на базе питомника "ХГС" (г.Дедовск Московской области). Для проведения эксперимента были отобраны 6 собак породы

кавказская овчарка (обоого пола) одного помета, возраст 3 года, масса 40–50 кг. Всех собак содержали в одинаковых условиях (в вольерах) и все они получали одинаковую пищу. Перед испытаниями собаки прошли тщательное обследование и были признаны клинически здоровыми. За 2 недели до начала испытаний всем собакам провели дегельминтизацию.

Для испытаний выбрана моновалентная инактивированная антирабическая (культуральная) вакцина производства ФГБНУ "ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН" В качестве стимулятора использовали ФП (0,4 % р-р) производства ЗАО "Микро-плюс". Схема эксперимента: 6 собак были разделены по группам и пронумерованы NN 1, 2, 3 – контрольные; NN 4, 5, 6 – экспериментальные. В день 0 у каждой собаки из вены взяли кровь для проверки на наличие антител к вирусу бешенства (ВБ) в реакции РТГА с использованием стандартного антигена ВБ (штамм Внуково-32) и свежих гусиных эритроцитов. В тот же день контрольных собак вакцинировали однократно в/м антирабической вакциной (1 мл). Экспериментальным животным одновременно вводили ФП (2 мл, в/м).

На 14-е сутки после вакцинации у контрольных и экспериментальных животных повторно брали кровь и обследовали на наличие антител к ВБ.

Для исследования напряженности иммунитета после совместного введения антирабической вакцины и ФП уровень антител к ВБ повторно определяли с помощью РТГА в сыворотках крови всех собак через 10 месяцев после вакцинации.

Результаты и обсуждение

Наблюдение за контрольными и экспериментальными животными показало, что ни у одной собаки не было выявлено побочных реакций на введение вакцины (или вакцины и препарата одновременно). Результаты исследования сывороток крови контрольных и экспериментальных животных на наличие антител к ВБ (до и через 14 дней после вакцинации) представлены в Таблице 1.

Результаты, представленные в таблице 1, свидетельствуют о следующем:

1. До вакцинации – две из трех контрольных и все три экспериментальных животных были серонегативными: в сыворотке крови этих собак антитела к ВБ практически отсутствовали. У одной из контрольных собак (N2) в сыворотке крови выявлены антитела к ВБ в низком титре 1: 8. Средние геометрические титров антител у контрольных и экспериментальных собак не отличаются.

Табл. 1. Адьювантный эффект Фоспренила при совместном введении с антирабической вакциной

№ собак	Титры антител в РТГА до вакцинации	Титры антител в РТГА после вакцинации
контрольная группа		
1	1 : 2	1 : 128
2	1 : 8	1 : 256
3	1 : 2	1 : 128
СРЕДНИЙ ТИТР	1 : 3,5	1 : 165
опытная группа		
4	1 : 4	1 : 1024
5	1 : 2	1 : 512
6	1 : 2	1 : 256
СРЕДНИЙ ТИТР	1 : 2,6	1 : 554

Табл. 2. Усиление напряженности иммунитета у собак через 10 месяцев после совместного введения антирабической вакцины и Фоспренила

№ собак	Группа	Титры антител в РТГА
1	Контрольные	1 : 4
2		1 : 16
3		1 : 4
4	Экспериментальные	1 : 32
5		1 : 64
6		1 : 32

2. Через 14 суток после вакцинации – у всех трех контрольных животных титры антител к ВБ были достаточно высокими (от 1 : 128 до 1 : 256). В то же время у двух из трех экспериментальных собак, которым вводили вакцину вместе с ФП, титры антител были значительно выше, чем у контрольных (разброс от 1 : 512 до 1 : 1024). Значение средней геометрической титра антител у экспериментальных животных более чем в 3 раза превышает таковую у контрольных собак (1 : 554 и 1 : 166, соответственно).

Таким образом, результаты проведенных испытаний показывают, что применение ФП совместно с моновалентной инактивированной антирабической вакциной способствует усилению иммунного ответа животных на введенный антиген через 2 недели после вакцинации.

Для исследования возможного эффекта усиления напряженности иммунитета при совместном введении вакцины и ФП, сыворотки крови собак, привитых только вакциной (контрольные), и животных, которым вводили антирабическую вакцину и ФП одновременно (экспериментальные), были повторно обследованы на наличие антител к ВБ в РТГА через 10 месяцев после вакцинации. Результаты представлены в Таблице 2

Полученные данные свидетельствуют о том, что через 10 месяцев после вакцинации в сыворотках крови контрольных собак, иммунизированных только антирабической вакциной, титры антител к вирусу достаточно низкие (от 1 : 4 у двух собак до 1:16 – у одной). В то же время у животных, которым вводили вакцину и ФП, титры антител значительно выше (в 4–8 раз).

Таким образом, ФП обладает свойством усиливать напряженность вакцинального иммунитета.

Известно, что иммунизация животных антирабической вакциной обеспечивает защиту на 1 год, вследствие чего требуется ежегодная ревакцинация. Использование ФП совместно с вакциной позволяет усилить протективный эффект вакцины и пролонгировать ее защитное действие. Преимущества совместного введения вакцины и ФП по сравнению с введением только вакцины заключаются, во-первых, в том, что сочетание вакцины с ФП позволяет более надежно защищать животных от вирусной инфекции, причем значительно дольше, чем в случае иммунизации одной вакциной, а во-вторых, применение ФП можно рекомендовать в случаях, когда иммунная система животного по тем или иным причинам не обеспечивает адекватного ответа при вакцинации.

Это связано с тем, что ФП повышает естественную резистентность, стимулирует продукцию интерферонов, интерлейкинов-1, -12, фактора некроза опухолей, активность естественных киллерных клеток и фагоцитоз [2] и способствует поляризации иммунного ответа в сторону Th1[3]

Важно отметить, что никаких побочных эффектов от совместной иммунизации вакциной и препаратом у собак не выявлено.

Выводы и рекомендации

1. Установлено, что однократное введение Фоспренила одновременно с антирабической вакциной приводит к более чем трехкратному повышению титра антител по сравнению с таковым у собак, которых иммунизировали только вакциной без фоспренила.

2. Через 10 месяцев после иммунизации напряженностью иммунитета у собак, иммунизированных антирабической вакциной совместно с фоспренилом, достоверно выше, чем у собак, которых иммунизировали одной вакциной.

3. Учитывая наблюдающийся рост количества мелких домашних животных с наличием того или иного иммунодефицита (неспособности организма вырабатывать эффективный иммунный ответ на антигенный раздражитель), можно рекомендовать фоспренил для использования в

качестве надежного и безопасного иммуностимулятора, повышающего уровень иммунного ответа и напряженность иммунитета после вакцинации.

4. Для усиления иммунного ответа животных при вакцинации фоспренил рекомендуется вводить однократно внутримышечно одновременно с вакциной в дозе 0,1 мл/кг массы тела. Возможно как введение в разные лапы, так и сочетанное введение в одном шприце с убитой вакциной в одну лапу.

Список литературы

1. Переслегина И.О., А.А. Виденина, А.Н. Наровлянский, А.В. Пронин, А.В.Санин Новое в лечении кошачьего инфекционного перитонита. Росс.ветер.журнал. МДЖ. 2013.№1. С.6-10.

2. Пронин А.В., С.В.Ожерелков, А.Н.Наровлянский, Л.Л.

Данилов, С.Д. Мальцев, А.В. Деева, Е.А.Григорьева, А.В. Санин. Роль цитокинов в иммуномодулирующих эффектах фосфатов полипренолов - противовирусных препаратов нового поколения. Russian J.Immunol. 2000, 5, №2. P.155-164.

3. Пронин А.В., Ожерелков С.В., Деева А.В., Санин А.В., Наровлянский А.Н. Полипренилфосфаты как адъюванты, поляризующие иммунный ответ в сторону Th1. Инфекция и иммунитет. 2012. Т.2 №3.С.645-50

4. Руднева С.Ю., Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Степанова Т.Н., Санин А.В. Лечение папилломатоза ротовой полости у собаки с использованием фоспренила. Российский ветеринарный журнал. МДЖ. 2016.№3. С.9-11

5. Санин А.В. Применение иммуномодуляторов при вирусных заболеваниях мелких домашних животных. Российский ветеринарный журнал. МДЖ. 2005.№1. С.38-42

УДК 619:577.27:636.4

Принципы иммунометаболической коррекции вторичных иммунодефицитов у свиней

¹Попов В.С. - доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник, e-mail: viktor.stugen@yandex.ru

²Самбуров Н.В. - доктор биологических наук, профессор, e-mail: samburov_nv@rambler.ru

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Курский научно-исследовательский институт агропромышленного производства", 305526, Курская область, Курский район, пос. Черемушки, РФ, телефон: (4712) 59-54-68.

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Курская государственная сельскохозяйственная академия имени профессора И.И.Иванова, 305021, Kursk, K. Marx St., 70. tel: 50-05-92.

Аннотация. Практика промышленного свиноводства убедительно доказывает необходимость совершенствования традиционно сложившихся схем профилактики заболеваний различной этиологии. При этом особую актуальность приобретает проблема вторичных иммунодефицитов и их иммунокоррекция у свиней различных половозрастных групп и физиологического состояния. В статье проведен анализ проявления физиологических иммунодефицитов у супоросных свиноматок и поросят в условиях промышленного производства свинины. Предложено авторское решения проблемы иммунокоррекции за счет применения иммуностимулятора "Металлосукцинат".

Ключевые слова: вторичные иммунодефициты, иммунокоррекция, свиньи.

Principles immunometabolic secondary immunodeficiency in pigs

Popov V. S., Samburov N. V.

Practice industrial pigs convincingly proves necessity of perfection of traditionally developed schemes of preventive maintenance of diseases of a various aetiology. Thus, the special urgency is got by a problem of secondary immunodeficiencies immunotherapy and them pigs at various age-sex groups and a physiological condition. In article the analysis of display of physiological immunodeficiencies at

gestating sows and pigs in the conditions of industrial pork production is carried out. It is offered author's solutions of a problem of immune at the expense of application of immunostimulant to "Metallosuksinat".

Key words: secondary immunodeficiencies, immunotherapy, pigs.

Промышленное свиноводство развивается по интенсивной технологии получения и выращивания поросят при высоком уровне обеспеченности всех технологических элементов производства. Особую актуальность, вызывает проблема целенаправленной иммунометаболической коррекции, в условиях промышленного свиноводства, особенно при эксплуатации высокогибридного маточного поголовья, селекционированного на интенсивную мясную продуктивность [10]. Следует отметить, что супоросные свиноматки, в определенные, прогнозируемые периоды, находятся в состоянии физиологического иммунодефицита, связанного с формированием и развитием плодов, подготовкой организма к продуцированию молозива и молока, а также применением химиотерапевтических препаратов и зачастую с несбалансированным кормлением, что вызывает состояние иммунодепрессии и изменения уровня и направленности обмена веществ.

Вместе с тем, высокая плотность поголовья, неоднородность иммунного статуса у животных, избыточный уровень энергетического питания в полнорационных комбикормах (11, 1-12,5 мДж обменной энергии в одном килограмме) при гипо- и адинамия супоросных свиноматок, создают условия при которых проявляются физиологические иммунодефицитные состояния в организме свиноматок. Перечисленные факторы оказывают отрицательное влияние на структурно-функциональную адаптацию новорожденных и подсосных поросят, их иммунный статус, микробиоценоз желудочно-кишечного тракта [12]. При этом следует учитывать, что поросята рождаются на более ранней стадии внутриутробного развития по сравнению с другими сельскохозяйственными животными, в состоянии физиологического иммунодефицита. Вместе с тем, они сохраняют максимальную скорость роста после рождения. Поросята в течение первых двух месяцев увеличивает массу тела в 18-20 раз, в то время как у теленка она возрастает не более чем в два раза. Установлено, что состав молозива свиноматок меняется очень быстро, например, через 6 часов после рождения первого поросенка концентрация иммуноглобу-

линов уменьшается на 45-50% от исходного количества [6].

Второй физиологический иммунодефицит проявляется у поросят в возрасте 2-3 недель, когда материнские антитела в основном уже элиминированы, а собственный иммунитет еще не активен [3;1]. В эти периоды целесообразным является повышение неспецифической резистентности организма и снижение отрицательных последствий токсикозов и технологического стресса за счет применения иммуностимуляторов. Повышение специфической устойчивости поросят-сосунов достигается путем иммунизации супоросных свиноматок в наиболее оптимальные физиологические периоды с учетом эпизоотической обстановки. При этом сочетание неспецифических и специфических средств профилактики иммунодефицитных состояний у супоросных свиноматок и подсосных поросят является актуальным и вызывает научный и практический интерес.

Обосновано выделение третьего периода проявления физиологического иммунодефицита при смене комбикормов (СК-3, СК-4) у поросят-отъемышей в период 43-60сут.

Для нормализации обменных процессов и повышения неспецифической естественной резистентности рекомендуется большое количество метаболических препаратов и стимуляторов иммунитета [4;11]. Тем не менее, среди достаточного большого количества препаратов лишь немногие получили широкое применение в практике ветеринарии. В основном это связано с недостаточностью стимулирующего эффекта или односторонним механизмом действия. Следует отметить, что практикуемое применение стимуляторов иммунитета, на фоне разбалансированных обменных процессов, не только не достигает желаемого результата, но может привести к получению отрицательного побочного действия. В этой связи, считаем правомерным реализацию концепции по одновременной стимуляции системы метаболизма и системы иммунитета. Для решения этой концептуальной задачи нами предложен авторский способ решения проблемы иммунокоррекции в производстве. Разработан комплексный иммунометаболический препарат - металлосукцинат (патент РФ №2351323 от 10.04.2009) и способ его применения в промышленном свиноводстве (патент РФ № 2393848 от 10.07.2010). При ее решении, обоснованным считали включение в состав комплексного препарата в качестве иммуномодулятора АСД ф-2, в качестве микроэлементов были использованы водорастворимые сернокислые соли железа, меди, цинка, кобальта. Активатором этих солей служила янтарная кислота. [7].

Применение иммуномодулирующих препаратов обосновано, в случаях не установления отклонений в иммунном статусе, поскольку в основе любого инфекционно-воспалительного или метаболического процесса лежат изменения в функциональном состоянии иммунной системы. Иммуномодуляторы могут применяться как при комплексной терапии одновременно с антибиотиками, противовирусными, противогрибковыми или противопаразитарными средствами, так и в виде монотерапии. Применение только одних иммуномодуляторов в терапии заболеваний различного генеза без этиотропных препаратов не может обеспечить ожидаемого эффекта, поскольку они только

дополняют принятую в каждом конкретном случае терапию. Своевременное и обоснованное применение иммуномодуляторов позволяет в большинстве случаев избежать развития серьезных осложнений при хронических, рецидивирующих инфекционно-воспалительных заболеваниях. Клинические наблюдения показывают, что комбинированное применение иммуномодуляторов в традиционной терапии заболеваний оказывается наиболее эффективным, чем использование препаратов по отдельности.

Преимущественно иммунокорректоры применяют в комплексной терапии заболеваний с клиническими признаками вторичной иммунологической недостаточности. Основным критерием для применения иммуномодуляторов различной природы является клиническая картина заболевания, проявляющаяся хроническим инфекционно-воспалительным процессом, которые трудно поддающимся адекватному традиционному лечению. При применении средств иммуномодулирующей терапии следует иметь в виду, что при восстановлении нарушенных функций иммунитета необходимо учитывать не только иммунофармакологическую характеристику препарата, но и особенности этиологии и патогенеза заболевания [2;8;9].

Список литературы

1. Бакшеев А.Ф. Иммунология свиньи / А.Ф. Бакшеев, Н.В. Ефанова, П.Н.Смирнов и др.- Новосибирск: 2003.- 143 с.
2. Земсков В.М. Современная концепция и общие закономерности иммуномодулирующей терапии / В.М.Земсков, А.М. Земсков // Успехи современной биологии. -2014. -Т. 134.- № 1.- С. 26- 34.
3. Карпуть И.М. Иммунология и иммунопатология болезней молодняка / И.М. Карпуть. - Минск: Ураджай, 1993. - 288 с.
4. Косорлукова З.Я. Изучение роли микроорганизмов в возникновении желудочно-кишечных болезней новорожденных телят /З.Я. Косорлукова, Е.П. Сисягина // Тр. ин-та (НРШИ НЗ РФ), Нижний Новгород, 2004.- С. 110-115.
5. Патент РФ № 2393848. Способ коррекции иммунобиохимического гомеостаза глубокосупоросных и подсосных свиноматок, поросят-сосунов /В.С.Попов [и др.] - опубл. 10.07.2010 г. - Бюл. № 19.- 9 с.
6. Подобед Л.И. Оптимизация кормления и содержания поросят раннего возраста: монография / Л.И. Подобед. - Киев, 2004. - 150 с.
7. Попов В.С. Научное и практическое обоснование средств и способов иммунометаболической коррекции у свиней [Текст]: автореф. дис...док. вет. наук / В.С.Попов. - Курск: КГСХА, 2015.- 42 с.
8. Фёдоров Ю.Н. Иммунодефициты у животных: характеристика, диагностика и коррекция // Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки России: Сб. материалов науч. сессии РАСХН/К 100-летию юбилею Всероссийского НРШ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко. Москва, 16-17 июня 1998 г. М., 1999.-Т.2.-С. 138-141.
9. Фёдоров Ю.Н. Стратегия и принципы иммунокоррекции и иммуномодулирующей терапии /Ю.Н. Фёдоров, В.И. Ключкина, М.Н. Романенко, О.А. Богомоллова, А.Н. Денисенко //Вестник Новгородского государственного университета.- 2015.- № 86- Ч.1 (84).- С. 85-87.
10. Хлопицкий В.П. Основные иммунодефициты свиней и средства борьбы с ними / А.П. Хлопицкий, А.Г. Хмылов // Свиноводство промышленное и племенное. - 2006. - № 5. - С. 37-39.
11. Хмылов А.Г. Коррекция иммунодефицитных состояний для профилактики массовых респираторных болезней свиней / А.Г. Хмылов // Ветеринария и кормление. - 2010. - № 2. - С. 34-35.
12. Шахов А.Г. Иммунобиологический статус свиноматок в зависимости от возраста и сроков супоросности /А.Г. Шахов, А.И. Ануфриев, Ю.Н. Масьянов, С.И. Першина // Вестник Россельхозакадемии. - 2003. -№ 2.- С. 69.

Схема применения препарата "Металлосукцинат" у свиней

свиноматки-супоросные			
70 сут.	80 сут.	100 сут	
V	V	V	
5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	
свиноматки-лактацирующие			
2-3 сут.	10-12 сут.	20-25 сут.	30-35сут.
V	V	V	V
5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл
поросята – сосуны			
2-3 сут.	10-12 сут.	20-25 сут.	30-35сут.
V	V	V	V
1,5мл	2,0 мл	2,0 мл	3,0 мл

УДК 591.113:595.384.16

Гемоциты речных раков как элементы иммунной защиты

Присный А.А. - кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник

Белгородский филиал ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко", e-mail: 308002, Российская Федерация, г. Белгород, ул. Курская, 4., Тел. 8(4722) 26-29-75, andreyprisky@gmail.com

Аннотация. Представители подтипа Crustacea являются важными объектами промысла, а также активно культивируются во многих странах мира. При этом некоторые ракообразные являются важной частью рациона некоторых промысловых видов рыб, а также могут играть немаловажную роль в биологической очистке вод, являясь биофильтраторами и детритофагами. В связи с большой значимостью данной таксономической группы, есть необходимость в разработке методов контроля физиологического состояния организма. В ходе исследования гемоцитов речных раков установлено, что наибольшими значениями показателей фагоцитарной активности обладают амебоциты *Astacus leptodactylus*. Различные внешние воздействия оказывают влияние на ракообразных на физиологическом уровне и обуславливают их жизнеспособность. Экологические факторы оказывают комплексное действие на живые организмы в самых разнообразных сочетаниях. Их интегральное влияние возможно оценить, как по реакции отдельных организмов, так и целых сообществ. Возможно использование показателей иммунитета ракообразных как критерия состояния их популяций в нормальных условиях и при техногенном воздействии. Одним из подходов к оценке состояния окружающей среды может быть оценка динамики клеточного состава гемолимфы ракообразных, интенсивности ответной реакции гемоцитов и на осмотическую нагрузку. Существенным показателем является доля фагоцитирующих гемоцитов, которые обеспечивают захват и ликвидацию чужеродных агентов, попадающих во внутреннюю среду организма. Через общее количество гемоцитов в единице объема гемолимфы и соотношение их основных типов представляется возможным дать характеристику состоянию популяции, ее устойчивости к факторам окружающей среды.

Ключевые слова: Гемоциты, подтип Crustacea, элементы иммунной защиты.

Hemocytes of crayfishes as an elements of the immune defense

Prisnyi A.A.

The representatives of subtype Crustacea are important target species, as well as actively cultivated in many countries around the world. However, some crayfish are an important part of the diet of some commercial fish species, and also can play an important role in the biological treatment of water. Due to the high significance of this taxonomic group, there is a need to develop the physiological state of the body control techniques. The study of hemocytes crayfishes found that the highest values of phagocytic activity indicators have amoebocytes of *Astacus leptodactylus*. The various external factors have an impact on crustaceans at the physiological level and determine their viability. The environmental factors have a complex effect on the living organisms in a variety of combinations. Their influence is possible to estimate the integral, both the response of individual organisms and whole communities. You can use immunity indices crustaceans their state test populations in normal conditions and at technogenic impact. One approach to the environmental assessment can be an assessment of the dynamics of cellular composition of the hemolymph of crustaceans, the response rate of hemocytes and osmotic load. An important indicator is the percentage of phagocytic hemocytes

that ensure capture and elimination of foreign agents entering into the internal environment of the body. A total number of hemocytes in the hemolymph unit volume and the ratio of their basic types it is possible to characterize the state of the population, its resistance to environmental factors.

Key words: Hemocytes, subtype Crustacea, elements of the immune defense.

Известно, что в кровеносной системе ракообразных циркулируют форменные элементы, участвующие в иммунных реакциях, коагуляции гемолимфы, синтезе дыхательных пигментов и фагоцитозе (Мартынова М.Г. с соавт., 2008; Cornick J.W., Stewart J.E., 1978; Gargioni R., Barracco M.A., 1998). В гемолимфе представителей ракообразных идентифицируют гемоциты одного типа - "амебоциты", имеющие несколько разновидностей: "гемкоагулирующие клетки", содержащие гемагглютинины; "амебоциты", которые способны к фагоцитозу; "амебоциты зернистого типа", которые участвуют в синтезе гемоцианина (Johansson M.W., S?derh?ll K., 1998; Martin G.G., Graves B.L., 1985). В настоящее время имеется ряд публикаций, связанных с изучением типов гемоцитов ракообразных, но пока нет единого мнения относительно типологии клеток содержащихся в гемолимфе ракообразных (Курносоева К.Д., 2014; Mix M.C., Sparks A.K., 1980).

Целью исследования является изучение структурных и функциональных особенностей гемоцитов речных раков при инкубации в условиях осмотической нагрузки.

