

СОДЕРЖАНИЕ

ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ И ЭПИЗООТОЛОГИЯ

ОЦЕНКА ПРИГОДНОСТИ ВЫДЕЛЕННЫХ АНТИРАБИЧЕСКИХ ГЛОБУЛИНОВ ДЛЯ МЕТОДОВ
ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ: ИФА И МФА *М.А.Ефимова, А.Г.Мухамеджанова, А.Н.Чернов,
К.С.Хаертганов, Р.М.Ахмадиев, Ш.М.Насыров, И.И.Самерханов, З.З.Алеева, Г.С.Арутюнян, Г.М.Яруллина* 3

СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИПЕПТИД РМРВ70 ВЫЯВЛЯЕТ СПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА
ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА *Э.А.Шуралев, Т.Х.Фаизов, Н.И.Хаммадов, К.А.Осянин,
К.В.Усольцев, Н.М.Александрова* 8

ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БРУЦЕЛЛ ВИДА ABORTUS,
НАХОДЯЩИХСЯ В РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ДИССОЦИИИ *М.А.Косарев, А.М.Фомин, Г.М.Сафина,
С.А.Григорьева, Л.А.Тухватуллина* 14

ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНЕЙ, ТЕРАПИЯ И МОРФОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
ГЕРЕФОРДСКОЙ ПОРОДЫ В РАЗНЫЕ СЕЗОНЫ ГОДА *В.И.Раицкая* 19

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НПВС НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА ТЕЛЯТ, БОЛЬНЫХ
БРОНХОПНЕВМОНИЕЙ *М.С.Жуков, Ю.Н.Алехин, И.Р.Никулина* 24

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗНЫХ ГЕЛЬМИНТООВОСКОПИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ
АССОЦИАТИВНЫХ ИНВАЗИЙ ЛОШАДЕЙ *Т.Р.Щитковская, Д.Г.Латыпов, Л.А.Гайсина* 28

ВЕТЕРИНАРНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ С ТОКСИКОЛОГИЕЙ

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА
ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ «ИНСПЕКТОР КВАДРО» *М.В.Арисов, И.П.Белых, В.В.Артемов* 32

ВЛИЯНИЕ АПИФИТОПРЕПАРАТА «ВИТА-ФОРЦЕ М» НА ОКСИДАТИВНЫЙ
РАДИАЦИОННЫЙ СТРЕСС *М.З.Тухфатулов* 36

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОЛУЧЕНИЯ НАТИВНОГО НЕЙРОТОКСИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА
CLOSTRIDIUM BOTULINUM ТИП А МЕТОДОМ КОНЦЕНТРАЦИИ И ВЫСАЛИВАНИЯ
СУЛЬФАТОМ АММОНИЯ *Э.Н.Мустафина, Т.Р.Мустафин, Н.С.Садыков* 39

ВЕТЕРИНАРНАЯ ХИРУРГИЯ

ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ БИОАКТИВНОГО СЛОЯ ИМПЛАНТАТОВ В ЗАВИСИМОСТИ
ОТ СПОСОБА ЕГО НАНЕСЕНИЯ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO)
Н.А.Кононович, А.В.Попков, Е.Н.Горбач, М.В.Стогов, Д.А.Попков 42

КОРМЛЕНИЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

ЖИВАЯ МАССА И СОСТАВ КРОВИ ТЕЛЯТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФОРМЫ И ДОЗЫ ПРИМЕНЕНИЯ
КОРМОВЫХ ДОБАВОК НА ОСНОВЕ САПРОПЕЛЯ *А.М.Ежкова, И.А.Яппаров, В.О.Ежков, А.Х.Яппаров,
Р.Н.Файзрахманов* 48

РУБЦОВОЕ ПИЩЕВАРЕНИЕ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ В ПРИСУТСТВИИ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО
ВОДОРАСТВОРИМОГО ПОЛИМЕРА *Н.В.Грудина, В.В.Быданова, Н.С.Грудин* 54

ДИНАМИКА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЫВОРОТКИ
КРОВИ У СТЕЛЬНЫХ СУХОСТОЙНЫХ И НОВОТЕЛЬНЫХ КОРОВ *Е.О.Крупин, Ш.К.Шакиров, М.Ш.Тагиров* 58

СЕЛЕКЦИЯ И ГЕНЕТИКА

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ В ПТИЦЕВОДСТВЕ И
СВИНОВОДСТВЕ ПУТЕМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ СЕЛЕКЦИИ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО
АНАЛИЗА ДНК *В.Н.Афонюшкин, Н.А.Донченко, П.В.Бушмелева, М.А.Барсукова, О.А.Фролова* 63