В экспериментах исследовали гемоциты широкопалого (*Astacus astacus* Linnaeus, 1758) и узкопалого (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823) речных раков. Использовали гемолимфу 15 представителей каждого вида. Из системы циркуляции каждой особи отобрано и обработано не менее 100 клеток. Гемолимфу получали с использованием модифицированных стандартных методик, не подвергали центрифугированию, в образцы не добавляли антикоагулянты. Осмотическую стойкость, осморегуляторные реакции клеток и использование ими мембранного резерва изучали при помощи проб с гипотоническими и гипертоническими нагрузками. Теоретическая осмолярность растворов хлорида натрия, использовавшихся в эксперименте, составила 331,9 мосмоль/л для изотонического раствора хлорида натрия (0,97 % NaCl), 160,8 мосмоль/л для гипотонического раствора хлорида натрия (0,47 % NaCl) и 513,2 мосмоль/л для гипертонического раствора хлорида натрия (1,5 % NaCl).

Анализ клеточного состава гемолимфы речных раков позволил выявить 3 типа гемоцитов, имеющих различия по линейным размерам, количеству содержащихся гранул и интенсивности образования филоподий: амебоциты, гранулоциты и прогемоциты. Количество амебоцитов колеблется в пределах 11-23 % от общей численности гемоцитов. Гранулоциты являются лидирующим по численности типом клеток (46-80 %). Прогемоциты - относительно малочисленный тип клеток, их количество составляет 9 % от общей численности гемоцитов.

Гемоцитами, способными к реализации реакции фагоцитоза, являются амебоциты. Наибольшими значениями показателей фагоцитарной активности обладают амебоциты *A. leptodactylus*. Эти данные характеризуют представителей *A. leptodactylus* как более устойчивых к воздействию различных агентов экзогенного и эндогенного происхождения. Более активная клеточная иммунная защита может являться одним из факторов, приводящим к вытеснению при совместном обитании узкопалым раком широкопалого.

При инкубации в гипоосмотическом растворе амебоциты практически не меняют форму и линейные размеры, однако псевдоподии образуются в меньшем числе, и частично снижается двигательная активность клетки. При инкубации в гипертоническом растворе осаждаемые на субстрат амебоциты уменьшаются в размерах и передвигаются по стеклу, не расплываясь. Установлено, что линейные размеры амебоцитов *A. astacus* и *A. leptodactylus* в

условиях гиперосмотической нагрузки достоверно увеличиваются на 39 % и 75 % соответственно. В условиях гипоосмотической нагрузки амебоциты *A. leptodactylus* достоверно увеличивают показатели объема на 23%, 34%, 33% и 31% соответственно. В гипертонических условиях наблюдали тенденцию к уменьшению объема амебоцитов.

Мембранный резерв, определяемый степенью складчатости плазмалеммы, является одной из важнейших морфофункциональных особенностей клеток крови. Он используется фагоцитами при образовании псевдоподий при амебоидном движении и захвате инородных объектов в ходе защитных реакций. В поддержании функциональной активности форменных элементов крови большое значение имеет система саморегуляции объема клеток. Наибольшими значениями интенсивности использования мембранного резерва обладают амебоциты *A. astacus*. Несмотря на условия, характеризующиеся пониженным осмотическим давлением, клетки не полностью используют мембранный резерв, сохраняя способность образовывать псевдоподии. Отметим, что мембранный резерв необходим для образования фagosом, формирования псевдоподий при миграции.

В целом, гемолимфа ракообразных обладает большинством необходимых функций, несмотря на относительную простоту организации, и является индикатором физиологического состояния животного.

Список литературы

1. Курносоева К.Д. Морфофункциональная характеристика гемоцитов *Macrobrachium asperulum* // XIII Всероссийская молодежная научная конференция Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН. Сыктывкар, 2014. С. 73-76.
2. Мартынова М.Г., Быстрова О.М., Парфенов В.Н. Синтез нуклеиновых кислот и локализация предсердного натрийуретического пептида в гемоцитах речного рака // Цитология. 2008. Т. 50. № 3. С. 243-248.
3. Cornick J.W., Stewart J.E. Lobster (*Homarus americanus*) hemocytes: classification, differential counts and associated agglutinin activity // J. Invertebr. Pathol. 1978. V. 31. P. 194-203.
4. Gargioni R., Barracco M.A. Hemocytes of the palaemonide *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaecus paulensis* // J. Morphol. 1998. V. 236. P. 209-221.
5. Johansson M.W., Soderhall K. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells // Journal of Cell Biology. 1988. V. 106. P. 1795-1803.
6. Martin G.G., Graves B.L. Fine structure and classification of shrimp hemocytes // J. Morphol. 1985. V. 258. P. 239-248.
7. Mix M.C., Sparks A.K. Hemocyte classification and differential counts in the Dungeness crab, *Cancer magister* // J. Invertebr. Pathol. 1980. Vol. 35. P. 134-143.

УДК 638/612:615

Системный подход в изучении иммуномодулирующих свойств продуктов пчеловодства

Сайфутдинова З. Н., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,

Васильева А.Н., научный сотрудник

ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.П. Коваленко", г. Москва, zsaifutdin@yandex.ru

Предложен эколого-генетический подход к исследованию иммуномодулирующего действия продуктов пчеловодства медоносных пчел на основе общей теории систем Урманцева. Изучено действие продуктов пчеловодства (мед, пыльца, перга, маточное молочко, яд) на митотическую активность *in vitro*. Результаты исследований могут использоваться для построения моделей иммуномодулирующих и иных воздействий продуктов пчеловодства на биологические системы.

Ключевые слова: системный подход; иммуномодулирующее действие; мед; пыльца; перга; маточное молочко; яд.

System approach in the study of immunomodulating properties of beekeeping products

Sayfutdinova Z.N., Vasilyeva A.N.

The proposed ecological and genetic approach to the study of immunomodulatory effects of bee products honey bees on the basis of General systems theory Urmantsev. Studied the effect of bee products (honey, pollen, bee bread, Royal jelly, venom) on the mitotic activity *in vitro*. The research results can be used to build models and other immunomodulatory effects of bee products on biological systems.

Key words: a systematic approach; immunomodulatory effects; honey; pollen; beebread; Royal jelly; venom.

Известно, что биологически активные продукты пчеловодства (БАПП) вызывают иммуномодулирующие эффекты. Природные неспецифические иммунокорректоры делятся на экзогенные и эндогенные. Экзогенные неспецифические иммунокорректоры это препараты, содержащие

биологически активные вещества бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения. Пчелиная семья, являясь суперорганизмом, производит продукцию обладающую свойствами экзогенных и эндогенных иммунокорректоров. Такая двойственность и противоречивость действия БАПП обуславливает необходимость разработки теоретической модели с целью систематизации имеющейся информации в этой области знаний.

Одним из основных системообразующих факторов в экологии (и в первую очередь в ветеринарной экологии) служат пищевые цепи, в которых взаимодействующие организмы разных видов вступают в отношения "продуцент-потребитель" или "хозяин-паразит". Такие отношения позволяют конструировать модельные системы для эксперимента и решения практических задач в различных областях путем построения алгоритмов и системного анализа имеющейся информации. Предлагаемая нами модель воздеийствий БАПП построена на основе общей теории систем Урманцева (ОТСУ). Ниже приводим систему этих иммуномодулирующих действий БАПП с обозначениями в скобках по ОТСУ и с учетом отношений популяции медоносной пчелы с другими видами. С позиций "полезность" или "вредность" взаимоотношения организмов в биоценозах были классифицированы на взаимно-полезные (++, мутуализм), взаимно-нейтральные (00, нейтрализм), взаимно-вредные (--, конкуренция), и их комбинации: полезно-нейтральные (+0, амэнсализм, протокооперация привзаимодействии с продуцентами) вредно-нейтральные (-0, комменсализм и конкуренция за ресурсы при взаимодействии с консументами), полезно-вредные (+-, хищничество и паразитизм при взаимодействии с редуцентами) [6]. При таких взаимоотношениях с другими популяциями пчелиная семья производит следующие продукты пчеловодства:

1. Мед (++) при взаимно-полезных отношениях растениями в пчелиной семье из нектара производится мед;
2. Перга получается из цветочной пыльцы (+) - результат протокооперации с молочнокислыми бактериями. Прополис это также результат полезно-нейтральных взаимоотношений: амэнсализм при сборе эфирных масел, смол и др. с деревьев (=+);
3. Воск (==) пример нейтрального отношения между видами;
4. Маточное молочко и хитин образуются при вредно-нейтральных отношениях: комменсализм или конкуренция за ресурсы (=);

5. Яд (–) вырабатывается для реализации взаимно-вредных конкурентных отношений с другими видами;

6. Вещества, образуемые при полезно-вредных отношениях (+–), (хищничество, паразитизм, взаимодействие с редуцентами), например экстракты восковой моли (приносит вред пчелиной семье) обладают полезными свойствами.

Влияние меда на иммунную систему изучено не достаточно полно и может проявляться в различных диапазонах: от антигенного воздействия в различной степени до повышения резистентности к инфекционным возбудителям. Повышенная чувствительность к меду проявляется сравнительно редко и, по мнению Младенова [5] имеет наследственную предрасположенность. Однако, в отсутствии такой непереносимости мед может повысить показатели иммунологической реактивности (фагоцитарную активность, содержание гемоглобина, число тромбоцитов) и изменить в благоприятную сторону чувствительность к действию других аллергенов и антигенов.

Пчелиная обножка и перга иногда вызывает аллергические реакции при пероральном введении и, наоборот, вызывает восстановление реакций клеточного иммунитета, например, такое наблюдалось у спортсменов через восемь недель после начала приема [1]. БАВ выделенные из смеси меда и пчелиной обножки (1:10) тестировали в условиях *in vitro* на способность восстанавливать угнетенную функцию иммунокомпетентных клеток. эксперименты показали, что все исследованные препараты обладали способностью активизировать иммунокомпетентные клетки крови у иммунодефицитных животных. Наиболее активными были гидролизаты перги и пыльцы, которые максимально усиливали Т-системы лимфоцитов [4].

Прополис способен воздействовать на иммунологическую реактивность организма. С помощью различных методов *in vivo* и *in vitro* показано, что прополис даже в небольших дозах повышает естественную резистентность организма. Эти сдвиги происходят и в интактном организме и на фоне антигенного раздражителя. Наблюдается повышение гамма-глобулинов в сыворотке крови, усиление её комплементарной и антибактериальной активности, стимуляция фагоцитарной активности. В формировании этих сдвигов участвуют органы иммунной системы: лимфатические узлы и тимус. Увеличивается резистентность организмов при адьювантном действии прополиса, однако, это свойство проявляется только для некоторых антигенов; так например, неэффективными были совместные введения с возбудителями сибирской язвы, туберкулеза КРС, кишечной палочки [3]. Крайне негативным свойством является аллергизирующее действие прополиса. Отметим, что при лечении прополисом ран, ожогов в клинике хирургических болезней аллергические реакции на прополис возникают реже, чем при кожных болезнях.

Маточное молочко. Сведения о влиянии маточного

молочка на иммунные процессы носят противоречивый характер. С одной стороны авторы указывают на иммунодепрессивные свойства и связанные с этим действием терапевтические эффекты при заболевании аллергической (в том числе аутоиммунной) природы. С другой стороны есть указания на усиление фагоцитарной активности лейкоцитов [2].

Хитин впервые выделен из надкрылий насекомых в 1823 году и позднее был установлен состав, в который входят глюкозамин и уксусная кислота. В настоящее время хитин и его производное - хитозан широко применяются в медицине и ветеринарии благодаря высокой иммуностимулирующей и антикоагуляционной активности препаратов на их основе [7].

Яд обладает иммуномодулирующими свойствами. Особенностью иммунокорректирующей активности пчелиного яда является одновременное развитие и специфических и неспецифических защитных реакций. Этот двойственный механизм воздействия, вероятно, отражает закономерности эволюционного процесса становления химических взаимодействий насекомых (семейство пчелиных) и их конкурентов (и врагов) в экологических нишах, а именно млекопитающих [2].

В лаборатории клеточной биотехнологии ВИЭВ проводятся работы по действию БАПП на пролиферативную активность клеток в культуре. Смоделирована системная организация практической деятельности по изучению действия веществ, по которым реализуются эколого-генетические отношения медоносных пчел с другими видами [6].

Литература

1. Абрамов В.В., Булахова Е.К., Черкасова А.И., Куликова Н.В. Влияние натуральных продуктов пчеловодства на иммунореактивность спортсменов // Апитерпия и пчеловодство: Мат-лы научн. Конф. В г. Палонга. В. №, Вильнюс. 1993. С. 167-174.
2. Асафова Н.Н., Орлов Б.Н., Козин Р.Б., Физиологические активные продукты пчелиной семьи: Общебиологические и эколого-химические аспекты. Физиологическое обоснование практич. применения / Под ред. Б.Н. Орлова. - Нижний Новгород: Изд. Ю.А. Николаев, 2001. - 368с.
3. Кивалкина В.П. Экспериментальное изучение прополиса и его практическое значение // Биологически активные продукты пчел-ва и их использование: Межвуз. Сб. научных трудов. Горький, 1990. С. 38-50
4. Красочко П.А., Еремия Н.Г., Иммунологическая оценка цветочной пыльцы и перги // Продукты пчеловодства и апитерпия. Вильнюс: 1993. С. 59-63
5. Младенов С. Мед и медолечение. М.: Водолей, 1992. 176 с.
6. Сайфутдинова З.Н., Букурова Ю.А. Системный подход в изучении отношений медоносных пчел в биоценозе с. 343-349
7. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрыбина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. - М.: Наука, 2002. - 368с.

Подписной индекс журнала
«Ветеринария и кормление» в объединенном зеленом каталоге

«Пресса России» –

4 2 1 1 1

Подписка – обязательное условие для бесплатной публикации научных статей

УДК 619:579.862.1

Иммунологические и биотехнологические аспекты вакцинопрофилактики стрептококкоза крупного рогатого скота

Самуйленко А. Я., доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, директор ФГБНУ ВНИТИБП;

Школьников Е. Э., кандидат ветеринарных наук, ведущий отделом противобактериальных препаратов ФГБНУ ВНИТИБП;

Соколов Н. В., аспирант отдела бактериальных препаратов ФГБНУ ВНИТИБП;

Еремец В. И., доктор биологических наук, заместитель директора ФГБНУ ВНИТИБП по науке и качеству;

Раевский А. А., кандидат биологических наук, заместитель директора ФГБНУ ВНИТИБП по научно-технологическим вопросам;

Анисимова Л. В., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела бактериальных препаратов ФГБНУ ВНИТИБП;

Соловьев Л. Б., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела бактериальных препаратов ФГБНУ ВНИТИБП.

Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности; 141142, Московская область, Щёлковский р-н, пос. Биокомбината; Тел: +7 (496) 567-32-63.

Аннотация. Целью нашей работы была отработка технологических процессов изготовления вакцины против стрептококковых заболеваний крупного рогатого скота. Из известных библиографических источников выяснили, что основными возбудителями стрептококкоза КРС являются микроорганизмы серологических групп В, С и D, являющихся основными этиологическими факторами заболевания стрептококкозом взрослого крупного рогатого скота и телят.

Для решения поставленной задачи использовали такие штаммы стрептококков как *Streptococcusagalactiae* (серогруппа В), *Streptococcuszooepidemicus* (серогруппа С) и *Streptococcusfaecalis* (серогруппаD). Культивирование проводили в режиме управляемого периодического культивирования с помощью многофункциональных лабораторных комплексных приборов и устройств АНКУМ-2М, объемом 10 литров. Инактивацию полученной микробной взвеси проводили с помощью формальдегида.

Vaccination of cow diseases streptococcaetiology

Samujlenko A.Y., Shkolnikov E.E., Sokorev N.V., Eremets V. I., Raevsky A.A., Anisimova L.V., Solovlev L.B.

The aim of our investigations was to develop technological processes of manufacture of a vaccine against streptococcal cow diseases. From well-known bibliographic sources we found out that the main pathogens – microorganisms streptococcosis cow serogroups В, С, D, which are the main etiological factors of the disease streptococcosis adult cow and calves.

To solve this problem using streptococcal strains such as the *Streptococcusagalactiae* (serogroup В), *Streptococcuszooepidemicus* (serogroup С) and *Streptococcusfaecalis* (serogroup D). Cultivation was carried out in batch culture mode managed by a multi-functional complex laboratory instruments and devices АНКУМ-2М, volume 10 liters. The inactivation of bacterial suspension was obtained performed using formaldehyde.

Введение

Стрептококкоз крупного рогатого скота как в виде моноинфекции, так и смешанной повсеместно регистрируется в скотоводческих хозяйствах и наносит большой экономический ущерб. У коров стрептококкоз проявляется в виде

абортов, метритов и маститов. Телята болеют с первых дней рождения – это пупочный сепсис, поражение суставов, энтерит, пневмония. Летальность среди молодняка может достигать 70%. У переболевших животных значительно уменьшается молочная продуктивность, нарушается воспроизводительная функция коров, снижается в санитарном отношении качество продукции.

Значительные средства затрачиваются на лечение больных стрептококкозом животных, на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий. Однако, эпизоотическая ситуация трудно поддается контролю из-за множества видов и серогрупп возбудителя, широкого микробноспецифичности среди животных и человека, отсутствия достаточно эффективных средств специфической профилактики [1].

Результаты обследования некоторых неблагополучных по стрептококкозу хозяйств показали, что в возникновении заболевания существенное значение имеет действие различных предрасполагающих факторов: неполноценный рацион кормления, нарушение параметров микроклимата, отсутствие моциона, стрессы и др.

Исходя из существующей в России ситуации, можно утверждать, что в ближайшие годы проводить профилактику стрептококкоза путем создания оптимальных условий кормления и содержания животных в большинстве хозяйств не представляется возможным, поэтому основной упор надо делать на специфическую профилактику заболеваний [13].

Выпускаемая в настоящее время коммерческая вакцина против энтерококковой инфекции телят, ягнят и поросят обладает невысокой эффективностью. Это объясняется тем, что указанная вакцина, содержащая антиген только из стрептококков серогруппы D, не предохраняет от стрептококков серологических групп В и С, которые часто являются этиологическим фактором заболевания не только телят, но и коров [8, 15, 16].

Испытания опытных образцов моноштаммной вакцины из штамма *Str. zooepidemicus* показали, что эта вакцина в сравнении с коммерческой вакциной против энтерококковой инфекции телят, ягнят и поросят является более иммуногенной и формирует более напряженный иммунитет [5, 7, 14]. Однако способ получения такой вакцины является малопродуктивным. Культивирование стрептококков осуществляется в стеклянных баллонах без контроля основных технологических параметров, длительность культивирования составляет 18–24 часа, накопление стрептококков не превышает 2 млрд.м.к./см³.

Известно, что увеличение длительности культивирования приводит к потере протективных антигенов, к снижению жизнеспособности бактериальных клеток [17], а значит и к уменьшению их вирулентности, в конечном итоге к снижению их иммуногенности.

Таким образом, для приготовления вакцины против стрептококковых заболеваний крупного рогатого скота необходимо использовать полноценные в антигенном отношении культуры стрептококков серогрупп В, С и D.

Одним из наиболее значимых технологических этапов в производстве биологических препаратов, предназначенных для специфической профилактики инфекционных заболеваний бактериальной этиологии, является культивирование микроорганизмов. Именно на этой технологической стадии производства вакцин происходит синтез антигенов, от которых зависит эффективность иммунопрепаратов. В процессе выращивания бактерий необходимо одновременно с увеличением выхода биомассы добиваться того, чтобы возбудитель не изменял свои биологические свойства [4]. Для этого необходимо создавать оптимальные условия культивирования с учетом физиологического состояния микроорганизмов.

Технология изготовления бактериальных вакцин многоаспектная проблема, ключевым направлением которой является разработка управляемых процессов культивирования микроорганизмов [3, 9, 10, 11, 12].

Одним из недостатков при производстве вакцины про-

тив стрептококковых инфекций является разработанный еще в 60-е годы общепринятый процесс инактивации, при котором используют избыточное количество инактиванта, вводимого в бактериальные культуры, и неоправданно длительный срок инактивации. К тому же избыточное количество инактиванта (формалина) в вакцине отрицательно влияет на организм иммунизируемого животного [2, 6].

Цель исследований заключалась в следующем – изучить биотехнологические процессы производства и разработать технологию изготовления полиштамменной гидроокисьюалюминиевой формолвакцины против стрептококковых заболеваний крупного рогатого скота.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. используя данные литературных источников теоретически обосновать необходимость разработки новой полиштамменной инактивированной вакцины для профилактики стрептококковых заболеваний крупного рогатого скота;
2. провести подбор вакцинных штаммов стрептококков серологических групп В, С и D, являющихся основным этиологическим фактором заболевания стрептококкозом молодняка и взрослого поголовья КРС;
3. отработать технологию управляемого глубинного культивирования отобранных штаммов стрептококков в лабораторных условиях;
4. приготовить опытные серии полиштамменной ГОА-вакцины против стрептококковых заболеваний КРС;

Материалы и методы исследований

При изучении биотехнологических процессов и разработке технологии изготовления вакцины использовались производственные штаммы стрептококков – *Streptococcusagalactiae* (серогруппа В), *Streptococcus zooepidemicus* (серогруппа С) и *Streptococcus faecalis* (серогруппа D).

Выращивание стрептококков проводилось с использованием питательной среды, приготовленной по действующей инструкции на вакцину (Инструкция по изготовлению и контролю вакцины депонированной против стрептококкоза свиней (серогруппы С и R), 1988 г.) и оптимизированной ранее питательной среды на основе перевара Хоттингера.

Культивирование производственного штамма *Streptococcus zooepidemicus* (серогруппа С) проводили по ранее разработанному нами оптимальному режиму периодического управляемого выращивания.

Инактивацию стрептококков проводили по действующему и разработанному нами режиму с использованием формальдегида [3, 6]. Полноту инактивации определяли путем высевов на МПА и МПБ.

В качестве адьюванта использовали 3%-ный гель гидрата окиси алюминия.

В процессе работы культуры стрептококков исследовались по следующим показателям: морфология, культуральные свойства, жизнеспособность, оптическая плотность.

Для культивирования стрептококков использовали многофункциональный лабораторный комплекс приборов и устройств АНКУМ-2М емкостью 10 литров.

Биореактор оснащен перемешивающим устройством с магнитной муфтой и изменяемой скоростью перемешивания, барботером. В нем установлены датчики измерения температуры, pH, окислительно-восстановительного потенциала среды (Eh), датчик растворенного в культуральной жидкости кислорода (pO_2).

Таблица 1 - Значения параметров инактивации стрептококков

№ п/п	Технологические параметры инактивации	Значение параметров инактивации	
		Щадящий режим	Инструктивный режим
1	содержание фА, %	0,05	0,10 – 0,15
2	температура, °С	45	39 - 40
3	время, сут	3 - 4	7 - 12

Для пеногашения при интенсивном росте в ферментере стрептококков применяли пеногасительпропинол Б - 400.

Содержание pH в культуральной жидкости определяли потенциометрически, уровень растворенного кислорода pO_2 -датчиками, изготовленными в СКБ БП (г. Пушино), eH - потенциометрически с использованием электродов с ионной проводимостью типа ЭО - 01.

Оптическую плотность культуры стрептококков измеряли на фотоколориметре КФК - 2 и блоке оптической плотности аппарата АНКУМ - 2М.