CONTENTS

VETERINARY MICROBIOLOGY, VIROLOGY AND EPIZOOTOLOGY

EVALUATION OF SUITABILITY OF THE ISOLATED ANTIRABIC GLOBULINS FOR METHODS OF LABORATORY DIAGNOSIS: ELISA AND IFA *Efimova M.A., Mukhamedzhanova A.G., Chernov A.N., Khaertynov K.S., Akhmadeev R.M., Nasyrov Sh.M., Samerkhanov I.I., Aleeva Z.Z., Arutyunyan G.S., Yarullina G.M.* 3

SYNTHETIC POLYPEPTIDE pMPB70 DETECTS SPECIFIC ANTIBODIES IN CATTLE WITH TUBERCULOSIS *Shuralev E.A., Faizov T.Kh., Khammadov N.I., Osyanin K.A., Usoltsev K.V., Aleksandrova N.M.* 8

STUDY OF CULTURAL AND MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF BRUCELLAS ABORTUS IN VARIOUS DEGREES OF DISSOCIATION *Kosarev M.A., Fomin A.M., Safina G.M., Grigorieva S.A., Tuhvatullina L.A.* 14

DIAGNOSIS OF DISEASES, THERAPY AND MORPHOLOGY OF ANIMALS

AGE-RELATED CHANGES OF BLOOD CORPUSCLES OF CATTLE HEREFORD BREED IN DIFFERENT SEASONS OF THE YEAR *Raickaya V.I.* 19

COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE EFFECT OF NSAIDS ON THE HEMOSTASIS SYSTEM OF CALVES WITH BRONCHOPNEUMONIA *Zhukov M.S., Alekhin Yu.N., Nikulina I.R.* 24

EFFECTIVENESS OF DIFFERENT HELMINTHOSCOPIC METHODS IN DIAGNOSTICS OF ASSOCIATE INVASION OF HORSES *Schitkovskaya T.R., D.G.Latypov, Gaysina L.A.* 28

VETERINARY PHARMACOLOGY WITH TOXICOLOGY

STUDY OF ALLERGENIC PROPERTIES OF THE DRUG FOR VETERINARY USE "INSPECTOR QUADRO" *Arisov M.V., Belykh I.P., Artemov V.V.* 32

INFLUENCE OF APIPHYTOPREPARATION "VITA-FORCE M" ON OXIDATIVE RADIATION STRESS *Tukhfatullo M.Z.* 36

COMPARATIVE EVALUATION OF THE PRODUCTION OF THE CLOSTRIDIUM BOTULINUM A NEW NEUROTOXIC COMPLEX TYPE A BY CONCENTRATION AND EMBOSSED BY SULFURIC AMMONIUM *Mustafina E.N., Mustafin T.R., Sadykov N.S.* 39

VETERINARY SURGERY

PATTERN OF CHANGING IMPLANT BIOACTIVE LAYER DEPENDING ON THE TECHNIQUE OF ITS APPLYING (AN EXPERIMENTAL STUDY IN VITRO) *Kononovich N.A., Popkov A.V., Gorbach E.N., Stogov M.V., Popkov D.A.* 45

FEEDING AGRICULTURAL ANIMALS

THE LIVING WEIGHT AND THE BLOOD COMPOSITION OF CALVES DEPENDING ON THE FORM AND THE RATE OF SUPPLEMENTARY SAPROPEL-BASED FEEDS *Ezhkova A.M., Yapparov I.A., Ezhkov V.O., Yapparov A.Kh., Faizrahmanov R.N.* 48

DIGESTION IN THE RUMEN OF RUMINANT ANIMALS IN THE PRESENCE OF HIGH MOLECULAR WATER-SOLUBLE POLYMER *Grudina N.V., Bydanova V.V., Grudin N.S.* 54

DYNAMICS OF HEMATOLOGICAL AND SOME BIOCHEMICAL INDICATORS OF BLOOD SERUM IN DRY AND FRESH COWS *Krupin E.O., Shakirov Sh.K., Tagirov M.Sh.* 58

SELECTION AND GENETICS

THE ORETICAL ASPECTS OF ENSURING INFECTIOUS WELL-BEING IN POULTRY FARMING AND SWINE BREEDING BY USING BREEDING METHODS AND MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF DNA *Afonyushkin V.N., Donchenko N.A., Bushmeleva P.V., Barsukova M.A., Frolova O.A.* 63