Результаты исследований

При разработке управляемого процесса культивирования стрептококков предварительно были исследованы процессы культивирования этих штаммов в соответствии с действующей инструкцией (Инструкция по изготовлению и контролю вакцины депонированной против стрептококкоза свиней (серогруппы С и R, 1988 г.).

При анализе изменений основных параметров культивирования (pH, pO_2 и eH) в процессе выращивания стрептококков по инструктивному режиму было установлено, что примерно через 3 ч культивирования исчерпывается один из элементов питания (глюкоза), в этот момент наблюдается падение pO_2 , прекращение снижения pH - явные признаки лимитирования.

Данное предположение подтверждается изменением оптической плотности культур при выращивании стрептококков в инструктивном режиме – примерно через 3 ч наблюдается прекращение логарифмического роста и переход процесса в стадию замедления.

Это позволяет предположить, что для интенсификации процесса выращивания стрептококков в питательной среде на основе бульона Хоттингера необходима дробная подача лимитирующего их рост компонента (глюкозы) питательной среды, а также регулирование pH и pO_2 .

По результатам анализа существующего процесса выращивания стрептококков нами разработан режим управляемого культивирования.

Питательную среду в ферментере засевают культурой стрептококков и выращивали в течение 6–8 ч при температуре 37°C. После засева ферментера окислительно-восстановительный потенциал культуральной жидкости снижался до (-150) – (-200) мВ, после чего до окончания процесса культивирования поддерживали pO_2 на уровне 15–25% от насыщения кислородом воздуха. pH культуральной жидкости регулировали на уровне 6,8–7,2, а дробную подачу глюкозы осуществляли дозами до концентрации 0,05–0,2% при лимитировании роста стрептококков глюкозой, характеризующемся резким повышением pO_2 при неизменных расходе воздуха и оборотах мешалки и прекращением снижения pH культуральной жидкости.

Культура в процессе всего культивирования сохраняла свои культуральные свойства и была типичной по морфологии – кокки в виде цепочек.

Процесс периодического управляемого культивирования стрептококков характеризуется следующими показателями: длительность фазы приспособления – 2,3–2,6 ч; продолжительность логарифмической фазы роста – 3,3–4,2 ч; максимальная удельная скорость роста – 0,44–1,54 1/час; максимальное накопление составило 3,1 млрд/см³. Культура в процессе всего культивирования сохраняла свои культуральные свойства и была типичной по морфологии – кокки в виде цепочек.

Как показали результаты исследований, управляемый режим культивирования по сравнению с существующим процессом позволил увеличить накопление стрептококков в 2,5 раза.

При этом увеличена удельная скорость роста. Однако несколько увеличилась продолжительность фазы приспособления.

С целью уменьшения этого показателя засев питательной среды производили инокулятом, взятым с логарифмической стадии роста. При этом показатели роста стрепто-

кокков при управляемом режиме культивирования составили: длительность фазы приспособления – 0,25–0,65 ч; продолжительность логарифмической фазы роста – 1,85–3,15 ч; максимальная скорость роста – 0,64–1,5 1/ч; максимальное накопление – 6,3 млрд/см³.

Следовательно, засев питательной среды культурой стрептококков, взятой с логарифмической фазы роста, в сочетании с управляемым процессом культивирования позволил в 2,5–5 раз уменьшить длительность фазы приспособления и увеличить в 3–4 раза накопление стрептококков. При этом сохранялись все типичные биологические свойства стрептококков.

Одним из путей повышения иммуногенности инактивированных вакцин может служить разработка щадящих режимов инактивации микроорганизмов.

Щадящие режимы инактивации, включающие совместное действие сублетальных концентраций формальдегида и нефизиологических температур (выше 37°C), позволяют понизить количество вводимого в бактериальную суспензию формальдегида, добиться полной и необратимой инактивации бактерий и существенно сократить время инактивации.

Сравнительные данные исследований инструктивного и щадящего режимов инактивации стрептококков представлены в таблице 1.

После установления путем высевов на питательные среды (МПА, МПБ) стерильности в биореактор добавляют стерильный 3%-ный гель алюминия гидрата окиси по ГОСТ 18287-81 в количестве 15% к общему объему культуры и перемешивают.

Сорбцию ведут при 18–20°C в течение 3–5 суток до полного просветления надосадочной жидкости. После отстаивания баккультуру концентрируют путем декантации 1/4–1/5 объема надосадочной жидкости. Адсорбированную культуру подщелачивают 10%-ным раствором NaOH, до pH 7,2–7,6. Адсорбированную смесь культур фасовали в стерильные флаконы по 100 см³.

На основании проведенных исследований по оптимизации технологических процессов изготовлена опытная серия полиштамтной гидроокисьалюминиевой формолвакцины против стрептококковых инфекций крупного рогатого скота.

В результате проведенных испытаний установлено – формолвакцина полиштамтная гидроокисьалюминиевая против стрептококковых инфекций крупного рогатого скота является безвредной и иммуногенной и может быть рекомендована к испытанию в практике ветеринарной медицины для профилактики инфекций стрептококковой этиологии крупного рогатого скота.

Заключение

1. Проведены исследования по оптимизации технологических процессов изготовления вакцины против стрептококковых инфекций крупного рогатого скота.

2. В результате проведенных исследований по разработке технологических процессов изготовления формолвакцины полиштамтной гидроокисьалюминиевой против стрептококковых инфекций крупного рогатого приготовлена опытная серия данной вакцины, которая прошла с положительными результатами производственные испытания.

Литература

1. Belimenko V.V. Prospects for the use of Geographic Information Systems for risk-based monitoring of natural focal diseases of animals and humans // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. -2016. -Vol. 56. -No. 8. -pp. 22-25.

2. Burlakov S.V. Tasks of veterinary service to ensure the

biological safety of poultry products in the Russian federation: analysis and assessment of risks. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Т. 59. № 11. С. 181-185.

3. Бушуева Н.Б. Инактивация микроорганизмов при производстве бактериальных вакцин // Аграрная наука. - 1998. - № 1. - С. 20-21.

4. Бушуева Н.Б., Раевский А.А., Анисимова Л.В., Коротеева Л.В. Разработка технологии культивирования и инактивации бактерий при изготовлении ассоциированной вакцины против стрептококкоза, гемофилиза и пастереллезавиной (Полипневмовак): тез. докл. Всерос. научн.-практ. конф. "Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов". - Щелково, 2000. - С. 139-140.

5. Верховский О.А. Использование моноклональных антител для оценки антигенных свойств иммуноглобулинов животных // Сельскохозяйственная биология. 1995. - № 4. - с. 94-100.

6. Ездакова И.Ю. Методические принципы оценки поствакцинального иммунного ответа // Российская сельскохозяйственная наука. 2013. № 1. С. 49-51.

7. Еремина М.А. Динамика иммунологических показателей коров в разные месяцы стельности // Зоотехния. 2013. 10. С. 25-26.

8. Попова Е.В. Мониторинг состояния иммунитета у быков-производителей молочных и мясных пород // Российская сельскохозяйственная наука, 2016. - № 1. - С. 42-44.

9. Раевский А.А., Анисимова Л.В., Коротеева Л.А., Бушуева Н.Б. Разработка управляемого процесса культивирования стрептококков: мат. Межд. научн.-практ. конф. "Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов". - Щелково, 2003. - С. 68-72.

10. Раевский А.А., Анисимова Л.В., Соловьев Л.Б., Бушуева Н.Б., Коротеева Л.А., Хабаров А.К. Разработка и испытание инактивированной гидроокисьалюминиевой вакцины против инфекционных пневмоний бактериальной этиологии: сб. докл. Межд. конф. мол. уч. "Научные основы технологии производства ветеринарных биопрепаратов". - Щелково, 2002. - С. 117-120.

11. Раевский А.А., Анисимова Л.В., Ярцев М.Я., Коротеева Л.В., Бушуева Н.Б. Усовершенствование технологии культивирования и инактивации бактерий при изготовлении ассоциированной вакцины против сальмонеллеза, пастереллеза и энтерококковой инфекции поросят: тез. докл. Всерос. научн.-практ. конф. "Науч. основы технологии промышленного производства вет. биол. препаратов". - Щелково, 1998. - С. 31-33.

12. Раевский А.А., Самуйленко А.Я., Анисимова Л.В., Бушуева Н.Б., Коротеева Л.А., Шишов В.П. Разработка новых технологий изготовления противобактериальных препаратов: сем.-презент. инновац. научн.-техн. проектов "Биотехнология - 2000". - Пушкино, 2000. - С. 28-29.

13. Татаренко Я.С. Определение оптимального средства для оздоровления поголовья перепелов при ассоциированной протейной и стрептококковой инфекции // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2017. № 2. С. 38-42.

14. Федорова Е.В. Диагностические критерии оценки состояния иммунной системы быков-производителей // Ветеринария и кормление. -2014. -№ 2. -С. 10-12

15. Хисматуллина Н.А. Опыт использования ГИС-технологий при оценке рисков в эпизоотологическом исследовании // В сборнике трудов V Международного ветеринарного конгресса, Москва, 22-24 апреля 2015 г. -С. 250-252.

16. Ярцев М.Я. Состояние и перспективы производства бактериальных вакцин на основе современных технологий: тез. докл. V Всерос. конф. "Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов". - Щелково, 1996. - С. 93-94.

УДК 619:616.9.68.41.53

Циркуляция вируса ящура серотипа А на территории Ближнего Востока

¹Самуйленко А.Я., доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, директор ФГБНУ ВНИТИБП;

²Мельник Н.В., доктор ветеринарных наук ФКП "Щелковский биокомбинат";

²Ельников В.В., кандидат ветеринарных наук ФКП "Щелковский биокомбинат";

²Литенкова И.Ю., кандидат ветеринарных наук, ФКП "Щелковский биокомбинат";

²Крюкова Е.Н., кандидат биологических наук, ФКП "Щелковский биокомбинат";

²Федорова Н.В., соискатель ФКП "Щелковский биокомбинат";

²Левина А.В., соискатель ФКП "Щелковский биокомбинат";

Боровой В.А., кандидат ветеринарных наук;

¹Гринь С.А., член корреспондент РАН, заместитель директора ФГБНУ "ВНИТИБП".

¹Мельник Р.Н., кандидат биологических наук ФГБНУ "ВНИТИБП".

Синковец С.М.,

Киш Л.К., кандидат ветеринарных наук ФГБНУ "ВГНКИ".

Барсуков Ю.И.,

¹Андроник А.Н., помощник директора ФГБНУ "ВНИТИБП".

¹ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности". 141142, Московская область, Щелковский район, п. Биокомбината; тел. +7 (496) 56-7-32-63.

²ФКП "Щелковский биокомбинат", 141142, Московская область, Щелковский район, п.Биокомбината.

Резюме. Приведены официальные данные об эпизоотической ситуации по ящуру типа А на территории Саудовской Аравии, Ирана, Армении и Турции в период с 2005–2016 г. Установлено, что большинство вспышек болезни в данных странах были вызваны вирусом ящура типа А, принадлежащим к новым генетическим линиям: А/Иран-05 и G-VII топотипа Азия, антигенно отличающихся от производственных штаммов вируса ящура, используемых в странах для профилактической вакцинации против ящура. Из-за существующей опасности распространения новых генетических линий в страны Центральной Азии и Закавказья необходимо проведение исследований по отбору и подготовке новых актуальных в эпизоотическом отношении производственных штаммов вируса ящура типа А для их включения в состав противоящурных вакцин.

Ключевые слова: ящур, крупный рогатый скот, Ближний Восток, вирус ящура, вакцина, вакцинный штамм, антигенное родство, серотип А, плюральность.

The circulation of FMD virus serotype A in the Middle East

Summary. The official data on the epizootic situation for foot-and-mouth disease (FMD) type A in Saudi Arabia, Iran, Armenia and Turkey are presented for the period 2005-2016. It was found that the most of outbreaks of FMD in these countries were caused by FMD virus type A, belonging to new genetic lines A/Iran-05 and G-VII topotype Asia and using in countries for FMD vaccination. The new lines were distinguished antigenically by the vaccine strains used in the country during certain time intervals. Due to the existing risk of the spread of new genetic lines in Central Asia and Transcaucasia it is necessary to do research to the selection and preparation of new vaccine strains of FMD virus type A to include in composition of FMD vaccine.

Key words: foot-and-mouth disease, cattle, Middle East, foot-and-mouth disease virus, vaccine, vaccine strain, antigenic relationship, serotype A, plurality.

Ящур – остро протекающее, высоко контагиозное, трансмиссивное заболевание с везикулярным синдромом, поражающее домашних и диких парнокопытных и мозолоногих животных. Это заболевание поражает животных всех возрастных групп.

По классификации МЭБ среди 15 особо опасных инфекционных болезней ящур занимает первое место и имеет неофициальное название "Болезнь, опустошающая экономику". В связи с чем его вспышки подлежат срочной нотификации национальными и международными компетентными органами. Экономический ущерб от заболевания складывается из прямых потерь, связанных с уменьшением продуктивности животных, вынужденным убоем заболевших и контактных особей и косвенных – посредством введения карантинных мероприятий, ограничения торговли с областями и странами, где ящур не регистрируется [7].

Текущие меры по борьбе с болезнью в странах, свободных от ящура, обусловлены в основном международными правилами торговли и включают вакцинацию, контроль передвижения и убой зараженных и восприимчивых животных [3, 18, 20, 21, 22]. В эндемичных странах, где ограничения на передвижение и убой не всегда осуществимы, вакцинация часто играет центральную роль в борьбе с этой инфекцией.

Ящур признан эндемичным заболеванием крупного и мелкого рогатого скота в странах Ближнего Востока, где скотоводство является ключевой отраслью экономики. На территориях, простирающихся от Южной Азии до средиземноморского бассейна, имеются обширные скотоводческие и кочевые поголовья скота, подверженные риску инфекционных заболеваний в связи с высокой плотностью животных на единицу площади. Способность популяций вируса ящура к быстрой адаптивной эволюции в ходе персистенции в организме хозяев, особенно мигрирующих диких и домашних животных, когда имеет место тесный контакт особей разных видов и возрастов, ещё больше усиливает плюральность возбудителя и приводит к возникновению новых штаммов [19]. Этому же способствуют и животные-вирусоносители, для которых характерны стёртые формы ящура, появляющиеся на фоне вакцинации сельскохозяйственного поголовья или среди переболевших мигрирующих диких животных [17]. Именно социальные и экологические предпосылки, имеющие место за последние несколько лет, привели к тому, что плюральность вируса ящура как биологического агента, сильно возросла. Появились новые, резко отличающиеся по серологическим и антигенным свойствам эпизоотические изоляты, по отношению к которым выпускаемые вакцины с устоявшимися производственными штаммами оказались бессильны. Таким образом, антигенная изменчивость полевых изолятов вируса при эпизоотическом течении заболевания представляет реальную угрозу, так как является следствием его высокой естественной изменчивости, которая наиболее выражена у вирусов ящура типа А [16].

Следует отметить, что серотип А вируса ящура в настоящее время присутствует на всех континентах, где регистрируется это заболевание. История возникновения вируса ящура типа А начинается с 1922 г., когда он был открыт и впервые описан учеными Валле и Карре, которые доказали существование двух разных иммунологических типов инфекционного начала, вызывающих заболевание с везикулярным синдромом у скота, путем испытаний по перекрестному заражению переболевших животных. Они объяснили причину повторного заболевания животных существованием двух разных возбудителей. Эти два возбудителя, в последствии определенные как типы вируса ящура были названы по месту их происхождения: О для округа Oise, Франция, и А для Allemagne (французское название Германии) [5].

В период с начала 1970 по 2000 гг. при анализе эпизоотических изолятов серотипа А были определены 32 различных подтипа. Несмотря на то, что они генетически отличались друг от друга, эпизоотическая ситуация в мире по этому серотипу поддерживалась использованием вакцин с производственными штаммами: А22/Ирак, А24/Крузейро, А22№550, А/SAU/95 [14]. Данные производственные штаммы обладали достаточно широким спектром перекрытия эпизоотических изолятов в связи с незначительными генетическими отличиями области VP1 производственных штаммов и эпизоотических изолятов в антигенном отношении.

На сегодняшний день зарегистрировано присутствие в мире 26 подтипов вируса ящура типа А. Они образуют три географически различные генотипа (топотипа): Азия (Asia), Европа-Южная Америка (Euro-SA) и Африка (Africa). Уровень нуклеотидных различий в пределах кодирующей области гена VP1 между вирусами серотипа А, принадлежащих к различным континентальным топотипам достигает до 24% [9].

Топотип Азия типа А, распространенный на Ближнем Востоке и в регионах Южной Азии, долгое время поддерживался генетическими линиями А15, А22, А/IRN-87, А/IRN-96, А/IRN-99, А/SAU/95.

Однако, в Иране, Турции, Саудовской Аравии и Пакистане с 2005 года были зарегистрированы вспышки ящура, вызванные вирусом типа А, который генетически и антигенно резко отличался от всех ранее известных изолятов и производственных штаммов. Анализируя ситуацию по выявлению новой линии типа А, было установлено, что этот штамм впервые был выделен в 2003 г. в Иране, затем распространился на соседние страны и проник в Северную Африку. Новый генотип А вытеснил генотипы А/Иран-96 и А/Иран-99, которые ранее циркулировали в этих регионах, перекрестно не реагировал с поствакцинальной сывороткой А/Иран-96 и был ближе по антигенному родству с более старым вакцинным штаммом А22/Ирак. Вакцина, содержащая антиген вируса А22№550, слабо защищала иммунизированных ею животных от эпизоотического вируса А/Иран-05. Таким образом, выделенные возбудители сформировали отдельную генетическую линию А/Иран-05. В годовом отчете за 2009 год Всемирной справочной лаборатории ФАО по ящуру (WRLFMD) новый штамм А/Иран-05, как приоритетный, был рекомендован для банков вакцин на территории Евразии [4]. Стоит отметить, что наряду с А/Иран-05 был рекомендован вакцинный штамм А/TUR/2006 как его аналог [12]. В настоящее время линия А/Иран-05 является доминирующей в регионах Турции, Ирана, Пакистана и Афганистана.

Было установлено, что генотип А/Иран-05 обладает широкой антигенной изменчивостью, вследствие чего генотип был разделен на различные сублинии [6].

За последние годы на Ближнем Востоке регулярно обнаруживаются сублинии AFG-07, BAR-08, FAR-09, SIS-10, HER-10, FAR-11 и SIS-12. Хотя вакцинный штамм А/TUR/2006 и используется в превентивных мерах по борьбе с ящуром, вирусы ящура генотипа А/Иран-05 сублиний SIS-10 и SIS-12, выделенные в 2012 и 2013 годах в Иране и Турции показали антигенный дрейф и недостаточную перекрестную защиту в серологических тестах соответствия полевых и вакцинных штаммов А22/IRQ и А/TUR/2006 [8]. В этот же период были отмечены вспышки вируса ящура в Российской Федерации в регионах Краснодарского края, Карачаево-Черкесии и Кабардино-Балкарии, которые на основании лабораторных исследований ФГБУ "ВНИИЗЖ" (данные отчета от 19.08.2013 г. для Департамента ветеринарии МСХ РФ) были отнесены к вирусу ящура типа А сублинии А/Иран-05 SIS-10 и имели существенное антигенное отличие от вакцинных штаммов типа А: А22 №550; А22/Ирак/64; А Иран/97; А/Турция/2006 (А/Иран-05); А/Киргизия/07/(А/Иран-05) (таблица 1), что указывает на низкую ожидаемую защиту и, следовательно, необходимость получения нового вакцинного штамма для сублинии SIS-10 генотипа А/Иран-05. Новый вакцинный штамм может быть рекомендован как превентивный для регионов со вспышками вируса ящура этой сублинии.

В 2015–2016 гг. появились отчеты по мониторингу новых вспышек вируса ящура по иммунизированному поголовью в странах Ближнего Востока вакцинами с валентностями: О/ПанАзия-2, А/Иран-05, А/SAU/95, SAT-2

В Саудовской Аравии в 2015–2016 гг. были зафиксированы вспышки ящура типа А. По результатам лабораторных исследований образцов сыворотки крови, полученных от крупного рогатого скота с клиническими признаками ящура, все изоляты вируса ящура типа А были отнесены Всемирной справочной лабораторией ФАО по ящуру (WRLFMD) к новой генетической линии G-VII топотипа Азия. Филогенетический анализ кодирующей последовательности гена VP1 изолятов вируса из трех ферм выявили тесную связь с вирусами ящура типа А из Индийского полуострова. Данные результаты стали неожиданными, так как вспышки ящура, связанные с серотипом А, не отмечались в Саудовской Аравии с 2005 года, когда был обнаружен вирус, принадлежащий к генотипу А/Иран-05 [2].

В 4 квартале 2015 г. в Турции был выделен вирус ящура типа А, который по результатам филогенетического анализа так же был отнесен к генотипу G-VII топотипа Азия и оказался близкородственным (98%) к выделенному в Саудовской Аравии эпизоотическому изоляту А/SAU/1/2015[1].

Эпизоотическая ситуация по ящуру в Иране остается самой напряженной на Ближнем Востоке по отношению к вирусу ящура типа А. Следует отметить, что вирус ящура серотипа А генотипа А/Иран-05 ежегодно регистрируют в Иране с 2005 г., а с 2015 г. в стране начали регистрировать новый генотип вируса ящура типа А, классифицированного уже как G-VII. Все изоляты этого генотипа филогенетически родственны изоляту А/SAU/1/2015. Также, как и в Саудовской Аравии, была выявлена тесная связь вновь выявленной линии с вирусами ящура типа А Индийского полуострова и изолятами вируса в Турции и Армении.

В январе 2015 г. в Армении на

Таблица 1. Результаты определения антигенного соответствия (r1) изолятов эпизоотического вируса ящура типа А производственным штаммам

Изоляты вируса ящура	Производственные штаммы вируса ящура типа А				
	А22 № 550	А22Ирак/64	А/Иран/97	А/Турция/06 (А/Иран/05)	А/Киргизия/07 (А/Иран/05)
А № 2166 /Краснодарский/13	0.01	0.02	0.15	0.02	0.01
А № 2167 / КЧР/13	0.0	0.0	0.02	0.12	0.009

Примечание: $r1 \geq 0.3$ – полевой изолят антигенно родственен производственному штамму, вакцина из производственного штамма может быть использована, если не будет найдено более родственного штамма и при условии, что животные будут иммунизированы более 1 раза. $r1 \leq 0.3$ – полевой изолят отличается от производственного штамма, вакцина из которого не приемлема для защиты от заражения полевыми изолятами.

Таблица 2. Результаты определения антигенного соответствия изолятов эпизоотического вируса ящура типа А вакцинным штаммам

Полевой изолят	Топотип	Вакцинный штамм вируса ящура типа А						
		А Иран 2005	А ИРН 87	А ИРН 96	А МАУ 97	А SAU 95	А TUR 2006	А22 IRQ
А/SAU/1/2015	А/ASIA	N	N	N	N	N	N	N
А/SAU/2/2015	А/ASIA	N	N	N	N	N	N	N
А/SAU/12/2015	А/ASIA	N	NT	NT	NT	N	N	N
А/SAU/8/2015	А/ASIA	N	NT	NT	NT	N	N	N

Примечание: N – изолят отличается от вакцинного штамма, вакцина из которого не приемлема для защиты от заражения полевыми изолятами. NT – не тестировалась.

вакцинированном противоящурной вакциной поголовье КРС были зарегистрированы вспышки заболевания с везикулярным синдромом. Пробы патологического материала от пораженных животных были переданы для идентификации возбудителя в референтную лабораторию по ящуру для стран Центральной Азии и Западной Евразии ФГБУ "ВНИИ-ИЗЖ". Предварительный диагноз "ящур" был подтвержден серологическими реакциями, ПЦР, секвенированием, и вирус ящура был классифицирован как серотип А генетической линии G-VII [10].

Результаты исследований ФГБУ "ВНИИИЗЖ" показали, что используемые противоящурные вакцины, имеющие в своем составе антигены A/Iran-05, A/TUR/2006, A22/IRQ-64, A/SEA-97, не обеспечивают защиту животных против изолятов линии G-VII, полученных из Армении (www.arriah.ru). Эти результаты подтверждаются данными Всемирной справочной лаборатории по ящуру (Пирбрайт, Великобритания) при изучении возможности перекрытия одного штамма другим в составе вакцины. В таблице 2 представлена информация об антигенном соответствии изолятов эпизоотического вируса ящура типа А вакцинным штаммам согласно данным Всемирной справочной лаборатории по ящуру [13].

Вакцины, изготовленные из производственных штаммов A/Iran-05; A/IRN 87; A/IRN 96; A/IRN 99; AMAY97; A/SAU/95; A/TUR/2006; A22/IRQ, не защищали от эпизоотических изолятов вируса ящура сублинии G-VII (G18): A/SAU/1/2015; A/SAU/2/2015; A/IRN/12/2015; A/IRN/8/2015.

Важно отметить, что широко применяемый в составе противоящурных вакцин в странах Ближнего востока рекомендованный МЭБ для использования в составе вакцин в этих регионах для профилактической вакцинации против ящура производственный штамм A/SAU/95, также относящийся к сублинии G-VII (G18) не смог обеспечить защиту вакцинированных животных от эпизоотических изолятов этой сублинии, появившихся в 2015–2016 гг.

Вирусы, принадлежащие к генетической линии A/ASIA/G-VII, были первоначально определены в индийском штате Ассам в ноябре 2002 года, откуда в феврале 2003 года они быстро распространились на пять других индийских штата, включая Гуджарат и Карнатака. В 2015 г. из-за неконтролируемых связей по транспортировке животных и миграции диких парнокопытных вирусы были занесены в Саудовскую Аравию, Иран, Турцию, Армению [15].

Огромную роль в распространении этой генетической популяции вируса ящура сыграло отсутствие антигенного родства между широко используемыми вакцинными штаммами (A/IND/40/2000; A/ASIA/Iran-05; A22/IRQ; A/SAU-95; A/TUR/2006) и генотипа G-VII. В результате чего вакцины не смогли профилировать занос нового штамма на территории сопредельных стран. Вспышки, вызванные вирусом типа А генетической линии G-VII генетически и антигенно резко отличается от всех ранее известных производственных штаммов. Таким образом, согласно рекомендациям Всемирной референтной лаборатории МЭБ по ящуру (WRLFMD, Пирбрайт, Великобритания) в 2016 г. штамм A/ASIA/G-VII вируса ящура имеет статус высшего приоритета по включению в вакцинный антигенный банк [11].

Заключение

Появление и стремительное распространение по странам Ближнего Востока и граничащим с ними странам новых генетических линий вируса ящура A/Iran-05 и A/ASIA/G-VII, так же как и появление новых в антигенном отношении вариантов вируса в пределах одной сублинии SIS-10 генотипа A/Iran-05 наглядно демонстрирует необходимость в постоянном изучении вирусных изолятов, выделении из их числа изолятов с высоким спектром перекрытия антигенных свойств и с новыми антигенными свойствами и понимании глобальной эпизоотологии ящура с целью разработки стратегии вакцинопрофилактики против этой инфекции. Таким образом, для защиты животных против вируса ящура серотипа А новых генотипов требуется разработка новых референтных и производственных вакцинных штаммов.

Список литературы

1. Annual Report 2015
2. Bachanek-Bankowska K, Wadsworth J., Thapa B., King D. P., Knowles N. J. Complete Genome Sequence of a Serotype A Foot-and-Mouth Disease Virus from an Outbreak in Saudi Arabia during 2015. *Genome Announc.* 2016 Jan-Feb; 4(1).
3. Belimenko V.V. Prospects for the use of Geographic Information Systems for risk-based monitoring of natural focal diseases of animals and humans//*Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences.* -2016. -Vol. 56. -No. 8. -pp. 22-25.
4. FAO World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease (WRLFMD). Joint Genotyping Report with the Sap Institute, Ankara, Turkey Report Date for this Batch: 10 November 2015
5. Jamal SM, Belsham GJ (2013) Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet Res* 44: 116. doi: 10.1186/1297-9716-44-116 PMID: 24308718
6. Jamal SM, Ferrari G, Ahmed S, Normann P, Curry S, Belsham GJ. Evolutionary analysis of serotype A foot-and-mouth disease viruses circulating in Pakistan and Afghanistan during 2002-2009. *J Gen Virol.* 2011;44:2849-2864. doi: 10.1099/vir.0.035626-0.
7. Knowles NJ, Nazem Shirazi MH, Wadsworth J, Swabey KG, Stirling JM, Statham RJ, Li Y, Hutchings GH, Ferris NP, Parlak U, Ozyoruk F, Sumption KJ, King DP. Recent spread of a new strain (A-Iran-05) of foot-and-mouth disease virus type A in the Middle East. *Transbound Emerg Dis.* 2009; 44:157-169. doi: 10.1111/j.1865-1682.2009.01074.x
8. Mahapatra M, Statham B, Li Y., Hammond J, Paton D. and Parida S. Emergence of antigenic variants within serotype A FMDV in the Middle East with antigenically critical amino acid substitutions. *Vaccine.* 2016 Jun 8; 34 (27).
9. Mohapatra JK, Subramaniam S, Pandey LK, Pawar SS, De A, Das B, Sanyal A, Pattnaik B. Phylogenetic structure of serotype A foot-and-mouth disease virus: Global diversity and the Indian perspective. *J Gen Virol.* 2011;44:873-879. doi: 10.1099/vir.0.028555-0
10. OIE. Disease Information. 2016. Vol. 29. № 1. -С. 20.
11. OIE/FAO Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory Network
12. OIE/FAO Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory Network Annual Report 2009
13. OIE/FAO Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory Network Annual Report 2013
14. Parida S. Vaccination against foot-and-mouth disease virus: strategies and effectiveness. *Expert Rev Vaccine.* 2009;8(3):347-365.
15. Tosh, C., Sanyal, A., Hemadri, D., and Venkataraman, R. (2002). Phylogenetic analysis of serotype A foot-and-mouth disease virus isolated in India between 1977 and 2000. *Archives of Virology* 147.P. 493-513.
16. Бурдов А.Н. и др. Ящур. - М.: Агропромиздат, 1990. 320 с.
17. Верховский О.А. Использование моноклональных антител для оценки антигенных свойств иммуноглобулинов животных//*Сельскохозяйственная биология.* 1995. -№ 4. -С. 94-100.
18. Гулюкин, А.М. Эпизоотологические геоинформационные системы. Возможности и перспективы//*Ветеринария.* - 2016. -№7. -С. 21-24.
19. Забережный А.Д. Современные способы модификации вакцинных вирусных штаммов. Сборник материалов X Международной научно-практической конференции "Научные перспективы XXI века. Достижения и перспективы нового столетия". 2015. С 155-158.
20. Сабирова В.В. Контроль эффективности вакцинопрофилактики бешенства с помощью блок-иммуоферментной тест-системы//В сборнике: Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. - 2012. -С. 181-187.
21. Шабейкин, А.А. Использование ГИС-технологий при оценке рисков в эпизоотологическом исследовании//*"Научные перспективы XXI века. Достижения и перспективы нового столетия"*, Сборник трудов X международной практической конференции, Новосибирск, 17-18 апреля 2015 г. -С. 50-54.
22. Шабейкин, А.А. Опыт использования ГИС-технологий при оценке рисков в эпизоотологическом исследовании // Сборник трудов V Международного ветеринарного конгресса, Москва, 22-24 апреля 2015 г. -С. 250-252.

УДК:619:616:98.578.835.2

Участие ДНК клеток в иммуногенезе

А.Я. Самуйленко, академик РАН, директор ФГБНУ ВНИТИБП

С.А. Гринь, член-корреспондент РАН, зам.директора ФГБНУ ВНИТИБП

Р.Н. Мельник, кандидат биологических наук, зам.-директора ФГБНУ ВНИТИБП

А.Н. Андроник, помощник директора ФГБНУ ВНИТИБП

Е.И. Орел, аспирант ФГБНУ ВНИТИБП

Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, 141142, Московская область, Щелковский район поселок Биокомбината, 8-496-567-32-63

Исходя из многочисленных данных можно сделать вывод что, организм не может реагировать только отдельными клонами клеток, специфическому антигену. Скорость пролиферации этих клеток тоже неспособна выдать такую динамику и уровень иммунного ответа. А также специфическую защиту клеток всего организм. Все это помогло объяснить участием ДНК клеток организма при создании иммунитета.

Part of the DNA of cells in the immunogenesis

**A.J. Samujlenko, C.A. Grin, R.N. Miller
A.N. Andronic, E.I. Eagle**

On the basis of numerous data, we can conclude that the body cannot react, only a specific clone of cells, specific antigen. The proliferation rate of these cells is also unable to give such dynamics and immune response. As well as the specific protection of cells throughout the body. All this has helped to explain a part of the DNA of the cells of the body in creating immunity

Современная теория иммунитета носит название клонально-селективной: образуется клон В - клеток и наблюдается их селекция, то есть отбор. В конечном счете, по антигену (с помощью хелперов). Авторами этой теории были лауреаты Нобелевской премии Ф. Бернет, Н. Эрне, П.Б. Медвар и другие ученые. Иммунную защиту обеспечивают два механизма: врожденный и адаптивный, которые включают клеточные и гуморальные компоненты и активно взаимодействуют друг с другом в процессе иммунного ответа. Распознавание множества чужеродных антигенов (10¹⁸) происходит благодаря огромному разнообразию в нашем организме образующихся в тимусе клонов Т- лимфоцитов и при помощи генов главного комплекса гисовместимости классов II. Нейтрализацию чужого антигена осуществляют циркулирующие в жидкостях организма антитела (гуморальный иммунитет) и цитоксические лимфоциты (клеточный иммунитет). Основные характеристики иммунного ответа – это умение различать собственные антигены от чужеродных, специфичность и иммунная память [1, 8]. Вне зависимости от формы иммунного ответа его традиционно разделяют на индуктивную и эффективную (продуктивную) фазы [3]. В индуктивную фазу происходит представление антигена, то есть передача информации об антигене от клеток врожденного иммунитета (антигенпрезентирующих кле-

ток) инициаторам адаптивного иммунитета Т - хелперам. Затем выбирается путь дальнейшего развития иммунного ответа по клеточному или гуморальному пути – через индукцию дифференцировки разновидностей Т- хелперов (Th 1, Th 2, Th 17 и т.д). При участии этих Т - хелперов происходит дифференцировка эффективных иммуноцитов и параллельно клеток памяти [2, 5].

Анализ многочисленных публикаций свидетельствует о том, что под воздействием на ДНК клетки мутагенных факторов (химических, физических и биологических) в конечном счете приводит к изменению ее функции, а под воздействием чужого антигена клетки организма вырабатывают новую специфическую продукцию антител [6, 9].

Проведенные нами исследования позволили получить данные, при анализе которых можно прийти к выводу, что при увеличении дозы в вакцинах инактивированных и специфического антигена в опытах *in vivo* и *in vitro* сокращается срок выработки максимального количества антител, и для получения их максимальных величин требовалось в сотни раз меньше, чем для создания защиты клеток организма животных чувствительных к вирусу.

Исходя из многочисленных данных, включая собственные результаты исследований, можно сделать вывод о том, что организм не может реагировать только отдельными клонами клеток, специфическому антигену. Скорость пролиферации этих клеток тоже неспособна выдать такую динамику и уровень иммунного ответа [4, 10, 11]. А также специфическую защиту клеток всего организм. Все это помогло объяснить участием ДНК клеток организма при создании иммунитета [7]. Известно, что в ДНК человека заложено более 10 в двух миллионной степени различных вариаций, то есть это бесконечные возможности.

Список литературы.

1. Верховский О.А. Кинетика синтеза различных типов антителосекретирующих клеток костного мозга мышей в процессе иммуногенеза // Доклады РАСХН, 2000. - №5. - С. 4.
2. Ездакова И.Ю. Поверхностные иммуноглобулины В-клеток крови крупного рогатого скота // Ветеринарная медицина. 2007. №4. С.11-13
3. Ефремова М.С. Количественная характеристика иммунокомпетентных клеток кур в процессе поствакцинального иммунного ответа // Ветеринария и кормление. 2013. №1. С.28-30.
4. Жаданов А.И. Количественная характеристика изотип-специфических антителосекретирующих клеток у мышей в процессе формирования первичного и вторичного иммунного ответа // Ветеринария, 2000. - №11. - С. 5.
5. Иолчиев Б.С. Взаимосвязь иммунологических и иммуногенетических показателей быков-производителей. // Доклады Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2016. № 288-1. С. 331-334.
6. Самуйленко А.Я. Адъюванты - Москва, ВНИТИБП, 2016 г. - С.3-4.
7. Субботин В.В. Количественная характеристика Т-, В-клеток в процессе поствакцинального иммунного ответа // Труды ВИЭВ. -2010.-Т. 76.-С. 29-33.
8. Третьякова И.В. Оценка иммуномодулирующей активности вакцины против рожи свиней (BP-2) в процессе иммуногенеза. // Труды ВИЭВ. -2003. -Т. 73. -С. 200-204.
9. Уоррен Левинсон. Медицинская микробиология и иммунология, 2015. С.450-480
10. Федоров Ю.Н. Динамика количества Т-клеток и их взаимодействие с антигенпредставляющими клетками в процессе иммунного ответа // Цитология, 2001. Т.43. № 9. С. 2.
11. Южаков А.Г. Современная таксономия вирусов. // Ветеринария и кормление. 2017. № 1. С. 4.

УДК 619:615,371:619:616.2-053.2

Применение иммуномодуляторов при вирусных заболеваниях мелких домашних животных

Санин А.В. – доктор биологических наук, профессор, заведующий лаборатории клеточного иммунитета E-mail: saninalex@inbox.ru

Наровлянский А. Н. – доктор биологических наук, заведующий лаборатории цитокинов, профессор, Тел.: +7(499)1934306. E-mail: narovl@yandex.ru

Пронин А.В. – доктор биологических наук, профессор, заместитель директора Тел.: +7(499)1905741. E-mail: proninalexander@yandex.ru

ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Аннотация. В данном обзоре рассмотрены современные представления об особенностях применения иммуномодуляторов при лечении вирусных инфекций мелких домашних животных. Описаны некоторые особенности врожденного и специфического иммунного ответа на вирусные инфекции, а также механизмов, позволяющих вирусу уклоняться от уничтожения эффекторными клетками иммунной системы в сочетании с интерферонами и другими цитокинами. Даны рекомендации по использованию иммуномодуляторов и их сочетаний при лечении вирусных заболеваний.

Ключевые слова: иммуномодуляторы, иммунный ответ, вирусные заболевания

Use of immune modulators for treatment of small animal viral diseases

A.V.Sanin, A.N.Narovlyanskiy, A.V.Pronin

The modern data on structure and biological activities of the immune modulators most commonly used in veterinary practice for treatment of small animal virus infections are summarized. Peculiarities of the innate and specific immune responses to viral infections are described as well as the mechanisms allowing viruses to evade elimination by effector cells of the immune system, interferons and other cytokines. Recommendations on use of immune modulators and their combinations for treatment of viral diseases are given.

Key words: Immunomodulators, immune response, viral diseases

Иммуномодуляторы (ИМД) - вещества, изменяющие иммунореактивность организма, в результате чего повышается его резистентность к инфекциям. Изменение иммунореактивности организма зависит от химической структуры ИМД, дозы, способа и схемы его введения, исходного иммунного состояния животного и ряда других факторов. Практически у каждого ИМД есть пороговая доза, превышение которой ведет не к ожидаемой стимуляции иммунного ответа, а к иммуносупрессии. Показанием для применения ИМД служит любая иммунологическая недостаточность, вызванная острой или хронической инфекцией, стрессом, антибиотико- или медикаментозной терапией, введением антгельминтиков и т.д. Поскольку вирусные инфекции практически всегда сопровождаются иммуносупрессией, актуальны поиск и применение тех ИМД, которые способны не только повышать естественную резистентность организма (стимулируя фагоцитоз и выработку антител, усиливая цитотоксическую активность лимфоцитов, индуцируя синтез ИФ и других цитокинов), но и оказывать противовирусный эффект. Препараты, сочетающие в себе свойства ИМД и противовирусного средства - ИМДАС - можно рекомендовать для лечения и профилактики инфекционных заболеваний, ассоциированных с иммунодефицитным состоянием. Очевидно, что ни один ИМД или ИМДАС не сможет стать пресловутой "магической пулей", но правильно подобранным сочетаниям указанных препаратов, по-видимому, принадлежит будущее в иммунотерапии инфекционных заболеваний.

Некоторые особенности иммунного ответа при вирусной инфекции

Часто здоровому организму удается быстро справиться с вирусной инфекцией за счет индукции эндогенного ИФН и последующего разрушения вирусных мРНК. Однако при высокой заражающей дозе либо на фоне снижения естественной резистентности, вызванного иммунодефицитом, развивается острая инфекция, запускающая целый каскад иммунных реакций. Известно, что многие внутриклеточные агенты, включая вирусы, индуцируют выработку ИФН α и ИЛ-12 макрофагами и плазматочными дендритными клетками. Образование ИЛ-12 в АПК начинается после того, как TLR распознают эпитопы вирусов [12]. По меньшей мере 50% TLR участвуют в распознавании инфекционных агентов, вызывающих Th1-ответ. Секретируемые АПК цитокины активируют МФ и ЕК и направляют иммунный ответ по Th1-типу [10]. ИФН- λ играет важную роль в регуляции иммунного ответа на ряд вирусных инфекций [14]. ИЛ-12 стимулирует пролиферацию ЕК и Т-клеток, усиливая киллерные способности ЕК и ЦТЛ и индуцируя синтез ИФН γ . Таким образом, эндогенный ИЛ-12 необходим для индукции оптимального Th1-ответа и играет ключевую роль в обеспечении клеточного иммунитета против многих вирусов.

Аналогичное, но менее выраженное действие проявляют ИФН γ , продуцируемый ЕК, а также ИФН α/β , ИЛ-18 и ИЛ-23. На начальных стадиях инфекционного процесса дифференцировка Th направляется ранней цитокиновой реакцией [1]. Если ИЛ-12 и ИФН γ не вырабатываются или преобладает продукция ИЛ-4, то дифференцировка сдвигается в сторону Th2. В норме уровень образования цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-4 обеспечивает формирование эффективного противовирусного иммунитета, но многие вирусы способны нарушать сбалансированное развитие Th1/Th2-ответа.

Преодолеть врожденный и приобретенный иммунитет вирусам удается за счет способности ускользать от иммунологического надзора, подавлять иммунный ответ или инициировать синтез регуляторных молекул и запускать каскад реакций, препятствующих эффективной противовирусной защите организма. Например, некоторые крупные ДНК-содержащие вирусы (герпесвирусы, поксвирусы, аденовирусы) посредством синтеза кодируемых их геномом белков вирокинов, а также других механизмов вызывают иммуносупрессию и нарушают эффекторный Th1-ответ [11]. Вирокины могут действовать как хемокины или антагонисты последних. По-видимому, кодирующие их гены были приобретены вирусами в процессе эволюции и модифицированы с тем, чтобы обеспечить их репликацию, выживание и распространение. Многие вирусы научились ингибировать апоптоз, секрецию ИФН, хемокинов и воспалительных цитокинов (например, ФНО, ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-2, ИЛ-4), а также активность ЦТЛ, ЕК, комплемента и антител. В частности, поксвирусы запускают секрецию антагонистов хемокинов, подавляя миграцию ДК к месту вторжения. Некоторые вирусы приобрели эпитопы, индуцирующие в организме хозяина появление Т-клеток, отличных от Th1 и Th2 и секретирующих противовоспалительный цитокин ИЛ-10 (антагонист и ингибитор ИЛ-12), который, действуя на МФ и ДК, подавляет синтез и продукцию ИФН γ , а также активность ЦТЛ. При избытке ИЛ-10 снижается защита от инфекционных агентов и развиваются хронические инфекции [13]. Другие вирусы (в том числе мелкие) способны подавлять экспрессию антигенраспознающих рецепторов и/или блокировать презентацию вирусных антигенов иммунокомпетентным клеткам [15]. Таким образом, вирусы представляют собой ИМД, которые способны, попадая в организм хозяина, оставаться нераспознанными или подавлять клеточный и (или) гуморальный иммунный ответ, что препятствует развитию сбалансированной иммунной реакции и утяжеляет течение инфекционного процесса [9].

Применение ИМД при вирусных инфекциях

Благоприятный исход при практически любой вирусной инфекции непосредственно зависит от ранней (от нескольких часов до 1 - 2 сут) стимуляции синтеза цитокинов, обеспечивающих формирование как клеточного, так и гумо-

рального иммунного ответа. Поэтому введение ИМД, способных восстановить подавленные вирусами ранние цитокиновые реакции - прямой путь к успеху. На поздних стадиях вирусной инфекции избыточная стимуляция цитокинов может, напротив, спровоцировать развитие целого ряда иммунопатологических реакций, значительно ухудшить состояние организма и даже вызвать шок и смерть [1]. В связи с этим в инкубационном периоде и первые 1 - 2 дня клинической стадии вирусного заболевания целесообразно назначать ИМД, стимулирующие продукцию ИФН, а также других факторов естественной резистентности организма (например, ИЛ-12, ФНО, ИЛ-1, ИЛ-2). Объективным критерием эффективности указанных ИМД может служить восстановление выработки ранних цитокинов, синтез которых подавлен вирусами. Следует отдавать предпочтение ИМД природного, особенно, растительного происхождения, которые, как правило, не оказывают побочных эффектов [3]. Рекомендуют применять индукторы ИФН - интерфероногены, а не препараты самих ИФН, в том числе рекомбинантные. Рекомбинантные ИФН, как правило, антигенны и быстро инактивируются. Напротив, индукторы ИФН стимулируют синтез эндогенного ИФН (что физиологично, да и активность эндогенного ИФН сохраняется дольше), а также, в большинстве случаев, запускают синтез и продукцию других цитокинов, прежде всего, именно Th1 ряда. К сожалению, из ветеринарной практики изъят очень эффективный ИМД - циклоферон, который способен индуцировать секрецию ИФН всех типов.