ОЦЕНКА ПРИГОДНОСТИ ВЫДЕЛЕННЫХ АНТИРАБИЧЕСКИХ ГЛОБУЛИНОВ ДЛЯ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ: ИФА И МФА

¹М.А.Ефимова – доктор биологических наук, зав. лабораторией; ¹А.Г.Мухамеджанова – аспирант; ¹А.Н.Чернов – доктор биологических наук, зам. директора; ^{1,2}К.С.Хаертынов – кандидат биологических наук, вед.н.с.; ¹Р.М.Ахмадеев – кандидат ветеринарных наук, вед.н.с.; ¹Ш.М.Насыров – кандидат ветеринарных наук, вед.н.с.; ¹И.И.Самерханов – н.с.; ¹З.З.Алеева – мл.н.с.; ¹Г.С.Арутюнян – мл.н.с.; ¹Г.М.Яруллина – мл.н.с.

¹ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г.Казань (420075, Казань, Научный городок-2); e-mail: antonina-95@yandex.ru).

²Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г.Казань (420012, Казань, ул. Бутлерова, 36).

Для выделения и очистки антирабических иммуноглобулинов использовали сыворотку овец, иммунизированных высокоочищенным антигеном вируса бешенства из штамма «Овечий» ГНКИ. Выделение глобулинов производилось методом трёхкратного переосаждения насыщенным раствором сульфата аммония с последующим диализом в трисовой буферной системе, в результате чего были получены очищенные фракции, для предварительной оценки активности которых использовали электрофорез в 7,5% разделяющем полиакриламидном геле. Данная характеристика исследуемых фракций была подтверждена методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) с гомологичными и гетерологичными антигенами вируса бешенства. В дальнейшем, полученные иммуноглобулины были подвергнуты маркировке флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) с последующей гель-фильтрацией на хроматографическом колонках с использованием геля сефадекс G-25. Активность и специфичность флуоресцирующих иммуноглобулинов оценивалась методом флуоресцирующих антител (МФА) в мазках-отпечатках головного мозга мышей, заражённых вирусом бешенства и вирусом болезни Ауески, в мазках-отпечатках головного мозга интактных мышей, а также по показателям концентрации меченого белка и молярного соотношения ФИТЦ/белок. Нами были выявлены наиболее активные фракции иммуноглобулинов и определены их оптимальные рабочие разведения, что в перспективе сделает возможным их использование в качестве специфических компонентов экспресс-тест-систем для диагностики бешенства на основе ИФА и МФА.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус бешенства, антирабический иммуноглобулин, электрофорез, иммуноферментный анализ, иммунофлуоресценция.

На протяжении последнего десятилетия эпизоотическая обстановка по бешенству на территории большинства регионов Российской Федерации остаётся крайне напряжённой [5]. Являясь летальной острой антропозоонозной инфекцией, бешенство, по оценке ВОЗ, занимает 5 место среди инфекционных болезней по наносимому экономическому ущербу, значительная часть которого складывается из затрат на активную специфическую профилактику среди диких и сельскохозяйственных животных [6], а также на проведение диагностических исследований, являющихся основой разработки комплекса противоэпизоотических мероприятий.

Общепринятые методы постморальной диагностики бешенства основаны, как правило, на обнаружении цитоплазматических включений или специфического антигена (световая и люминесцентная микроскопия, реакция диффузионной преципитации, иммуноферментный анализ (ИФА) и др.) либо на индикации рабического вируса (биопроба на лабораторных животных или в культуре клеток), а также на обнару-

жении генома возбудителя бешенства [8]. В связи с этим для повышения эффективности противоэпизоотических мероприятий необходимо не только активное проведение плановых мониторинговых исследований [2], но и совершенствование методик экспресс-диагностики бешенства, в частности, тест-систем на основе методов флуоресцирующих антител (МФА) и ИФА с применением высокоочищенных специфических компонентов – рабических антигенов и иммуноглобулинов. Обозначенные методы обладают рядом преимуществ перед другими серологическими тестами: низким порогом чувствительности, стабильностью реактогенных соединений, возможностью автоматизации анализа и простотой интерпретации полученных результатов. Более того, сочетание применения данных методов наряду с биопробой позволит значительно расширить возможности лабораторной диагностики бешенства [1].