При вирусной инфекции первую линию обороны создают ЕК. Этот ранний быстродействующий деструктивный механизм иммунитета запускается после инфицирования клеток-мишеней. Вообще роль естественных и обученных киллерных клеток (соответственно, ЕК и ЦТЛ) в быстром распознавании и уничтожении инфицированных вирусами клеток трудно переоценить. Антигенспецифические ЦТЛ обеспечивают удаление инфицированных клеток из организма. Неспецифические ЕК после активации и пролиферации синтезируют и секретируют противовоспалительные цитокины, которые запускают каскад сигналов, активирующих специфические механизмы в инфицированной клетке, в результате чего прерывается цикл репродукции вируса. Поскольку у активированных ЕК повышается противовирусная активность, то применение ИМД, стимулирующих естественное киллерное звено врожденного иммунитета, вполне обосновано при лечении вирусных инфекций.

Препараты на основе цитокинов (в том числе рекомбинантных) - ронколейкин и кинорон - при введении в организм восполняют дефицит растворимых иммунорегуляторных факторов, что особенно важно при тяжелых поражениях иммунной системы, когда ее компенсаторные возможности нарушены. С другой стороны, необоснованное назначение подобных препаратов (при отсутствии серьезных показаний) может вызвать в иммунной системе дисбаланс, обусловленный блокированием синтеза гомологичных эндогенных молекул.

Большое значение имеет сочетание ИМД на основе рекомбинантных цитокинов с другими препаратами. Очевидно, например, что эффективность ронколейкина (рекомбинантного ИЛ-2) возрастет, если перед его введением в организм повысить уровень экспрессии соответствующих рецепторов с помощью препаратов, усиливающих секрецию ИЛ-1. Это подтверждено на практике в экспериментах по комплексному применению ронколейкина с фоспренилом или с гамавитом (в состав последнего входит нуклеинат натрия, эффективный индуктор ИЛ-1 и ИФН) - в сочетании с этими ИМД активность ронколейкина возрастает [5].

На более поздних стадиях болезни рекомендуют применять препараты, непосредственно воздействующие на размножение вирусов в клетках-мишенях или оказывающие системный эффект, например, фоспренил, который в дополнение к вышеперечисленным свойствам также обладает противовоспалительной активностью [7] и предотвращает гибель макрофагальных клеток, вызванную вирусами, сохраняя тем самым функции и структурную целостность АПК, что необходимо для индукции полноценного противовирусного иммунного ответа.

Следует остановиться на возможности сочетанного применения ИМД, различающихся между собой по спектру воздействия на лимфоидные клетки-мишени. В частности, сочетание достига (более активно воздействующих на В-клетки, чем на Т-клетки) с ИМДАС (например, с фоспренилом или форветом) может, при своевременно начатом лечении, предотвратить развитие вторичных инфекций и, следовательно, сделать ненужной антибиотикотерапию.

При лечении такой тяжелой инфекции, как кошачий инфекционный перитонит получены обнадеживающие данные с применением препаратов на основе растительных полипренолов [2,6, 8] и форвета [4].

При выборе препаратов для лечения вирусных инфекций важны и другие, вспомогательные функции ИМД. В частности, при инфекциях, сопровождающихся поражением желудочно-кишечного тракта (парвовирусный энтерит, инфекционный гепатит, панлейкопения) большое значение имеет обезвреживание токсинов, обильно поступающих в организм в связи с дисфункцией кишечника. Очевидно, что при таких заболеваниях показаны такие препараты, как гамавит, обладающий доказанными свойствами детоксиканта.

Вместе с тем, существует немало ситуаций, при которых ИМД противопоказаны. В частности, введение ликопида (или - гликопина) мышам приводит к активации инфекционного процесса, вызванного вирусом Лангат. Этот эффект, по-видимому, связан с вызванным ИМД ростом популяции макрофагальных клеток-мишеней, в которых размножается вирус. При тяжелой вирусной инфекции, например, чуме плотоядных, на фоне уже развившегося иммунодефицита ветврачу, который добивается хрупкого баланса между иммуностимуляцией и иммуносупрессией при подборе терапевтических средств приходится буквально ступать по лезвию ножа. Вот почему при чуме плотоядных в первую очередь рекомендуют ИМД, способные непосредственно воздействовать на возбудителя. При острой нервной форме чумы, когда вирус, размножаясь в нейронах и глиальных клетках, вызывает демиелинизацию, многие ветврачи назначают глюкокортикоидные гормоны, поскольку применение на этой стадии болезни иммуностимуляторов (Т-активина и др.) способно убить собаку за 1-2 дня, причем перед гибелью клиническое состояние животных резко ухудшается. Например, ИФН способствует повреждению нервных клеток, активируя цитотоксические Т-лимфоциты. Поэтому ИМД, повышающие синтез ИФ, противопоказаны при нервной форме чумы собак, в результате их применения может ускориться развитие болезни и обостриться ее течение.

Сокращения: АПК - антигенпрезентирующие клетки; ДК - дендритные клетки; ЕК - естественные киллеры; ИЛ - интерлейкин; ИМД - иммуномодулятор; ИМДАС - иммуномодулятор с противовирусными свойствами; ИФН - интерферон; КСФ - колониестимулирующий фактор; МФ - макрофаги; TLR - Toll-подобные рецепторы; ФНО - фактор некроза опухолей; ЦТЛ - цитотоксические Т-лимфоциты

Список литературы

1. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н., Мезенцева М.В. Ранние цитокиновые реакции при вирусных инфекциях. Цитокины и воспаление. 2004. т.3 N1, С.3-6.
2. Переслегина И.О., А.А. Виденина, А.Н. Наровлянский, А.В. Пронин, А.В. Санин Новое в лечении кошачьего инфекционного перитонита. Росс.ветер.журнал. МДЖ. 2013, №1. С.6-10.
3. Пронин А.В., С.В. Ожерелков, А.Н. Наровлянский, Л.Л. Данилов, С.Д. Мальцев, А.В. Деева, Е.А. Григорьева, А.В. Санин. Роль цитокинов в иммуномодулирующих эффектах фосфатов полипренолов - противовирусных препаратов нового поколения. Russian J.Immunol. 2000, v.5, N2.P.155-164.
4. Рахманина Н.А., Терехова Ю.О., Цибеков В.В., Верховский О.А., Уласов В.И. Оценка эффективности применения препарата форвет для профилактики инфекционного перитонита кошек Росс.ветер.журнал. МДЖ. 2015, №2, С. 38-41
5. Санин А.В. Применение иммуномодуляторов при вирусных заболеваниях мелких домашних животных. Российский ветеринарный журнал. МДЖ. 2005 N1 .С.38-42
6. Санин А.В., Савойская С.Л., Васильев И.К., Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Е.В. Гордеева. Применение Гамавитена при лечении вирусных инфекций у кошек. Ветеринария Кубани 2009.№6 .С.29-30.

7. Санин А.В., С.А. Суханова, Проскурина О.В., Митрохин Н.М., И.В.Ганшина, Г.Ф.Судьина, В.Ю.Санина, А.А.Виденина, Т.Н.Кожевникова, А.А.Санин, С.В.Ожерелков, А.В.Саличев, А.В.Пронин, А.Н.Наровлянский. Исследование противовоспалительной активности фоспренила в эксперименте. Российский ветеринарный журнал, МДЖ. 2011, № 4 - С.17-20.

8. Фурман И.М., И.К.Васильев, А.Н.Наровлянский, А.В.Пронин, А.В.Санин. Применение препаратов на основе растительных полипептидов при различных формах кошачьего инфекционного перитонита. Росс. Ветер. Ж., 2010. №3. С.42-43.

9. Barteel E., McCormack A., Fruh K. Quantitative Membrane Proteomics Reveals New Cellular Targets of Viral Immune Modulators. PLoS Pathogens V.2(10) 2006.P.107

10. Colonna M., Krug A., Cella M. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. Curr.Opin.Immunol. 2002 14.P. 373-379.

11. Koyama S., Ishii K.S., Coban C., Akira S. Innate

immune response to viral infection. Cytokine 2008Volu 43, Issue 3, Pages 336-341

12. Ma X., Trinchieri G. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Adv.Immunol. 2001 79:55

13. Molina-Holgado E., Arevalo-Martin A., Castrillo A., Bosca L., Vela M., Guaza C. Interleukin-4 and interleukin-10 modulate nuclear factor kB activity and nitric oxide synthase-2 expression in Theiler's virus-infected brain astrocytes

Journal of Neurochemistry 2002 Volume 81, Issue 6, Pages 1242-1252

14. Mordstein M, Kochs G, Dumoutier L, Renaud J-C, Paludan SR, et al. (2008) Interferon-λ. Contributes to Innate Immunity of Mice against Influenza A Virus but Not against Hepatotropic Viruses. PLoS Pathog 4(9): e1000151.

15. Zelinsky G, Dietze K, Sparwasser T, Dittmer U (2009) Regulatory T Cells Suppress Antiviral Immune Responses and Increase Viral Loads during Acute Infection with a Lymphotropic Retrovirus. PLoS Pathog 5(8): e1000406.

УДК 619:615,371:619:616.2 - 053.2

Разнонаправленное действие MIF и фоспренила на течение экспериментальной вирусной инфекции

¹Санин А.В. - доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета E-mail: saninalex@inbox.ru

²Ожерелков С.В.- доктор биологических наук, заведующий лабораторией иммунологии и культур тканей, E-mail: ozherelkov@yandex.ru

¹Кожевникова Т. Н.- кандидат медицинских наук, Тел: 8-499-190-58-51 tatiana@micro-plus.ru

¹ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

²ФГБНУ "ФНЦИРИП им.М.П.Чумакова РАН", 142782, Москва, поселение Московский, пос. Институт полиомиелита, 27-й км Киевского шоссе

Аннотация. Цель. Изучить влияние MIF при и/ц введении на течение экспериментальной инфекции, вызванной у мышей вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ), а также изучить влияние фоспренила (ФП) и/или антител к MIF на течение данной инфекции на фоне введения MIF.

Материалы и методы. ФП вводили и/ц. Использовали рекомбинантный человеческий MIF производства фирмы R&D (США).

Результаты. В сыворотках крови мышей, инфицированных ВКЭ, выявляли стимуляцию продукции MIF в период с 8-х по 10-е сутки после инфицирования - на фоне проявления клинических признаков клещевого энцефалита. Введение инфицированным мышам ФП, напротив, приводило к подавлению продукции MIF в указанные сроки. При введении MIF в дозе 20 нг мышам, инфицированным ВКЭ, летальность значительно (на 40%) увеличилась, а СПЖ, напротив, сократилась на 2,3 сут. Таким образом, MIF в высоких дозах вызывал утяжеление инфекции, вызванной ВКЭ у мышей. Напротив, введение зараженным мышам ФП в дозе 60 мкг приводило к защите от инфекции, вызванной ВКЭ, в 100%. Аналогичным образом, и/ц введение АТ к MIF зараженным ВКЭ мышам приводило к существенному снижению показателя летальности - до 26% по сравнению с контролем, и увеличению СПЖ на 5,5 суток. При одновременном введении в мозг зараженных мышей MIF, ФП и АТ к MIF регистрировалось предотвращение MIF-индуцированного утяжеления тяжести течения КЭ. Таким образом, Фоспренил можно рассматривать в качестве перспективного средства контррегуляции MIF.

Ключевые слова: MIF, фоспренил, клещевой энцефалит

Oppositely directed influence of MIF and phosprenyl (PP) upon the course of experimental viral infection in mice

Sanin A.V., Kozhevnikova T.N., Ozherelkov S.V.

Aim. To study influence of intracerebrally (i.c) inoculated MIF upon the course of experimental tick-borne virus infection in mice, as well as influence of PP and/or anti-MIF antibodies upon the course of the infection concomitant with MIF inoculation.

Materials and methods. Commercially available Phosprenyl was used. It was inoculated i.c.. Recombinant human MIF (R&D, USA) was used throughout.

Results. Stimulation of MIF production was seen in blood sera of mice infected by TBEV from day 8 till day10 following infection - when clinical symptoms of tick-borne encephalitis were developed. On the contrary, PP inoculation to infected mice resulted in inhibition of MIF production in the same period. I.c inoculation of MIF at a greater dose to infected mice led to significant rise in lethality (by 40%), while mean life span index was decreased by 2.3 days. So, MIF at high doses caused aggravation of the course of TBEV-induced infection in mice. On the contrary, inoculation of PP at a dose of 60 mcg to TBEV-infected mice, resulted in 100% survival. Similarly, i.c. inoculation of anti-MIF antibodies to TBEV-infected mice led to significant decrease in lethality (down to 26% compared with controls), while mean life span index was up by 5.5 days. Simultaneous i.c. inoculation of MIF, PP anti-MIF antibodies to the infected mice also prevented MIF-induced aggravation of the infection course. Thus, Phosprenyl may be considered as a promising contraregulatory agent in respect to MIF.

Key words: MIF, Phosprenyl, tick-borne encephalitis.

Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), является одним из ключевых провоспалительных медиаторов, играющих важную регуляторную роль при инфекционной патологии [8 -10].

Фоспренил - иммуномодулятор с доказанной противовирусной активностью, широко применяемый в ветеринарной практике [1,3,4]. Ранее было показано, что MIF, вводимый мышам внутрибрюшинно (в/б) одновременно с вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) в дозе 100 ЛД₅₀, способен вызывать утяжеление инфекции. Было также показано, что фоспренил (ФП), обладающий терапевтическим эффектом при флавивирусных инфекциях, подавляет вирус-индуцированную продукцию MIF в клетках P388D1 через 24 часа после их заражения ВКЭ, проявляя активность контр-MIF.

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния MIF при интрацеребральном (и/ц) введении на течение экспериментальной инфекции, вызванной у мышей ВКЭ MIF.

Материалы и методы

Использовали препарат Фоспренил производства ЗАО "Микро-плюс". Применяли рекомбинантный человеческий MIF производства фирмы R&D (США). ВКЭ (высокопатоген-

ный для мышей штамм Абсеттаров и вакцинный штамм Софьин) был получен в виде суспензии мозга заболевших мышей-сосунков беспородных мышей, заражённых и/с. Титр ВКЭ составлял 10^9 ЛД₅₀. Вирус разводили средой 199 на растворе Эрла и вводили мышам в/б. Использовали анти-тела поликлональные человеческие анти-MIF, афинно очищенные, производства фирмы R&D (США). Исходная концентрация антител (АТ) в растворе составляла 1 мг/мл. Согласно инструкции производителя, АТ разводили ФСБ до получения рабочей дозы - 0,05 мг/кг и вводили и/с в объёме 0,05 мл на 5-е сутки после заражения.

Статистическую обработку результатов : разницу в показателях летальности и средней продолжительности жизни (СПЖ) вычисляли по Фишеру и Мойнелу [2].

Результаты и обсуждение

В сыворотках крови мышей, инфицированных ВКЭ, выявляли стимуляцию продукции MIF в период с 8-х по 10-е сутки после инфицирования - на фоне проявления клинических признаков клещевого энцефалита. Введение инфицированным мышам ФП, напротив, приводило к подавлению продукции MIF в указанные сроки. При введении MIF в дозе 20 нг мышам, инфицированным ВКЭ, летальность значительно (на 40%) увеличилась, а средняя продолжительность жизни (СПЖ), напротив, сократилась на 2,3 сут. Таким образом, MIF в высоких дозах вызывал утяжеление инфекции, вызванной ВКЭ у мышей. Напротив, введение заражённым мышам ППФ в дозе 60 мкг приводило к защите от инфекции, вызванной ВКЭ, в 100%.

На следующем этапе исследований изучали возможность предотвращения MIF-индуцированного утяжеления инфекции, вызываемой ВКЭ (штамм Софьин) у мышей с помощью и/с введения: 1) ФП; 2) АТ к MIF; 3) сочетанного введения ФП и АТ к MIF.

Данные, представленные в Таблице, показывают, что MIF в дозе 20 нг вызывал значительное утяжеление острого КЭ: показатели летальности и СПЖ значительно отличались от контрольных (группы 1 и 2). Так, у мышей, инфицированных ВКЭ, летальность составила 46%, тогда как введение MIF мышам, заражённым ВКЭ, на 5-е сутки после инфицирования, приводило к возрастанию показателя летальности до 100%; при этом СПЖ у таких мышей была на 2,4 суток меньше, чем у контрольных. И/с введение заражённым мышам ФП в дозе 60 мкг приводило к защите от инфекции, вызванной ВКЭ, в 100% (группа 3).

При одновременном введении мышам MIF и ФП регистрировали защиту от ВКЭ в 40% случаев, а показатель СПЖ увеличивался на 3,1 суток по сравнению с контрольным (группы 1 и 4). И/с введение АТ к MIF заражённым ВКЭ мышам приводило к существенному снижению показателя летальности - до 26% по сравнению с контролем, и увеличению СПЖ на 5,5 суток по сравнению с контролем (группы 1 и 5). На фоне введения MIF и АТ к MIF заражённым ВКЭ животным наблюдалось существенное снижение летальности до 53% по сравнению с мышами, которым инъецировали MIF, а СПЖ у таких животных увеличивалась на 4,7 суток по сравнению с контролем (группы 2 и 6). В случае одновременного введения в мозг заражённых вирусом мышей MIF, ФП и АТ к MIF регистрировали предотвращение MIF-индуцированного утяжеления тяжести течения КЭ: показатель летальности снижался в 7,6 раза, а СПЖ увеличивалась на 9, 1 суток по сравнению с таковыми у мышей,

которым вводили MIF на фоне развития вирусной инфекции в головном мозге (группы 2 и 7).

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что MIF может служить показателем тяжести течения КЭ, а также - возможным прогностическим показателем развития менинго-энцефалитической формы КЭ. Хотя значимость ВКЭ в ветеринарии не столь высока, как в медицине, в последние годы накапливаются данные о том, что данный вирус патогенен не только для людей, но и для собак, у которых способен вызывать менингоэнцефалит с летальным исходом.

Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), является одним из ключевых провоспалительных медиаторов, играющих важную регуляторную роль в ряде патологических состояний [11]. MIF - плейотропный цитокин, продуцируемый мозжечком, а также многими типами клеток: макрофагами, дендритными клетками и Т-клетками [6]. MIF модулирует экспрессию нескольких воспалительных факторов, включая TNF-альфа, оксид азота и циклооксигеназу-2 [7]. Это во многом обуславливает ключевую роль MIF в инфекционной патологии. Таким образом, подавление провоспалительной активности MIF может быть перспективной терапевтической стратегией. Ранее было показано, что Фоспренил обладает противовоспалительными свойствами, подавляя активность 5-липоксигеназы и 15-липоксигеназы [5]. В данной работе показано, что противовоспалительная активность Фоспренила распространяется также на его способность к контррегуляции MIF.

Список литературы

1. Ожерелков С.В., Белоусова Р.В., Данилов Л.Л., Деева А.В., Мальцев С.Д., А.Н.Наровлянский, и др.; Препарат фоспренил подавляет размножение вирусов диареи и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в чувствительных культурах клеток; Вопр. вирусол.; 2001.5.С.43-45.
2. Пшеничников В.А., Семёнов Б.Ф., Зезеров Е.Г. - Стандартизация методов биологических исследований - М., 1974, С. 123-126.
3. Руднева С.Ю., Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Степанова Т.Н., Санин А.В. Лечение папилломатоза ротовой полости у собаки с использованием фоспренила. РВЖ МДЖ. 2016 .N3. С.9-11
4. Санин А.В., А.В. Пронин, А.Н. Наровлянский, Т.Н. Степанова, С.Л. Савойская, И.К. Зубашев, Э.И. Элизбарашвили, Е.А. Бакулина, Н.В. Вышивкина, С. В. Ожерелков. Действие полипренилфосфата натрия на вирус ринотрахеита кошек. Ветеринария 2015 №11. С. 17-21.
5. Санин А.В., И.В. Ганшина, Г.Ф. Судьина, В.Ю. Санина, Т.Н. Кожевникова, А.В. Пронин, А.Н. Наровлянский, С.А. Суханова, Проскурина О.В., Митрохин Н.М. Фосфорилированные полипренолы - новый класс соединений с противовоспалительной и бронхолитической активностью. Инфекция и иммунитет 2011. Т.1 №4. С.355-360.
6. Amaral F.A., Fagundes C.T., Guabirada R., et al. The role of macrophage migration inhibitory factor in the cascade of events leading to reperfusion-induced inflammatory injury and lethality. Amer.J.Pathol. 2007, V.171 N6. P.1887-193
7. Donn R.P., Ray D.W. Altered MIF regulation may therefore be pivotal to acquiring chronic inflammation following an innate immune response. J Endocrinol. 2004. 182.P.1-9.
8. Flores M., Saavedra R., Bautista R., et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. FASEB J. 2008. 22(10): 3661-71
9. Kobernick H., Grode L., David J.R., Rohde W., Rolph M.S., Mitrucker H.-W., Kaufmann S.H. E. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Plays a Pivotal Role in Immunity against *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, Vol. 99, N 21. 2002, P. 13681-13686
10. Roisado Jde D., Rodriguez-Sosa M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a key player in protozoan infections. Int.J.Biol.Sci 2011 7 (9): 1239-56
11. Stosic-Grujicic S., Stojanovic I., Maksimovic-Ivanic D., et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is necessary for progression of autoimmune diabetes mellitus. J.Cell.Physiol. 2008 215 (3): 665-75.

Таблица. Предотвращение MIF-индуцированного утяжеления острого клещевого энцефалита при интрацеребральном введении ФП и антител к MIF

Группы №№/ мышам вводили	Общее кол-во мышей в группе	Пало/общее кол-во животных	Летальность, %	СПЖ, сутки
1. ВКЭ	15	7/15	46*	9,5
2. ВКЭ + MIF 20 нг	15	15/15	100*	7,1*
3. ВКЭ + ФП	15	0/15	0*	21
4. ВКЭ + ФП + MIF 20 нг	15	9/15	60*	12,6*
5. ВКЭ + АТ MIF	15	4/15	26*	14,5*
6. ВКЭ + MIF + АТ MIF	15	8/15	53*	11,8*
7. ВКЭ + MIF + ФП + АТ MIF	15	2/15	13*	16,2*

* - разница между соответствующими показателями в группах 1 и 2; 1 и 3; 2 и 4; 2 и 5; 2 и 6; 6 и 7 статистически достоверна (при $p \leq 0,05$);

УДК 619:615,371:619:616.2 - 053.2

Вакцинация глубокоостельных коров с гликопином с целью повышения резистентности новорожденных телят

Устинова Г.И.¹, Кучерук О.Д.¹, Андропова Т.М.²,
Ездакова И.Ю.¹, Мникова Л.А.¹, Ишкова Т.А.¹,
Лучкин А.Г.³, Ежгур С.А.²

¹ФГБНУ ВИЭВ, г. Москва

²ИБХ, г. Москва

³ГУВ МО "Раменская районная СББЖ"

Аннотация. В данной статье представлены результаты исследования по применению Гликопина с вакциной против рота-, коронавирусной инфекции на глубокоостельных коровах для повышения резистентности новорожденных телят.

Ключевые слова: вакцинация, глубокоостельные коровы, резистентность, новорожденные телята, колостральная иммунитет, Гликопин.

Vaccination of cows in late-term pregnancy with Glicopin to increase the resistance of newborn calves

Ustinova G.I., Kucheruk O.D., Andronova T.M.,
Ezdakova I.Yu., Mnikova L.A., Ishkova T.A., Luchkin A.G.,
Yezhgur S.A.

The paper presents the results of research on immunization against rota-viral, corona-viral infection with Glicopin in cows in late-term pregnancy to increase the resistance of newborn calves.