Неотъемлемыми этапами конструирования экспресс-тест-систем для диагностики бешенства являются получение и наработка высокоспецифичных

антирабических иммуноглобулинов, используемых как в качестве сенсibilизирующего материала, так и для приготовления пероксидазного антирабического конъюгата. Основной характеристикой, предьявляемой к иммуноглобулинам, является высокая специфичность, что в ходе проведения реакции обеспечит оптимальную связываемость с иммобилизованными антигенами. Повышение данного свойства иммуноглобулинов может быть достигнуто предлагаемой методикой их выделения и очистки, а также поэтапным контролем их активности и специфичности в ходе технологического процесса.

Целью настоящего исследования явились получение антирабических иммуноглобулинов и оценка их активности и специфичности методами иммуноферментного анализа и флуоресцирующих антител.

Материалы и методы. Для получения высокоспецифичных антирабических иммуноглобулинов использовали сыворотку крови овец, иммунизированных инaktivированным высокоочищенным антигеном вируса бешенства шт. «Овечий» ГНКИ с инфекционным титром Ig10-4,25 из коллекции ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», предварительно подвергнутого пассажированию. Клинически здоровые овцы были гипериммунизированы путём последовательного четырёхкратного введения инaktivированного антигена вируса бешенства с интервалом в 14 суток в смеси с неполным адьювантом Фрейнда (Incomplete Freund's adjuvant, Thermo Fisher Scientific) внутримышечно в суммарном объёме 16 см³. Забор крови производился стандартным методом из ярёмной вены через месяц после заключительной иммунизации при достижении титров сыворотки 1:800–1:1600 в ИФА. Контролем служила сыворотка крови интактной овцы.

Выделение иммуноглобулинов из пула гипериммунной сыворотки осуществлялось методом трёхкратного высаливания насыщенным раствором 2,78 М сульфата аммония с последующим диализом против 0,025 М трис-НСl буфера, рН 7,8, и хроматографической очисткой с ДЭАЭ целлюлозой со скоростью элюции 0,7 мл/мин [3].

Последующее разделение первичных иммуноглобулинов на фракции производилось методом гель-фильтрации на хроматографе NGC Discovery (Bio-Rad) с последующим измерением концентрации белка на спектрофотометре UV5 (Mettler Toledo) при длине волны 280 нм. В качестве ключевого метода для оценки серологической активности полученных фракций использовали электрофорез в 7,5% разделяющем полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим окрашиванием коллоидным раствором Кумасси G-250 (ООО «ДИА-М»). Дальнейшее определение специфичности препаратов производили методом сэндвич-ИФА в концентрациях по белку, равных 100, 200, 300 и 400 мкг/мл. В качестве контролей для постановки ИФА нами были использованы контрольные положительный и отрицательный антигены вируса бешенства, полученные из мозговой ткани инцидированных и

интактных мышей соответственно (производство ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), а также гетерологичный антиген, полученный из мозговой ткани мышей, инцидированных вирусом болезни Ауески (производственный штамм «Арский» с инфекционным титром Ig10⁻³). Гомологичные и гетерологичные антигены использовали в разведении 1:800, антирабический пероксидазный конъюгат (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ») – 1:3200; постановка реакции воспроизводилась в пяти повторностях. Для предварительной оценки электрофоретической активности иммуноглобулинов применяли метод Laemmli [7].

Мечение иммуноглобулинов флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ, Merck) производилось методом конъюгации из расчёта 0,05 мг красителя на 1 мг белка в течение 18 часов при +4°C в темноте. Последующее удаление несвязавшегося красителя достигалось гель-фильтрацией на колонках с использованием геля сефадекс G-25. Полученные фракции были проанализированы на спектрофотометре UV5 (Mettler Toledo) при длинах волн 280 нм и 495 нм, соответствующих областям максимального поглощения для белка и ФИТЦ соответственно [4]. Концентрация меченого белка (K_φ) и молярное соотношение ФИТЦ/белок (K_{φ/б}) на основе данных спектрального анализа рассчитывали по формулам [4]:

$$K_{\phi} = (OP_{280} - 0,32 \times OP_{495}) : 1,4 \quad (1)$$

$$K_{\phi/б} = 2,87 \cdot OP_{495} / (OP_{280} - 0,32 \times OP_{495}) \quad (2), \text{ где:}$$

OP₂₈₀ – значение оптической плотности при длине волны 280 нм;

OP₄₉₅ – значение оптической плотности при длине волны 495 нм;

0,32, 1,4, 2,87 – расчётные коэффициенты.