Key words: vaccination, cows in late-term pregnancy, resistance, newborn calves, colostral immunity, Glicopin.

Желудочно-кишечные болезни новорожденных телят являются одной из серьезных проблем, стоящих перед ветеринарными специалистами. Одной из главных причин заболеваний новорожденных считается нарушение равновесия между защитными силами организма и окружающей средой. Животные рождаются практически со стерильным кишечником и поэтому подвержены инфицированию при контакте с внешней средой. Организм матери и плода следует рассматривать как единую взаимосвязанную систему. Новорожденных телят с высокой резистентностью к различным возбудителям можно получить, повышая уровень резистентности коров-матерей.

В последнее время ведется поиск лекарственных средств, которые можно вводить животным в последний период беременности для повышения функции иммунной системы у новорожденных телят [1]. В защите новорожденных телят от возбудителей кишечных заболеваний основную роль играет колостральная иммунитет, обусловленный поступлением в организм животных специфических антител, находящихся в молозиве [5].

В данном сообщении приведены результаты изучения клеточного и гуморального иммунитета глубокоостельных коров и их приплода при иммунизации вакциной "Ротавек Корона" против рота-, коронавирусной инфекции с иммуномодулятором Гликопином.

Материалы и методы

Опыт по совместному применению Гликопина с вакциной проводили в хозяйстве Московской области во время плановой иммунизации глубокоостельных коров (за 1,5–2 месяца до отела) против рота-, коронавирусной инфекции с целью повышения колострального иммунитета у новорожденных телят. Были сформированы 2 группы животных по 10 голов в каждой. Коровам подопытной группы помимо вакцины дополнительно вводили иммуномодулятор Гликопин. Животных контрольной группы вакцинировали без Гликопина. Вакцину вводили согласно наставлению одно-

кратно внутримышечно. Гликопин инъецировали одновременно с вакциной в дозе 3 мг в 2 мл растворителя внутримышечно. Из телят, полученных от вакцинированных коров, были сформированы 2 группы по 10 голов: контрольная – от коров, иммунизированных одной вакциной и опытная – от матерей, которым вводили вакцину с Гликопином.

Гликопин – ветеринарный лекарственный препарат, действующим веществом которого является N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (ГМДП), полученный по методике, которая включает прямую конденсацию синтетического дипептида с дисахаридом, выделенным из клеточной стенки *M. lysodeicticus*. Препарат синтезирован в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, испытан и доведен до применения в ветеринарии совместно с учеными ВИЭВ им. Я.Р.Коваленко. Гликопин, в первую очередь, воздействует на макрофаги, усиливая фагоцитоз микроорганизмов, повышая ферментативную и микробицидную активность. Помимо этого он усиливает синтез макрофагами цитокинов, участвующих в представлении антигена Т-лимфоциту, следствием чего является усиление синтеза антител к ряду антигенов [2, 4, 6].

Для определения уровня резистентности, в крови глубокоостельных коров (перед вакцинацией и на 21 сутки после вакцинации) и новорожденных телят (на 2 и 8 сутки жизни) исследовали бактерицидную активность, фагоцитарную активность клеток крови, активность лизоцима, относительное содержание Т- и В-лимфоцитов. Об эффективности иммунизации судили по количеству заболевших телят в опытной и контрольной группах, а также изучали содержание иммуноглобулинов классов М и G (IgM, IgG), титры антител к рота- и коронавирусам в сыворотке крови коров и титры антител в молозиве.

Бактерицидную активность в сыворотке крови определяли методом фотонейлометрии по О.В.Смирновой и Т.А.Кузьминой. Фагоцитарную активность клеток крови определяли микрометодом [3]. Определяли фагоцитарную активность (ФА) и фагоцитарное число (ФЧ). Исследование активности лизоцима проводили нефелометрическим методом (Дорофейчук В.Г., Каграманова К.А.). Идентификацию Т- и В-лимфоцитов проводили методом розеткообразования [3]. Количественное определение содержания иммуноглобулинов классов М и G (IgM, IgG) в испытуемых сыворотках крови животных проводили методом радиальной иммунодиффузии по G. Mancini. Титры антител к рота- и коронавирусам в сыворотке крови и молозиве определяли методом ИФА.

Результаты исследований

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1. Анализ результатов, представленных в таблице 1, показал, что одновременное введение Гликопина и вакцины "Ротавек Корона" глубокоостельным коровам способствовало активации показателей резистентности, клеточного и гуморального иммунитета. Так, у животных опытной группы уже на 21 сутки после вакцинации отмечено значительное повышение всех показателей по сравнению с исходными данными: бактерицидная, лизоцимная активность сыворотки крови и фагоцитарная активность лимфоцитов возросли на 29,8; 67,4; 24,9% соответственно, относительное содержание Т- лимфоцитов – на 7,1%, а В-лимфоцитов – на 10,5%. Уровень IgM увеличился на 42,1% и IgG – на 17,8%.

Результаты исследования сыворотки крови коров, иммунизированных одной вакциной, на наличие антител к рота- и коронавирусам показали, что на 21 сутки после вакцинации титр антител (ТА) был высоким 1:3200 и 1:6400 соответственно по сравнению с показателями ТА до вакцинации (1:200 и 1:400 соответственно), что свидетельствует о достаточной иммуногенности использованной вакцины. В сыворотке крови подопытных коров, вакцинированных совместно с Гликопином, ТА на 21 сутки после иммунизации по сравнению с контрольными животными был выше: к ротавирусу – в 7,2 раза, коронавирусу – в 3,6 раза.

В молозиве подопытных коров ТА к ротавирусу был 1:3200 – 1:6400 при ТА у животных контрольной группы 1:800 – 1:1600. ТА к коронавирусу в молозиве подопытных коров составил от 1:6400 до 1:25600, в то время, как в контроле он был на уровне 1:1600 – 1:3200. Показатели естественной резистентности в крови новорожденных телят опытной и контрольной групп находились на уровне физиологической нормы. В опытной группе не наблюдали телят с признаками диареи, в то время как в контрольной группе заболеваемость животных составила 40%.

Заключение

Анализ результатов проведенных исследований показал, что одновременное введение иммуномодулятора Гликопина с вакциной "Ротавек Корона" позволило повысить уровень резистентности глубоководных коров и выработку антител к рота-, коронавирусам в крови и молозиве подопытных животных. Это дало возможность обеспечить более высокий уровень защиты новорожденных телят от

рота-, коронавирусной инфекции посредством колострального иммунитета.

Список литературы.

1. Вавина О.В. состояние лимфоидных органов у телят, обусловленное содержанием и кормлением коров-матерей / О.В.Вавина, А.И.Молев, В.И.Великанов // Ветеринарная патология. - 2006. - № 1. - С. 44 - 47.

2. Иванов В.Т. Ликопид (глюкозаминилмурамилдипептид) - новый отечественный высокоэффективный иммуномодулятор для лечения и профилактики заболеваний, связанных со вторичной иммунологической недостаточностью / В.Т. Иванов, Р.М. Хаитов, Т.М. Андропова, Б.В. Пинегин // Иммунология. - 1996. - № 2. - С. 4 - 6.

3. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии : справочное издание / И.П. Кондрахин, Н.В.Курилов, А.Г.Малахов [и др.]. - Москва: Агропромиздат, 1985. - 287 с.

4. Манько В.М. Экспериментальное изучение иммуномодулирующего действия глюкозаминил-мурамил-дипептида (ГМДП). Влияние ГМДП на макрофагальное звено иммунного ответа, активацию Т- и В-лимфоцитов и их кооперативное взаимодействие / В.М. Манько, В.Ю. Скворцов, Т.Б. Мастернак [и др.] // Иммунология. - 1989. - № 2. - С. 23 - 26.

5. Сергеев В.А. Вирусы и вирусные вакцины / В.А. Сергеев, Е.А.Непоклонов, Т.И.Алипер. - Москва : Библионика, 2007. - 524 с.

6. Andronova T. The structure and Immunological function of glucosaminylmuramyl peptides / T. Andronova, V.T. Ivanov // Sov. Medical Reviews. D. Immunology (Harwood Academic Publishers). - 1991. - Vol. 4. - P. 1 ? 63.

Таблица 1. Изменение иммунобиологических показателей крови у глубоководных коров до и через 21 день после вакцинации (n = 10; M ± m; p ≤ 0,05)

Показатель	Характеристика группы	До вакцинации	На 21 сутки после вакцинации	% увеличения
Бактерицидная активность сыворотки крови (%)	Опыт	49,7 ± 3,5	64,5 ± 4,2	29,78
	Контроль	48,9 ± 1,4	52,6 ± 1,8	7,6
Активность лизоцима сыворотки крови (%)	Опыт	9,2 ± 1,5	15,4 ± 1,5	67,4
	Контроль	8,2 ± 0,8	9,9 ± 1,7	20,7
Фагоцитарная активность (ФА) лейкоцитов (%)	Опыт	42,5 ± 1,1	53,1 ± 2,1	24,9
	Контроль	42,4 ± 1,8	44,1 ± 1,7	4,1
Фагоцитарное число (ФЧ) (м.к.)	Опыт	4,0 ± 0,8	6,9 ± 1,1	72,5
	Контроль	3,7 ± 0,4	4,4 ± 0,5	18,9
Т-лимфоциты (относит. %)	Опыт	40,7 ± 0,62	43,6 ± 0,63	7,1
	Контроль	40,6 ± 0,23	41,4 ± 0,61	1,9
В-лимфоциты (относит. %)	Опыт	21,0 ± 0,61	23,2 ± 0,33	10,5
	Контроль	20,2 ± 0,49	20,2 ± 0,62	4,9
Ig M (мг/мл)	Опыт	1,9 ± 0,15	2,7 ± 0,26	42,1
	Контроль	1,9 ± 0,12	2,3 ± 0,12	21,0
Ig G (мг/мл)	Опыт	21,3 ± 2,14	25,1 ± 2,26	17,8
	Контроль	20,6 ± 0,48	22,6 ± 0,68	9,7

УДК 619:616.98:578.8352:616-085.371:636.33/38

Влияние прививочной дозы сорбированной и эмульсионной противоящурных вакцин на формирование гуморального иммунитета у овец

Шарыпов А.С. – аспирант, e-mail: sharipov@arriah.ru; Лозовой Д.А. – кандидат ветеринарных наук, директор ФГБУ "ВНИИЗЖ"

ФГБУ "Федеральный центр охраны здоровья животных" (ВНИИЗЖ), 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьево; тел. (4922) 26-06-14, тел/факс 26-15-73

Аннотация. Изучено влияние прививочной дозы сорбированной и эмульсионной вакцин на уровень гуморального иммунитета у овец. В результате проведенных исследований установлено, что одновременное введение двукратной дозы сорбированной или эмульсионной вакцин увеличивает титры вируснейтрализующих антител, что способствует формированию быстрого и напряженного иммунитета.

Ключевые слова: ящур, вакцина, гуморальный иммунитет, овцы.

Influence of FMD sorbate and emulsion vaccine inoculation doses on humoral immunity development in sheep

Sharipov A.S., Lozovoy D.A.

The effect of the vaccine dose sorbed and emulsion vaccines to the level of humoral immunity in sheep. The studies found that the introduction of a one-time double dosage adsorbed or

emulsion vaccines increases titers of neutralizing antibodies, which contributes to a rapid and intense immunity.

Key words: FMD, vaccines, humoral immunity, sheep.

Ящур является одной из экономически значимых болезней животных в мире, так как им болеют: крупный рогатый скот (КРС), свиньи, овцы и козы (МРС) и т.д. Наряду с непосредственными убытками, причиненными заболеванием, ущерб складывается из введения торговых ограничений, которые относятся как к живым, так и к продуктам животного происхождения [1,2,5]. Для усиления иммунного ответа в противоящурных вакцинах применяют адъюванты. Для сорбированных вакцин в качестве адъюванта используют гель гидроксида алюминия (ГОА) и сапонин, а для эмульсионных – масляные.

Применение адъювантов в вакцинах необходимо для получения защитного уровня вируснейтрализующих антител (ВНА) в организме животного. Уровень антител и защита, создаваемая вакцинами, содержащими адъюванты, достоверно превышает уровень антител и, соответственно, защиту животного, создаваемую вакцинами, не содержащими адъювантов, при введении одних аналогичных введенных антигенов [1]. Однако, наряду с положительными свойствами, адъюванты обладают и отрицательными действиями: усиливают аллергические реакции, вызывают абсцессы, повышение температуры тела, болезненные ощущения в точке инъекции. Особенно ярко выражена реакция организма на введение вакцин с масляным адъювантом.

Разные виды животных по-разному реагируют на введение противоящурных вакцин с различными адъювантами. Чрезмерная реакция в точке инъекции не позволяет эффективно реализовать роль специфического антигена. Общеизвестно, что введения животному увеличенного количества антигена ведет к более раннему и напряженному иммунитету. Особенно это важно при возникновении забо-

Таблица 1

№ группы	Температура °С, дни после вакцинации											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	38,6	38,8	39,5	39,5	39,1	38,5	39,0	38,6	38,5	38,6	38,7	38,7
	38,6	39,0	39,5	39,6	39,0	39,1	38,5	39,0	38,5	38,6	38,6	38,5
	38,5	38,6	39,1	39,3	38,6	39,0	39,0	38,5	38,5	38,3	38,5	39,0
2	38,7	39,4	39,8	39,8	39,5	39,2	39,5	38,5	39,3	39,0	39,1	38,7
	38,5	39,8	39,9	39,7	39,5	38,7	38,7	39,4	39,0	39,1	38,5	38,2
	38,0	39,7	39,9	39,8	39,5	39,1	39,0	39,0	39,0	38,6	38,1	38,6
3	38,1	38,5	39,8	39,5	38,6	38,5	38,3	39,4	38,5	38,5	38,3	38,6
	38,4	39,0	39,5	39,0	39,0	38,8	38,4	38,5	38,4	38,5	39,0	39,0
	38,7	39,0	39,8	39,6	39,5	38,9	38,5	38,7	38,7	38,7	38,5	38,7
4	38,4	39,7	40,0	39,5	40,0	39,5	38,7	39,6	39,0	39,2	39,2	38,5
	38,6	39,8	40,3	40,5	40,0	39,7	39,7	39,6	38,7	39,0	39,1	38,6
	38,8	39,9	40,5	39,5	39,5	38,7	39,0	39,0	38,9	38,5	38,5	38,3

левания, когда в кратчайшие сроки организм должен формировать защиту против изолята, вызвавшего вспышку. Усиление защиты мы можем добиться или ревакцинацией (однако, это потеря времени) или увеличением прививной дозы (более оптимальное решение).

Целью наших исследований было изучить влияние прививной дозы на формирование гуморального иммунитета и определения реакции организма на введение препаратов.

Материалы и методы

1. Сорбированная бивалентная вакцина типов А, О, содержащая в прививной дозе 2 см³ по 6 мкг иммуногенных компонентов (146S+75S) каждого типа, 21 мг ГОА и 1,5 мг сапонина.

2. Эмульсионная бивалентная вакцина типов А, О, содержащая в прививном объеме 2 см³ по 6 мкг иммуногенных компонентов (146S+75S) каждого типа, 1 см³ адьюванта ISA-206, тип эмульсии (вода/масло/вода)

3. Двенадцать овец "Романовской" породы, 11 месячного возраста.

4. Первично-трипсинизированная культура клеток свиной почки (СП)

5. Культуральный вирус ящура типов А и О.

6. Термометр бесконтактный инфракрасный.

Животных разделили на 4 группы по 3 головы.

Первую группу из 3-х овец привили подкожно в дозе 1 см³ сорбированной вакциной с сапонином.

Вторую группу из 3-х овец иммунизировали подкожно сорбированной вакциной в дозе 2 см³.

Третью группу из 3-х овец привили эмульсионной вакциной в дозе 1 см³ внутримышечно.

Четвертую группу из 3-х овец вакцинировали внутримышечно эмульсионной вакциной в дозе 2 см³.

Кровь отбирали через 15 и 30 суток после вакцинации. Титры вируснейтрализующих антител определяли по общепринятой методике в реакции нейтрализации на первично-трипсинизированной культуре клеток свиной почки (СП) [4].

Температуру тела животных измеряли до вакцинации и в течение 11 дней после иммунизации, при помощи бесконтактного инфракрасного термометра. На введение препарата могут развиваться местные и общие реакции. Для выяснения воздействия препаратов на организм животных в течение 11 дней измеряли температуру тела. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Из данных таблицы №1 видно, что среднее значение температуры тела за 11 дней измерения по 1-ой группе составило – 38,8 °С, по 2-ой – 39,2 °С, по 3-ей – 38,8 °С, по 4-ой – 39,4 °С. По сравнению с исходной средней температурой увеличение составило по 1-ой – 0,2 °С, по 2-ой – 0,8 °С, по 3-ей – 0,2 °С, по 4-ой – 0,8 °С.

Повышение температуры тела было заметным при инъекции двукратной дозы как на сорбированную, так и эмульсионную вакцины, хотя и не выходило за пределы физиологической нормы. Через 30 суток после вакцинации провели патологоанатомический осмотр животных. В местах инъекции сорбированной вакцины с сапонином в дозе 1 см³ уплотнений не обнаружили, в месте введения 2 см³ наблюдали небольшие уплотнения. Инъекции эмульсионной вакцины сопровождались болезненными ощущениями, особенно при введении 2 см³. При патологоанатомическом вскрытии в месте инъекции обнаружили олеогранулемы размером 1,5х2,5 см.

Результаты и обсуждение

Любая вакцина обладает определенной степенью реактогенности. Вакцины могут оказать побочное действие на функцию многих органов и систем. [3] На введение препарата могут развиваться местные и общие реакции. Местные развиваются в местах введения и выражаются в болезненности, гиперемии и отеке. К общим реакциям относятся: повышение температуры тела, потеря аппетита, угнетенное состояние. Побочные действия могут быть обусловлены содержащимися в вакцине

примесями и компонентами входящими в состав препарата, а общий побочный эффект складывается из различных видов биологического действия компонентов.

Как видно из данных таблицы №2 с увеличением прививной дозы в 2 раза титры ВНА в крови иммунизированных животных увеличились для сорбированной вакцины на 0,58–0,67 log₂ через 15 суток на 0,67 log₂ через 30 суток.

Для эмульсионной вакцины титры ВНА увеличились на 0,58–1,11 log₂ через 15 суток и 0,42–0,50 log₂ через 30 суток. Уровень гуморального иммунитета на введение эмульсионной вакцины были выше, чем после инъекции сорбированного препарата, как через 15 суток, так и через 30 суток после вакцинации.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что вакцинация овец удвоенной дозой сорбированной и эмульсионной вакцин увеличивает титры вируснейтрализующих антител. Титры ВНА у животных после инъекции эмульсионной вакцины значительно выше, чем после вакцинации сорбированной с сапонином через 15 и 30 суток.

При вспышке ящура можно рекомендовать в очаге и неблагополучном пункте использовать для вакцинации двукратную дозу вакцины, для формирования быстрого и напряженного иммунитета, а не ревакцинацию через 10–20 дней, как указано в инструкции по применению.

Список литературы.

- Бурдов А.Н., Дудников А.И., Малярец П.В. и др.: // Ящур под ред. Бурдова А.Н. - М.: Агропромиздат, 1990. - 319 с.
- Авилов В.М., Байбиков Т.З., Герасимов В.Н. и др. Обострение эпизоотической ситуации по ящуру в Азии // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзот. и зооантропоноз. болезнями животных. - Покров, 2000. - С. 47-49.
- Медуницын Н.В. Вакцинология. - М., Триада-Х., 2004.
- Методические указания по постановке реакции нейтрализации, для определения статуса животных при ящуре. - М., 1983.
- Захаров В.М., Рахманов А.М., Фомина Т.А. и др. Результаты эпизоотологического и серологического мониторинга по ящуру в России- Ставрополь, 2003, - С. 313-317.

Таблица 2. Титры ВНА у овец, вакцинированных сорбированной и эмульсионной вакцинами.

№ группы	№ животных	Титры антител против вируса ящура тип, log ₂			
		15 суток		30 суток	
		А	О	А	О
1	1	3,0	3,25	4,0	4,5
	2	3,5	3,5	4,25	4,5
	3	4,0	3,75	4,0	4,0
	M±m	3,5±0,29	3,5±0,14	4,08±0,08	4,33±0,17
2	4	4,0	3,75	4,5	4,0
	5	4,0	4,0	5,0	5,0
	6	4,5	4,5	4,75	4,75
	M±m	4,17±0,17	4,08±0,22	4,75±0,14	4,58±0,30
3	7	5,5	5,75	6,5	6,5
	8	5,5	5,5	6,75	6,75
	9	5,25	5,75	7,0	7,0
	M±m	5,42±0,08	5,7±0,08	6,75±0,14	6,75±0,14
4	10	6,5	6,0	7,0	7,25
	11	6,0	6,75	7,5	7,5
	12	6,5	6,0	7,0	7,0
	M±m	6,3±0,17	6,25±0,25	7,17±0,17	7,25±0,14

УДК 619:616.98:579.869.2

Вопросы лечения и профилактики рожи свиней

Школьников Е. Э., кандидат ветеринарных наук, заведующий отделом бактериальных препаратов ФГБНУ ВНИТИБП;

Глушенкова Ю. А., аспирант отдела бактериальных препаратов ФГБНУ ВНИТИБП;

Гринь С. А., доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по бионанотехнологии;

Коротеева Л. А., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела бактериальных препаратов ФГБНУ ВНИТИБП.

Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности. 141142, Московская область, Щёлковский р-н, пос. Биокомбината. Тел: +7 (496) 567-32-63.

В статье изложены материалы исследований по разработке технологии получения лечебной сыворотки против рожи свиней. Проведены работы по изготовлению питательных сред для культивирования антигенных штаммов эризипелотрикс. Отработана схема гипериммунизации с использованием в качестве доноров сыворотки волов-продуцентов. Полученная гипериммунная сыворотка в контроле и при её применении в ветеринарной практике показала свою эффективность.

Ключевые слова: рожа свиней, сыворотка, гипериммунизация, волю-продуценты.

Questions about treatment and prevention of swine erysipelas

Shkolnikov E.E. Glushenkova U.A. Grin S. A. Koroteeva L.A.

The article presents materials about of researches on development of technology of receiving medical serum against an erysipelas of pigs. Works on manufacture of mediums for cultivation of antigenic strains of Erysipelotriks are carried out. The scheme of hyper immunization with use as donors of serum of oxen producers is fulfilled. The received hyperimmune serum in monitoring and at its application in veterinary practice showed the effectiveness.

Key words: erysipelas, serum, obtained by hyperimmunization, oxen-producers.

В последние годы одной из актуальных проблем патологии свиней являются инфекционные заболевания, среди которых значительное место занимает рожа [1]. Рожа свиней – остро и подостро протекающая инфекционная болезнь, возбудителем которой являются патогенные сероварианты *Erysipelotrix zhusiopathiae*. Широкое распространение заболевания, особенно в хозяйствах промышленного типа, обусловлено высокой концентрацией животных на ограниченной территории, невыполнением ветеринарных санитарных норм на свинофермах, отсутствием эффективных мер борьбы с данной болезнью. Экономический ущерб складывается из убытка от падежа, вынужденного убоя свиней и расходов, связанных с введением ограничений, лечением и массовой иммунизацией животных.

Возбудитель *Erysipelotrix zhusiopathiae* (*E. zhusiopathiae*) относится к убикварным (повсеместно встречающимся) микроорганизмам. Он обнаружен в организме клинически здоровых свиней (в миндалинах, кишечнике, желчном пузыре), у грызунов и насекомых, клещей, рыб, выделен из различных гниющих органических субстратов: речного ила, городских сточных вод и т.д.

Рожа относится к природно-очаговым болезням, что связано с высокой устойчивостью возбудителя во внешней среде и его циркуляцией в природе, обеспечивающих постоянство резервуара возбудителя инфекции [5]. В случае

латентной формы бактерии рожи локализуются в миндалинах и кишечных фолликулах и при стрессе, особенно под влиянием высокой температуры и недостатке в рационе минеральных веществ и витаминов на фоне избытка белка могут вызывать клинические проявления болезни. В результате эпизоотические вспышки рожи в хозяйствах чаще возникают эндогенно, без заноса возбудителя извне.

В настоящее время биологическая промышленность страны выпускает вполне эффективные вакцинные препараты [4, 11]. Для пассивной иммунизации применяют гипериммунную сыворотку, полученную от животных-доноров [3]. Промышленное производство гипериммунной лечебной сыворотки уже долгие годы было организовано на предприятиях биологической промышленности. Объем выпускаемой противорожистой сыворотки удовлетворял потребностям ветеринарных специалистов и частных пользователей [7]. Выпускаемая сыворотка готовилась с использованием свиней-доноров в качестве продуцентов. Однако во второй половине XX века заготовка и использование свиней для указанных целей стала затруднительной и экономически чрезмерно затратной. Изыскание другой модели для использования в качестве доноров-продуцентов лечебных сывороток привело исследователей к необходимости попытаться использовать крупный рогатый скот (волы) [2, 8, 9].

Материалы и методы

В экспериментальных исследованиях при приготовлении антигена использовали аттенуированные штаммы бактерий рожи свиней, питательные среды, реактивы, бактериологические, серологические и другие методы исследований для изготовления и контроля опытных образцов противорожистой сыворотки. Разработке и совершенствованию были подвергнуты технологические процессы изготовления гидролизатных питательных сред [10, 15], процессы глубинного культивирования бактерий рожи свиней [12], а также отработки схемы гипериммунизации и производственной эксплуатации волов-доноров с обязательным контролем активности сывороток. В работе использовали аттенуированные штаммы бактерий рожи №№ 1689 и 1329 серотипа А и № 1933 серотипа В, а также контрольный штамм № 149. Все эти штаммы бактерий рожи свиней в лиофилизированном виде с соответствующими паспортами комиссионно проконтролированы по культурально-морфологическим и биохимическим показателям, концентрации, жизнеспособности и вирулентности микроорганизмов [6].

Результаты исследований

Культивирование штаммов рожистых бактерий для получения антигенов

Штаммы бактерий рожи свиней, используемые для получения антигенов [13] культивировали стационарным способом в стеклянных баллонах объемом 16 литров. Для культивирования были приготовлены питательные среды на основе перевара Хоттингера с содержанием аминного азота 150–160 мг%.

Посевной материал в объеме 5–10% вносили в питательную среду и выращивали бактерии при температуре (36,5±0,5) °С в течение 10–24 часов периодически перемешивая.

Чистые культуры рожистых бактерий штаммов № 1689, 1329, 1933 засеивали из флаконов (каждую культуру отдельно) в 5-ти литровые бутылки с 2,5–3 л питательной среды с добавлением 40–50 мл матровой расплодки. Культивирование при температуре (36,5±0,5) °С проводили в течение 24 часов в термостате.

Морфологически чистые культуры из 5-ти литровых бутылей засеивали в 16-ти литровые баллоны с 10–12 литрами питательной среды из расчета 5–10% матровой расплодки к объему среды. Содержимое баллонов после засева тщательно перемешивали и в термостате культивировали 24 часа при температуре (36,5±0,5) °С.

Полученные культуры объединяли в равных объемах и контролировали на стерильность. Концентрацию микробных клеток в полученном антигене должна быть не менее

500 млн/см³. Приготовленный антиген использовали для иммунизации волов-продуцентов в течение 10 дней при условии хранения при температуре (6±2)°С.

Гипериммунизация волов-продуцентов. Рожистый антиген волам-продуцентам вводят подкожно в область шеи, а при гипериммунизации при больших дозировках антиген вводят внутримышечно в разные места верхней части туловища, но не ближе заднего края лопатки. Повышение доз антигена, так же как в интервал между инъекциями, может колебаться в зависимости от общей и местной реакции у животных в течение от 4 до 5 дней. Каждую последующую инъекцию антигена проводят после снижения температуры у животного-донора до нормальной.

Гипериммунизация волов-продуцентов живой массы до 500 кг проводят возрастающими дозами антигена, начиная с 10 см³ и заканчивая к 10-ой инъекции 250 см³ с интервалом 4–5 дней [14]. В случае получения недостаточной активности сыворотки, полученной после десяти инъекций, дополнительно проводят 2 инъекции по 300 см³ антигена. Животных, давших активную сыворотку после 10 или 12 инъекций, допускают к эксплуатации. Контроль опытных образцов гипериммунной сыворотки, приведенный по существующей методике, показал ее пригодность в ветеринарии при лечении рожистых заболеваний у свиней.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что при использовании волов в качестве продуцентов, возможно получить высокоактивную противорожистую сыворотку.

Анализ полученных результатов позволил предложить схему гипериммунизации, которая в отличие от существующей более проста в использовании и менее трудоемка:

- 1) Сокращено количество инъекций с 25 до 10–12;
- 2) Сокращена длительность цикла гипериммунизации на 40–50 дней;
- 3) Антиген вводится в малых объемах, 20 мл вместо 400–500 мл;
- 4) Исключены внутривенные инъекции антигена, которые нередко являются причиной аллергических реакций у продуцентов.

Предложенная схема апробирована в производственных условиях на Армавирской биофабрике.

Список литературы

1. Активность сыворотки волов, гипериммунизированных комплексными антигенами эшерихий // Тр. ВГНКИ - М. 1987. - Т. 27-с. 74-80.

2. Шабейкин, А.А. Эпизоотологические геоинформационные системы. Возможности и перспективы // Ветеринария. - 2016. - №7. - С. 21-24.

3. Кадыров С.О. Технология получения моноспецифических антисывороток к иммуноглобулинам животных. // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко. 1988. Т. 66. С. 41-46.

4. Лощинин М.Н. Вакцина против сальмонеллеза свиней, способ изготовления, способ профилактики сальмонеллеза свиней. // патент на изобретение RUS 2470663 19.09.2011

5. Медведев А.П. Противобактериальные лечебно-профилактические сыворотки. - Витебск: УО ВГАВМ, 2007. - 295с.

6. Панин А.Н., Душук Р.В., Состояние и перспективы профилактики рожистой инфекции: Состояние проблемы и перспективы развития ветеринарных наук в России. - М. 1999, Т. 1.

7. Рубан Е.А. Промышленная технология производства противобактериальных препаратов /Е.А.Рубан, Н.В. Мельник, Е.А. Непоклонов и др.: под ред. А.Я. Самуйленко. - М.: ИКЦ "Академкнига", 2006 - 267с.

8. Русанов В.М., Левин И.В. Лечебные препараты крови. - М.: ИД "Медпрактика", - 2004. - 284с.

9. Самуйленко А.Я., Рубан Е.А. Основы биотехнологии производства биологических препаратов. - 2000. - 376с.

10. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение. - М.: 2000. - 295с.

11. Третьякова И.В. Оценка иммуномодулирующей активности вакцин против рожи свиней (BP-2) в процессе иммуногенеза // Тр. ВИЭВ. - 2003. - Т. 73. - С. 200-204.

12. Федоров Ю.Н., Лихотина Н.А. Иммуитет у подсвинок после введения иммунной сыворотки против рожи: Сб. науч. Тр. ВИЭВ. - 1977. Т. 45. - С. 78-81.

13. Школьников Е.Э., Коломина П.Ф. и др. Антиген для иммунизации животных-продуцентов при производстве сыворотки против рожи свиней: тез. Докл. Всерос. Науч. Конф. "Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов". - Щёлково, 2000. - С. 181-183.

14. Школьников Е.Э., Коломина П.Ф. и др. Разработка схемы гипериммунизации волов-продуцентов для изготовления сыворотки против рожи свиней: тез. Докл. Всерос. Науч. Конф. "Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов". - Щёлково, 2000. - С. 184-185.

15. Школьников Е.Э., Самуйленко А.Я., Еремец В.И. Усовершенствование питательной среды и условий культивирования бактерий рожи свиней. Междунар. науч.-практич. конф. - Покров, 2000. - с. 251-252.

УДК 619:616-002.5:616.9-092.9:577.112.083

Функционирование и серологическая активность экстракта клеток и продуктов экспрессии *Mycobacterium bovis*

Шуралев Э.А., Хаертынов К.С., Валеева А.Р., Александрова Н.М., Мукминов М.Н.

Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Казань;

ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет,

г. Казань;

ФГБНУ "Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности", г. Казань

Аннотация. Целью данной работы было определение серологической активности различных антигенных фракций, полученных из штамма *M.bovis* Bovinus-8 методом иммуноблота. Исследованию подвергали экстракт клеток микобактерий и выделенные продукты экспрессии из супернатанта жидкой питательной среды после 3-х месячно-

го культивирования. Серологическую активность антигенов изучали в реакции иммуноблот с гипериммунной сывороткой крови кроликов.

Получены антигены из экстракта клеток с широким спектром структурных компонентов, распределяющимся в диапазоне молекулярных масс от 200 до 6,5 кДа, и продукты экспрессии культивируемых микобактерий *M.bovis* с диапазоном от 200 до 16,1 кДа. В результате поведенных исследований выявлено, что антигенные препараты как из экстракта клеток *M.bovis* Bovinus-8, так и их секреторные продукты, охватывают широкий спектр диагностически значимых антигенов, что в свою очередь не допускает проявления ложных отрицательных результатов при оценке специфического гуморального противотуберкулезного иммунитета. По результатам иммуноблота серологическую активность с гипериммунной сывороткой крови проявили фракции антигена, полученные из жидкой культуральной среды после культивирования *M.bovis* Bovinus-8 (продукты экспрессии), с молекулярными массами 50,5, 29,4, 22,4 и 20,6 кДа, а также фракции антигена из экстракта клеток в диапазоне от 82,3 до 6,5 кДа.

Ключевые слова: туберкулез, антигены, электрофорез, иммуноблот.

Fractionation and serological activity of *Mycobacterium bovis* cell extract and secondary metabolites

Shuralev E.A., Khaertynov K.S., Valeeva A.R., Aleksandrova N.M., Mukminov M.N.

The aim of this work was to determine the serological activity of various fractions of the strain *M. bovis* Bovinus-8 using the method of immunoblot. The extract of mycobacteria cells and their expression products isolated from the supernatant were used as antigens for serological studies. Serological activity of the antigen was studied in the reaction of immunoblotting with rabbit hyperimmune serum.

Antigens from the cell extracts with a wide range of structural components that span a range of molecular masses from 200 to 6.5 kDa, and expression products of mycobacteria *M. bovis* ranges from 200 to 16.1 kDa were isolated. It was found that the range of preparations obtained from cell extracts of *M. bovis* Bovinus-8 and their expression products covers the range of diagnostically relevant antigens, which prevents obtaining false-negative results in the evaluation of specific humoral immunity at the tuberculosis pathogenesis. The fractions of the antigens obtained from expression products of *M. bovis* Bovinus-8, with a molecular mass of 50.5, 29.4, 22.4 and 20.6 kDa, and antigenic material from the cell extracts which were active in the range from 82.3 to 6.5 kDa interacted with the positive hyperimmune serum.

Key words: tuberculosis, antigens, electrophoresis, immunoblot.

Иммунологические методы в диагностике инфекционных заболеваний требуют использования биомаркеров с высокой чувствительностью и специфичностью. Проведение научных исследований в области протеомики и иммуномики туберкулеза создает предпосылки создания эффективных средств диагностики этого заболевания [1–3], а посредством мультиантигенного подхода усиливается их чувствительность и специфичность [4,5]. Динамика антителобразования имеет свои особенности, что проявляется в синтезе специфических антител к определенным микобактериальным антигенам в зависимости от стадии развития туберкулезного инфекционного процесса [6–8]. В связи с этим особое внимание уделяется к получению и синтезу антигенов, наличие которых максимально отражает все стадии развития заболевания [9–11].

Целью данной работы было определение серологической активности различных фракций штамма *M. bovis* Bovinus-8 методом иммуноблота.

Материалы и методы

Суспензию клеток *M. bovis* Bovinus-8 смешивали с неполным адьювантом Фрейнда из расчета: 0,5 мл концентрированной суспензии клеток микобактерий, содержащей

10 ЕД микробных тел/мл, 1 мл стерильного физиологического раствора и 1,5 мл адьюванта. Для получения активных, специфичных и высокоаффинных сывороток кроликов массой 2,5–3 кг, которых иммунизировали внутрикожно многократно вдоль спины (по 5 точек с каждой стороны). В каждую точку вводили по 0,1 мл подготовленного антигенного материала (суспензия клеток *M. bovis* Bovinus-8). Через 8–10 недель после первого цикла проводили бустер инъекцию путем подкожного введения суспензии клеток в нижнюю треть шеи с обеих сторон по 0,5 мл. На 10 сут после повторного введения суспензии клеток осуществляли тотальный забор крови с последующим отделением гипериммунной сыворотки.

Исследованию подвергали экстракт клеток микобактерий и выделенные из жидкости культуральной среды продукты экспрессии (секреторные антигены). Отмытые клетки от остатков питательной среды разрушали на приборе Fast Prep-24 (MP Biomedicals) с использованием пробирок Blue Lising Matrix (Tube 2,0 мл) (MP Biomedicals). Белковый спектр возбудителя изучали методом электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим окрашиванием кумасси ярко-синим и азотнокислым серебром.

Серологическую активность указанных фракций антигенного материала определяли методом иммуноблота [12]. С этой целью проводили перенос материала, полученного в результате фракционирования в полиакриламидном геле, на нитроцеллюлозную мембрану (Supported nitrocellulose membrane 0,45 μm). Результаты электрофореза и иммуноблота обрабатывали и визуализировали на приборе GelDoc XR+ Sistem (BioRad), с последующей их обработкой с использованием программы Image Lab версия 5.1.

Результаты и обсуждение

Активность иммунных сывороток оказывает существенное влияние на результат серологических реакций. Уровень специфических антител зависит от множества факторов: качества и количества вводимого антигена, способа и кратности введения, применения вспомогательных веществ. Подбор адекватной схемы иммунизации позволяет в короткие сроки получить сыворотки с высоким титром антител. Иммунный ответ на каждый индивидуальный антиген специфичен. При этом прослеживается зависимость антителогенеза от дозы вводимого антигена, кратности и способа введения.

У кроликов, подвергнутых гипериммунизации, в местах введения суспензии культуры *M. bovis* Bovinus-8 наблюдали воспалительную реакцию. При внутрикожной иммунизации в местах введения образовывался инфильтрат, отек, гиперемия с центральной зоной ишемии, далее переходящей в некроз. Через 7 недель отмечалась нормализация процесса. При подкожном введении наблюдалось увеличение регионарных лимфатических узлов.

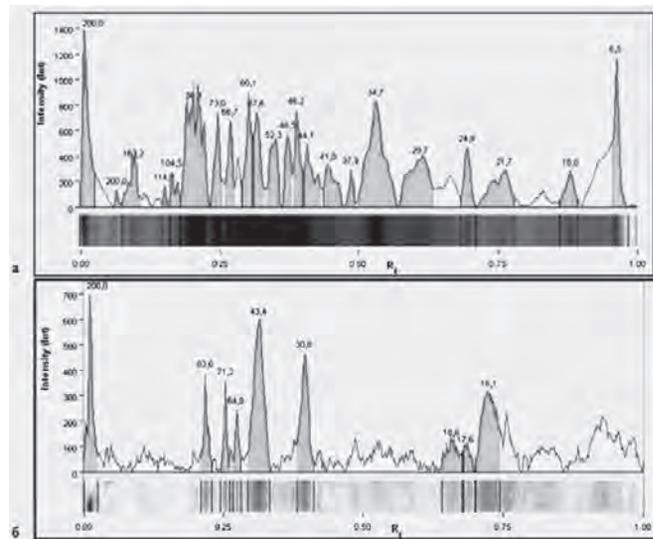


Рис. 1. Денситограмма электрофореза антигенного материала в 12,5%-ном полиакриламидном геле: а – экстракт клеток *M. bovis* Bovinus-8; б – продукты экспрессии культивируемых клеток *M. bovis* Bovinus-8.

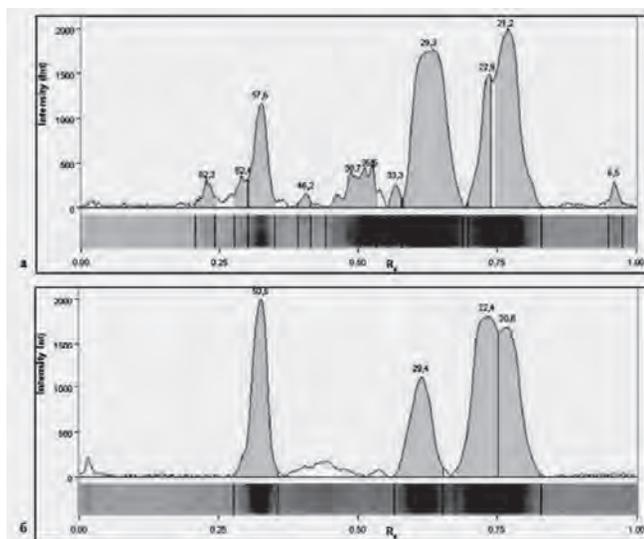


Рис. 2. Денситограмма иммуноблота с гипериммунной кроличьей сывороткой крови против *M. bovis*: а – экстракт клеток *M. bovis* Bovinus-8; б – продукты экспрессии культивируемых клеток *M. bovis* Bovinus-8.

В ходе проведения фракционирования методом электрофореза был выявлен широкий спектр структурных компонентов *M. bovis* Bovinus-8, который распределялся в диапазоне с молекулярной массой от 200 до 6,5 кДа для экстракта клеток и от 200 до 16,1 кДа для продуктов экспрессии (рис. 1). Полученные результаты указывают на широкий спектр выявленных потенциальных антигенов как клеточной стенки, так и секретируемых *M. bovis* Bovinus-8 продуктов.

При анализе серологической активности полученных фракций в иммуноблоте выявили несоответствие с результатами аналитического электрофореза. С гипериммунной сывороткой реагировали положительно не все фракции. Так, фракции антигенов из экстракта клеток проявляли активность в зоне от 82,3 до 6,5 кДа, а фракции, полученные из жидкой культуральной среды (продукты экспрессии), имели молекулярную массу 50,5, 29,4, 22,4 и 20,6 кДа (рис. 2).

Полученные результаты позволяют предположить, что, вероятнее всего, антигенной активностью обладают липидные структуры, а не белковые. В этом заключается особенность строения микобактериальной клеточной стенки. Однако спектр полученных препаратов охватывает комплекс диагностически значимых антигенов, что исключает получение ложноотрицательных результатов при использовании этих антигенов для оценки специфического гуморального иммунитета при туберкулезе.

Заключение

Получены антигены из экстракта клеток с широким спектром структурных компонентов, распределяющимся в диапазоне с молекулярной массой от 200 до 6,5 кДа, и продукты экспрессии микобактерий *M. bovis* – от 200 до 16,1 кДа. Проведенными исследованиями выявлено, что антигенные препараты как из экстракта клеток *M. bovis* Bovinus-8, так и их секреторных компонентов, охватывает широкий спектр диагностически значимых антигенов, что в свою очередь не допускает проявления ложных отрицательных результатов при оценке специфического гуморального туберкулезного иммунитета. Серологическую активность с гипериммунной сывороткой крови, полученной против *M. bovis* Bovinus-8, проявили фракции антигена, полученного из жидкой питательной среды (продукты экспрессии) в течение 3 месячного культивирования *M. bovis* Bovinus-8 с молекулярными массами в диапазоне убывания 50,5, 29,4, 22,4 и 20,6 кДа, а также антигенный материал из экстракта клеток, который проявил активность в диапазоне от 82,3 до 6,5 кДа.

Список литературы

1. Гулюкин А.М., Хисматуллина Н.А., Хаертынов К.С. и др. Использование антигенов микобактерий *M. bovis* BCG-1, *M. bovis*-8 и *M. bovis* Valee-88 для иммуноферментного анализа сывороток крови крупного рогатого скота // Труды

Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко. - 2013. - Т. 77. - С. 200-203.

2. Цибульский А.П., Хаертынова И.М., Уразов Н.Г., Хаертынов К.С. Скрининг диагностического потенциала нативных белковых фракций *Mycobacterium tuberculosis* методом иммуноблоттинга // Клиническая лабораторная диагностика. - 2016. - Т. 61, № 2. - С. 90-102.

3. Сотников Д.В., Жердев А.В., Авдиенко В.Г., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографическая серодиагностика туберкулеза с использованием конъюгата коллоидное золото-антиген // Биотехнология. - 2015. - № 2. - С. 76-81.

4. Шуралев Э.А. Сравнительный анализ тест-систем для диагностики туберкулеза у альпак // Ветеринарный врач. - 2012. - № 5. - С. 30-33.

5. Шуралев Э.А., Ндаишимийе Э.В., Мукминов М.Н. К вопросу серологической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2012. - Т. 211. - С. 202-206.

6. Шуралев Э.А., Мукминов М.Н., Велан К., Кларк Д. Выявление специфических антител у вапиту при туберкулезе // Ветеринария. - 2013. - № 8. - С. 54-57.

7. Шуралев Э.А. Образование антител у северного оленя, инфицированного *Mycobacterium bovis* // Ветеринария. - 2016. - № 9. - С. 18-20.

8. Валиев Р.Ш., Валиев Н.Р., Хаертынова И.М., Хаертынов К.С. Анти-ТБ антитела класса IgG в сыворотке крови больных туберкулезом, ВИЧ-инфекцией и при их сочетании // Туберкулез и болезни легких. - 2014. - Т. 91, № 9. - С. 14-15.

9. Хисматуллина Н.А., Хаертынов К.С., Шуралев Э.А., Гулюкин А.М., Ахмадеев Р.М., Найманов А.Х. Получение антигенов микобактерий *M. bovis* BCG-1, *M. bovis*-8 и *M. bovis* Valee для дифференциации поствакцинальных и постинфекционных антител // Ветеринарна медицина. - 2013. - № 97. - С. 558-560.

10. Шуралев Э.А. Микобактериальные антигены: синтетические пептиды и рекомбинантные белки // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2013. - Т. 216. - С. 403-407.

11. Дятлова В.И., Богун А.Г., Бикетов С.Ф. Оценка серодиагностического потенциала рекомбинантных антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, полученных в разных экспрессионных системах // Биотехнология. - 2014. - № 1. - С. 72-78.