Чувствительность и специфичность полученных меченых иммуноглобулинов оценивались посредством МФА при люминесцентной микроскопии. Постановка реакции осуществлялась на мазках-отпечатках ткани из четырёх отделов головного мозга (продолговатого мозга, мозжечка, гиппокампа и коры больших полушарий) мышей, инцидированных вирусом бешенства из производственного штамма «Овечий» ГНКИ, в качестве положительного контроля, и интактных мышей и мышей, инцидированных вирусом болезни Ауески из штамма «Арский» – в качестве отрицательного контроля на предметных стёклах, предварительно высушенных и зафиксированных в ацетоне. На отпечатки наносили исследуемые препараты в разведениях 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 по общепринятой методике в пяти повторностях и просматривали в полях зрения люминесцентного микроскопа Nikon E-200 на предмет наличия флуоресцирующих внутриклеточных включений вируса бешенства. Об активности препарата судили по степени интенсивности специфической флуоресценции в виде округлых включений желтовато-зелёно-

го цвета в нейронах и их отростках.

Результаты исследований. В результате использования ранее изложенной методики хроматографической очистки глобулинов [3], выделенных сульфатом аммония из гипериммунной антирабической сыворотки овец на колонке с диэтиламиноэтил-целлюлозой (ДЭАЭ) были получены две основные фракции IgG1 и IgG2, концентрация белка в которых составила 3,582 мг/мл и 6,627 мг/мл, соответственно. Подобное разделение фракций было обусловлено из-

менением градиента молярности в системе и связей с носителем. Проведённый анализ белкового спектра данных фракций в ПИАГ подтверждает содержание в них высококонцентрированных иммуноглобулинов с минимальными примесями вторичных белков.

Следующий этап исследования заключался в установлении степени активности полученных фракций иммуноглобулинов методом непрямого ИФА с гомологичными и гетерологичными антигенами (табл. 1).

Таблица 1

Иммунологическая специфичность полученных фракций антирабических иммуноглобулинов в ИФА

| Фракции IgG | Концентрация белка, мг/мл | ОП при длине волны 490 нм в наибольшем разведении | | |
|--|---------------------------|---|-----------------------------------|--------------------------|
| | | АГ вируса бешенства | Контрольный отрицательный антиген | АГ вируса болезни Ауески |
| IgG1 (C ₆ = 3,582 мг/мл) | 100 | 0,592±0,011 ^{1,2} | 0,062±0,003 | 0,091±0,002 |
| | 200 | 0,684±0,012 ^{1,2} | 0,068±0,002 | 0,093±0,001 |
| | 300 | 0,821±0,004 ^{1,2} | 0,071±0,002 | 0,096±0,003 |
| | 400 | 0,911±0,005 ^{1,2} | 0,074±0,003 | 0,108±0,001 |
| IgG2 (C ₆ = 6,627 мг/мл) | 100 | 0,647±0,006 ^{1,2} | 0,061±0,002 | 0,089±0,004 |
| | 200 | 0,705±0,006 ^{1,2} | 0,067±0,004 | 0,094±0,006 |
| | 300 | 0,846±0,003 ^{1,2} | 0,071±0,001 | 0,112±0,002 |
| | 400 | 0,914±0,005 ^{1,2} | 0,079±0,002 | 0,118±0,005 |

Примечание: ¹ – достоверно по сравнению с гомологичным антигеном (p<0,0001);
² – достоверно по сравнению с гетерологичным антигеном (p<0,0001).

Согласно результатам ИФА, наибольшей активностью характеризуется фракция IgG2 с концентрацией белка 6,627 мг/мл. Предположительно высокая активность фракции обусловлена содержанием в ней пептидов, соответствующих антигенным детерминантам вируса бешенства, что визуально подтверждено электрофореграммой.

Далее из фракции IgG1 было отобрано несколько проб для конъюгации с ФИТЦ. По завершению хроматографической очистки с использованием геля сефадекс G-25 выход препарата был зафиксирован в виде пика, восходящая и нисходящая части которого сформировали фракции №1 и №2 с концентрациями белка 7,607 мг/мл и 9,956 мг/мл

соответственно. Результаты спектрального анализа полученных проб при длинах волн 280 нм и 495 нм представлены в таблице 2.

Исходя из представленных данных, при незначительных различиях показателей плотности мечения наибольшей концентрацией меченого белка характеризуется фракция 1, что объясняет её высокую активность в ИФА (табл. 3).