12. Алфредо Э., Вершинина В.И., Хаертынов К.С., Герасимова С.В., Уразов Н.Г., Хаертынова И.М. Способ получения антигена с молекулярной массой 45 кДа из *Mycobacterium tuberculosis* // Фундаментальные исследования. - 2013. - № 1-1. - С. 18-22.

**ЖУРНАЛ «ВЕТЕРИНАРИЯ И КОРМЛЕНИЕ»
ОКАЗЫВАЕТ НАУЧНЫМ, ГОСУДАРСТВЕННЫМ
И КОММЕРЧЕСКИМ ПРЕДПРИЯТИЯМ УСЛУГИ
ПО ДОПЕЧАТНОЙ ПОДГОТОВКЕ И ИЗГОТОВЛЕНИЮ**

- ◆ КНИГ,
- ◆ МЕТОДИЧЕК,
- ◆ БРОШЮР,
- ◆ ЛИСТОВОК,
- ◆ БУКЛЕТОВ,
- ◆ КАЛЕНДАРЕЙ

◆ И ДРУГОЙ ПОЛИГРАФИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ.

**БЮДЖЕТНЫЕ ЦЕНЫ, ВЫСОКОЕ КАЧЕСТВО, ОТВЕТСТВЕННОЕ ИСПОЛНЕНИЕ
ДОСТАВКА ВО ВСЕ РЕГИОНЫ РОССИИ.**



(8-916) 819-48-13
vetkorm@mail.ru

Ветеринарный конгресс, о котором точно вспомнят через 70 лет



С 19 по 21 апреля в Уфе проходил VII Международный Ветеринарный Конгресс "Единый мир - единое здоровье". Этот авторитетный форум - крупнейшее событие ветеринарной отрасли. В этом году в нем приняло участие свыше 1300 ведущих специалистов отрасли: ветеринарных врачей, зоотехников, технологов, сотрудников исследовательских центров, лабораторий, руководителей хозяйств, а также ученых, экспертов, членов национальных ветеринарных и животноводческих, птицеводческих союзов, общественных и производственных организаций, призванных решать сложные задачи агропромышленного комплекса нашей страны.

Конгресс по праву считается центральным научным мероприятием в сфере ветеринарии на всем пространстве Евразийского экономического Союза. Он прошел при поддержке Министерства сельского хозяйства РФ и Россельхознадзора, Правительства Республики, главных государственных ветеринарных инспекторов зарубежных стран и СНГ.

Главная цель Конгресса - получение новейшей информации от ведущих экспертов, ученых и специалистов-практиков в области ветеринарии из России, Испании, Дании, США, Китая, Польши, Болгарии, Франции, Великобритании, Австрии, Молдовы, Украины и Казахстана. География деятельности российских ученых, выступавших с докладами на Конгрессе, также велика. Свои разработки участникам мероприятия представили самые авторитетные эксперты из Москвы, Владимира, Уфы, Якутска, Воронежа, Новосибирска, Рязани, из Удмуртии, Крыма, Дагестана. Как отметили участники, научные доклады спикеров имели максимальную ориентированность на практическое применение полученных знаний в хозяйствах регионов России. Всего за 3 рабочих дня Конгресса было заслушано более 100 докладов по направлениям: болезни КРС, птиц, свиней, пчел, лошадей, новое в законодательстве в сфере ветеринарии и обращении лекарственных средств для ветеринарного применения, кадровое обеспечение АПК, антропозоонозные заболевания.

Участники Конгресса получили возможность узнать о самых последних и актуальных достижениях ветеринарии, напрямую задать вопросы любому эксперту, обсудить проблемы отрасли с коллегами и единомышленниками. Специалисты-практики повысили свой профессиональный уровень, приняли участие в выработке стратегически выверенных решений и предложений по повышению роли ветеринарии в продовольственной безопасности, а также в обеспечении безопасного сосуществования животных и людей.

На торжественной церемонии открытия конгресса с приветственными словами к собравшимся обратились Премьер-министр Республики Башкортостан Р. Марданов, исполнительный директор Российской ветеринарной ассоциации С.В. Лахтюхов, член Коллегии (Министр) по техническому регулированию Евразийской Экономической Комиссии В. Корешков, глава ветеринарной службы Королев-





ства Дания д-р Пер Хенриксен, директор департамента ветеринарии РФ В. Шевкопляс, зам. руководителя Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору Н. Власов, президент Росптицесоюза, член Президиума Российской академии наук, академик РАН В. Фисинин, генеральный директор Национального Союза свиноводов Ю. Ковалев.

В рамках церемонии были вручены ведомственные награды лучшим ветеринарным специалистам Республики Башкортостан, также прошло традиционное награждение за особые достижения в ветеринарии специальным призом Конгресса - хрустальным шаром, символизирующим планету Земля, которую держат заботливые руки ветеринара.

Председатель Оргкомитета VII Международного Ветеринарного Конгресса Сергей Лахтюхов и Руководитель Управления ветеринарии республики Башкортостан от имени всех участников Международного Ветеринарного Конгресса вручили ректору Башкирского Государственного Аграрного Университета Габитову Илдару Исмагиловичу памятную капсулу времени, в которую было помещено обращение к потомкам. Капсула была замурована под гранитной плитой, расположенной на территории Университета. Вскрыть ее надлежит через 70 лет - 31 августа, в год 200-летия ветеринарной службы и в день государственного праздника - Дня ветеринарного работника.

Научная часть Конгресса в этом году отличалась разнообразием и высокой актуальностью тем, высочайшим уровнем спикеров. Активное обсуждение шло в секциях и на



ключевой конференции для всех участников с дискуссией.

В секции мясного и молочного животноводства были рассмотрены вопросы эпизоотических ситуаций по отдельным особо опасным болезням крупного и мелкого рогатого скота, собравшиеся уделили особое внимание современным способам лечения нодулярного дерматита, лейкоза, неонатальных заболеваний молодняка, смешанных инфекций респираторного тракта, оценке рисков возникновения вспышек сибирской язвы и многим другим. Важное место в обсуждениях было отведено методам выявления заболеваний и их профилактики.

Ведущие птицеводы страны обсуждали на заседаниях секции как общие вопросы развития отрасли, так и отдельные методы иммунопрофилактики, дифференциальной диагностики, вакцинации. Основными угрозами птицеводческих хозяйств на данный момент являются сальмонеллез, пневмовирусную инфекцию, инфекционную анемию, бактериальные проблемы - расстройство ЖКТ у поголовья птицы, аденовирусные болезни. Свои исследования и взгляды на эти проблемы представили:

доктор экономических наук, генеральный директор Росптицесоюза Г. Бобылева; главный ветеринарный эксперт Росптицесоюза С. Яковлев; эксперт по птицеводству глобальной ветеринарной службы Андреас Херман, Берингер Ингельхайм, г. Лион, Франция; доктор ветеринарной медицины, Сертифицированный специалист в области микроби-





ологии Мартин Лиман, Германия; представитель Датского совета по сельскому хозяйству и продовольствию Нильсон Блом Мия, г.Копенгаген, Дания; доктор ветеринарных наук, Заслуженный ветеринарный врач РФ А. Борисов, и др.

Самые яркие доклады, по единому мнению участников Конгресса, звучали на заседаниях секции свиноводства. В первый день ее работы обсуждались различные болезни поголовья свиней, методы борьбы с вирусом РРСС, биологические свойства нового российского изолята данного вируса, диагностика и профилактика респираторных заболеваний, заболевания в неонатальный период, конверсия



корма. Весь второй день работы секции участники уделили обсуждению актуальнейшей проблеме, способной нанести колоссальный ущерб хозяйству, не зависимо от географии и уровня экономики страны: африканской чуме свиней. О своих исследованиях и разработках рассказали:

Ариас Мариса, доктор ветеринарии, директор исследовательского центра Национального научно-исследовательского и технологического института сельского хозяйства и продовольствия, г.Мадрид, Испания; Санчес-Вискаино Хосе, профессор, заведующий кафедрой эпизоотологии Мадридского университета, руководитель национальной программы по искоренению АЧС в Испании, г.Мадрид, Испания;



Пейсак Зигмунд, профессор, доктор ветеринарии, Институт ветеринарии, г.Пулавы, Польша;

Энхуанес Луис, профессор, руководитель отдела молекулярной и клеточной биологии Национального центра биотехнологии, г.Мадрид, Испания; ИббсенЙенс Мунк, директор Датского совета по сельскому хозяйству и продовольствию, г.Копенгаген, Дания; Лагер Келли, руководитель отдела ветеринарной вирусологии Национального центра по болезням животных, г.Эймс, Айова, США, и многие другие спикеры из Москвы, Владимира, Мадрида, Копенгагена.

Участники круглых столов, слушатели докладов и спикеры пришли к общему мнению, что экономика как отдельного хозяйства, так и всей отрасли в целом, зависит от того, насколько большим станет ущерб от болезней и падежа КРС, птицы, свиней. И чем высокотехнологичнее методы

борьбы с болезнями, чем более высокоточными будут достижения ветеринарной науки, тем большую прибыль получают аграрные предприятия, а покупатели, граждане страны - чистые экологичные продукты питания на свои столы, следовательно, и укрепление здоровья.

Уменьшение ущерба от болезней поголовья рассматривали и на заседаниях секции "Актуальные вопросы обращения лекарственных средств для ветеринарного применения". Организатором данного обсуждения выступили - Европейская экономическая комиссия, Минсельхоз РФ, Россельхознадзор. Участники заседания выработали свои предложения по формированию нормативно-правовой базы в сфере обращения ветеринарных препаратов, обсудили методы борьбы с контрафактом, фальсификатом, рассмотрели основные типы нарушений законодательства, положения новых нормативных актов.





На секции "Кадровое обеспечение АПК" Ханс Хенрик Дитс, доктор ветеринарной медицины, факультета здоровья и медицинских наук Университета г.Копенгаген, Дания, осветил вопрос получения ветеринарного образования российскими специалистами за рубежом. О вопросах совершенствования подготовки ветеринарных кадров говорили также ректор Московской ветеринарной академии им. Скрыбина Ф. Василевич и ректор Казанской ветеринарной академии им. Баумана Р. Равилов.

На Конгрессе традиционно работала выставка, на которой ведущие предприятия-производители отрасли представили свои товары: ветпрепараты, средства гигиены и обработки, приборы, устройства и технические новинки для с/х, корма и добавки, и др. На стендах компаний можно было получить подробную консультацию, обсудить вопросы приобретения, поставки, применения выбранного товара.

Практически все участники Конгресса отметили, что Уфа - современный гостеприимный город, в котором чтят традиции предков и идут в ногу со временем. В городе много молодежи, активно идет строительство, возводятся жилые, социальные и культурные объекты. Но главное богатство уфимцев - их открытость, радушие, гостеприимность и доброжелательность. Организаторы и участники Конгресса выражают признательность и благодарность Правительству Республики Башкортостан за активную поддержку мероприятия, а также всем уфимцам, кто помог провести это важнейшее мероприятие в сфере ветеринарии.

Международный Ветеринарный Конгресс освещали более 30 средств массовой информации, в их числе и журнал Ветеринария и кормление"

Владимир Храменков,
Фото автора

Журнал выражает благодарность пресс-службе конгресса, и лично Елене Любимовой, за четкую организацию работы и содействие при подготовке материала





ВЕСТИ РОССЕЛЬХОЗНАДЗОРА

ВКЛАДЫШ ИЗДАЕТСЯ НА ОСНОВЕ СОГЛАШЕНИЯ ОБ ИНФОРМАЦИОННОМ ПАРТНЕРСТВЕ
МЕЖДУ РОССЕЛЬХОЗНАДЗОРОМ И ЖУРНАЛОМ "ВЕТЕРИНАРИЯ И КОРМЛЕНИЕ"

Нарушения в животноводческой продукции, экспортируемой в страны Евросоюза

Россельхознадзор сообщает что, по данным единой системы быстрого оповещения в пищевых продуктах и кормах RASFF, за 2017 г. в продукции, произведенной в Российской Федерации, поступающей в страны Европейского союза, выявлялись следующие нарушения:

1. Производитель ЗАО "Содружество-Соя", (Калининградская область) в рапсовом шроте неоднократное выявление Salmonella Tennessee (нотификация из Финляндии);
2. Производитель ООО "Сернурский опытно-производственный завод", (Республика Марий Эл), в кормовых дрожжах, неоднократное подозрение на фальсификацию Карбамид (мочевина) (нотификация из Латвии);
3. Производитель ОАО "Татспиртпром" "Усадский спиртзавод", (Республика Татарстан), в кормовых дрожжах, неоднократное подозрение на фальсификацию Карбамид (мочевина) (нотификация из Латвии);
4. Производитель ИП Салагаев Кирилл Александрович, (Республика Башкортостан), в меде, запрещенный хлорамфеникол (нотификация из Польши).
5. Производитель ПАО "Волжский гидролизно-дрожжевой завод" (Республика Марий Эл), в кормовых дрожжах выявление подозрение на фальсификацию Карбамид (мочевина) (нотификация из Латвии).

В настоящее время проводится расследование причин нарушения ветеринарно-санитарных требований Европейского Союза. О результатах расследования и принятых мерах будет сообщено дополнительно.

Приглашаем для участия в указанных публичных обсуждениях

Россельхознадзором планируются проведения публичных обсуждений результатов правоприменительной практики Россельхознадзора и руководств по соблюдению обязательных требований

Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору 25 мая 2017 г. в рамках реализации мероприятий приоритетной программы "Реформа контрольной и надзорной деятельности" проводятся публичные обсуждения результатов правоприменительной практики Россельхознадзора и руководств по соблюдению обязательных требований. Указанное мероприятие будет проводиться в зале федерального государственного бюджетного учреждения "Всероссийский центр карантин растений" (Московская область, Раменский район, п. Быково, ул. Пограничная, д. 32), начало - в 10 час. 00 мин.

Информируем, что на официальном сайте Россельхознадзора в разделе "Реформа контрольно-надзорной деятельности" размещены доклад Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору по правоприменительной практике, статистике типовых и массовых нарушений обязательных требований, выявленных территориальными органами Службы, с возможными мероприятиями по их устранению ("как делать нельзя") и доклад Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору с руководством по соблюдению обязательных требований, дающим разъяснение, какое поведение является правомерным, а также разъяснение новых требований нормативных правовых актов, необходимых для реализации организационных, технических мероприятий ("как делать нужно (можно)").

Вопросы (обращения), замечания и комментарии по указанным докладом можно разместить на форуме "Реформа контрольно-надзорной деятельности" на официальном сайте Россельхознадзора.

Визит представителей Главного управления Саудовской Аравии

В период с 15 по 23 мая 2017 года состоится визит представителей Главного управления Саудовской Аравии по продовольствию и медикаментам с целью ознакомления и оценки российской системы контроля по обеспечению безопасности производства мяса говядины, продукции птицеводства и готовой мясной продукции, а также оценки по риску доступа указанной продукции на рынок Саудовской Аравии.

В соответствии с согласованной между Россельхознадзором и компетентным органом Саудовской Аравии программой пребывания саудовская делегация планирует посетить российские перерабатывающие предприятия, находящиеся в 4 субъектах Российской Федерации: Московской, Брянской, Пензенской областях и Ставропольском крае. Также в рамках визита предусмотрено посещение сырьевых зон: фермы по откорму крупного рогатого скота и площадки по выращиванию птицы, а также межобластной ветеринарной лаборатории; изучение эффективности противоэпизоотических мероприятий, проводимых российской ветеринарной службой.

Сегодня, 15 мая 2017 года состоится первая встреча с инспекторами Саудовской Аравии, в ходе которой представители Россельхознадзора подробно знакомят коллег со следующими темами:

- организация ветеринарной службы в Российской Федерации,
- планирование и проведение государственного мониторинга качества и безопасности пищевых продуктов в Российской Федерации,
- благополучие животных,
- информационные технологии и пищевая безопасность.

Оптимизация работы в рамках "Зеленого коридора"

В рамках реализации приоритетной программы Реформа контрольной и надзорной деятельности, ключевой целью которой является снижение административной нагрузки на организации и граждан, осуществляющих предпринимательскую деятельность, и повышение качества администрирования контрольно-надзорных функций, Россельхознадзором внедрен риск-ориентированный подход при осуществлении контрольно-надзорной деятельности.

В целях контроля реализации данного подхода в осуществлении государственного ветеринарного контроля 5 мая на базе Управления Россельхознадзора по Санкт-Петербургу и Ленинградской области прошло очередное рабочее совещание, посвященное функционированию экспериментального проекта "Зеленый коридор".

Речь шла об оптимизации деятельности. "Зеленый коридор - приоритетное направление, нашей задачей является оптимизация работы в рамках проекта" - подчеркнул Сергей Усов, заместитель начальника отдела внутреннего ветеринарного надзора и пограничного ветеринарного контроля на государственной границе Российской Федерации и транспорте Управления.

Как сократить временные затраты и получить персональный доступ к работе в электронных системах - на эти и другие вопросы участникам внешнеэкономической деятельности ответили специалисты Управления.

Подводя итоги, было отмечено, что с 15 апреля, дня запуска эксперимента "Зеленый коридор", в порт Петербурга прибыло 203 контейнера с рыбой и рыбопродукцией, в отношении 106 из них система приняла решение о выпуске грузов без досмотра.

Вспышка гриппа птиц в Республике Татарстан

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору сообщает о регистрации гриппа птиц на территории Республики Татарстан.

В результате лабораторных исследований ФГБУ "ВНИИЗЖ" 09 мая 2017 г. в патологическом материале, отобранном от птицы, содержащейся в ООО "Птицекомплекс Лаишевский" (пос. им. 25 лет Октября, Лаишевский район, Республика Татарстан), выделен геном вируса гриппа птиц подтипа H5.

В настоящее время в неблагополучном пункте работают специалисты госветслужбы Республики Татарстан под контролем Управления Россельхознадзора по Республике Татарстан. Первоочередные мероприятия проводятся.

Отбор кандидатов в члены Общественного совета

Прием заявлений от общественных объединений и иных некоммерческих организаций, выдвигающих кандидатов в состав Общественного совета при Россельхознадзоре, прекращен.

II этап формирования нового состава Общественного совета при Россельхознадзоре - анализ поступивших документов - пройдет в течение месяца.

Никаких препятствий при оформлении ветеринарного сертификата на экспорт нет

В связи с обращениями в Россельхознадзор Исполнительного директора Российской ветеринарной ассоциации (РВА) С.В. Лахтохова и Генерального директора Союза предприятий зообизнеса (СПЗ) Т.И. Колчановой о барьерах при экспорте участниками внешнеэкономической деятельности лекарственных средств для ветеринарного применения (далее - лекарственные средства), представляем вниманию субъектов обращения лекарственных средств полную информацию по данному вопросу.

В конце февраля с.г. в Россельхознадзор обратился один из производителей лекарственных средств с предложением исключить представление российскими экспортерами ветеринарного свидетельства формы № 3 с целью оформления ветеринарного сертификата формы № 5h при оформлении грузов лекарственных средств на экспорт. В свою очередь Россельхознадзор оперативно отреагировал и в письме от 14.03.2017 № ФС-НВ-2/4711, адресованном в территориальные Управления Россельхознадзора, дал указания должностным лицам Управлений Россельхознадзора не требовать представления российскими экспортерами ветеринарного свидетельства формы № 3. Сейчас, РВА и СПЗ со ссылкой на упомянутое письмо утверждают, что экспорт лекарственных средств под угрозой прекращения, и кроме прочего сетуют о прекращении государственной ветеринарной службой выписки ветеринарных свидетельств по форме № 3 на лекарственные средства.

Для справки сообщаем, что в соответствии с приказом Минсельхоза России от 27.12.2016 № 589 "Об утверждении ветеринарных правил организации работы по оформлению ветеринарных сопроводительных документов, порядка оформления ветеринарных сопроводительных документов в электронной форме и порядка оформления ветеринарных сопроводительных документов на бумажных носителях" ветеринарное свидетельство формы N 3 оформляется при перемещении товаров по территории Российской Федерации и его оформляют: учреждения, подведомственные органам исполнительной власти субъектов Российской Федерации в области ветеринарии, а также ветеринарные (ветеринарно-санитарные) службы федеральных органов исполнительной власти в области обороны, в сфере внутренних дел, в сфере деятельности войск национальной гвардии Российской Федерации, в сфере исполнения наказаний, в сфере государственной охраны и в области обеспечения безопасности.

Грубые нарушения лицензионных требований хранения лекарственных средств в Нижегородской области

Сотрудниками отдела ветеринарного надзора Управления Россельхознадзора по Нижегородской области и Республике Марий Эл была проведена плановая выездная проверка в отношении ООО Предприятие "Алиди", с целью контроля за соблюдением лицензионных требований при осуществлении фармацевтической деятельности, контроля за оборотом лекарственных средств ветеринарного применения. В ходе проведенной проверки было установлено, что обществом допускаются грубые нарушения лицензионных требований при хранении лекарственных средств для ветеринарного применения, а именно: лекарственные средства, требующие защиты от воздействия света, хранились на открытых стеллажах. Данные лекарственные средства изъяты из оборота. В отношении общества был составлен протокол. Материалы проверки переданы для рассмотрения в Арбитражный суд Нижегородской области. В результате Арбитражным судом вынесено решение о привлечении юридического лица к административной ответственности по ч. 4 ст. 14.1 КоАП РФ и назначении ему административного наказания в виде административного штрафа в размере 50 000 рублей. В настоящее время штраф оплачен.

Указанные учреждения и ветеринарные службы не подведомственны Россельхознадзору. Соответственно Россельхознадзор не может запретить данным организациям оформлять ветеринарные свидетельства.

В свою очередь Россельхознадзор оформляет ветеринарный сертификат формы N 5h на экспортируемые из Российской Федерации биологическое сырье, предназначенное для производства лекарственных средств, применяемых в ветеринарии, коллекции и образцы по зоологии, анатомии, палеонтологии. Ветеринарное свидетельство формы N 3 оформляется на техническое сырье, корма и биологические отходы. Кроме того, в соответствии с приказом Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 18.12.2015 № 648 "Об утверждении перечня подконтрольных товаров, подлежащих сопровождению ветеринарными сопроводительными документами", лекарственные средства для ветеринарного применения (код ТН ВЭД группы 29 и группы 30) при перемещении по территории Российской Федерации не требуют оформления ветеринарных сопроводительных документов.

В соответствии с пунктом 3.13 Положения о Едином порядке осуществления ветеринарного контроля на таможенной границе Таможенного союза и на таможенной территории Таможенного союза Решения Комиссии Таможенного союза, утвержденного Решением Комиссии Таможенного союза от 18.06.2010 № 317 (далее - Положение), ввоз, перевозка лекарственных средств, а также кормовых добавок химического и микробиологического синтеза осуществляются без ветеринарного сертификата, в сопровождении документа, подтверждающего их качество и безопасность, выдаваемого предприятием-изготовителем.

Пунктом 5.7 Единых правил государственного ветеринарного надзора при международных и межгосударственных перевозках животноводческих грузов, утвержденных Решением Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии 12.05.2016, определено, что перевозки в пределах государств - участников СНГ лекарственных средств для ветеринарного применения осуществляются без ветеринарного сертификата, в сопровождении документа, подтверждающего их качество и безопасность, выдаваемого предприятием-изготовителем.

Таким образом, никаких препятствий со стороны Россельхознадзора при оформлении ветеринарного сертификата формы № 5h на экспорт нет.