При визуальном учёте результатов реакции в мазках-отпечатках с положительным антигеном вируса бешенства наблюдалось яркое (3-4 креста) характерное желтовато-зелёное свечение в виде округлых гранул. За оптимальное рабочее разведение фракции 1 было принято 1:8-1:16, фракции 2 – 1:4-1:8.

Таблица 2

Данные спектрального анализа фракций иммуноглобулинов, меченых ФИТЦ

| Показатель | Фракция 1 (C ₆ = 7,607 мг/мл) | Фракция 2 (C ₆ = 9,956 мг/мл) |
|-----------------------------|--|--|
| ОП при длине волны 280 нм | 0,73221 | 0,09556 |
| ОП при длине волны 495 нм | 1,36818 | 0,18486 |
| Концентрация меченого белка | 0,21 | 0,03 |
| Соотношение ФИТЦ/белок | 13,34 | 17,2 |
| Плотность мечения | 14,4 | 15,8 |

Активность в РИФ фракций иммуноглобулинов, меченых ФИТЦ

| Фракции флуоресцирующих иммуноглобулинов | Рабочее разведение | Интенсивность свечения | | |
|--|--------------------|------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| | | АГ вируса бешенства | Контрольный отрицательный антиген | АГ вируса болезни Ауески |
| Проба №1 (Сб= 7,607 мг/мл) | 1:4 | ++++ | + | + |
| | 1:8 | ++++ | + | + |
| | 1:16 | +++ | – | –+ |
| | 1:32 | +++ | – | – |
| Проба №2 (Сб= 9,956 мг/мл) | 1:4 | +++ | + | + |
| | 1:8 | +++ | + | – |
| | 1:16 | ++ | – | – |
| | 1:32 | ++ | – | – |

При визуальном учёте результатов реакции в мазках-отпечатках с положительным антигеном вируса бешенства наблюдалось яркое (3-4 креста) характерное желтато-зелёное свечение в виде округлых гранул. За оптимальное рабочее разведение фракции 1 было принято 1:8-1:16, фракции 2 – 1:4-1:8.

В мазках-отпечатках с контрольным отрицательным антигеном и антигеном вируса болезни Ауески была отмечена определённая фоновая активность. Предположительно, подобная побочная активность может быть связана как с высокой чувствительностью самого метода, как и с относительно высокой концентрацией меченого белка в исследуемых фракциях.

Заключение. Нами была изучена активность и специфичность наиболее активных фракций ан-

тирабических иммуноглобулинов, выделенных из гипериммунной сыворотки овец методом трёхкратного высаливания насыщенным раствором сульфата аммония. Отбор фракций в процессе их выделения осуществлялся согласно выявлению первичной активности в электрофореограммах, которая в дальнейшем была подтверждена методами НИФА и РИФ. В результате постановки данных реакций были выявлены наиболее активные разведения исследуемых препаратов. Наличие фона в отрицательных мазках при визуальном учёте РИФ в дальнейшем может быть устранено путём оптимизации методик по выделению и очистке специфических антирабических иммуноглобулинов, что сделает возможным их использование в качестве специфических компонентов соответствующих экспресс-тест-систем.

Литература

1. Гулюкин, А.М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и индикации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза / А.М.Гулюкин // Вопросы вирусологии. – 2014. – №3. – С. 5–10.
2. Мониторинг бешенства у диких животных в Брянской области / А.Л.Елаков [и др.] // Ветеринария. – 2015. – №1. – С. 11–14.
3. Выделение, очистка и оценка серологической активности антигенов вируса бешенства / М.А.Ефимова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – №4. – С. 27–30.
4. Разработка и применение иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих для выявления возбудителей кампилобактериоза, лептоспироза / И.В. Жарникова [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2006. – №1. – С. 12–14.
5. Мовсесянц, А.А. Бешенство: особенности современной эпизоотической и эпидемиологической ситуации в России / А.А.Мовсесянц // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2011. – №5(60). – С.4–5.
6. Черкасский, Б.Л. Эпидемиологический надзор за бешенством в Российской Федерации / Б.Л.Черкасский, О.С.Хадарцев, А.А.Мовсесянц // Бюллетень «Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики». – 2005. – №1(37). – С. 7–8.
7. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K.Laemmli // Nature. – 1970. – № 227 (5259). – P. 680–5.
8. Meslin, F.X. Laboratory techniques in rabies / F.X.Meslin, M.M.Kaplan, H.Koprowski // Laboratory techniques in rabies. – 4-th ed. – Geneva: WHO, 1996. – P. 9–27.

EVALUATION OF SUITABILITY OF THE ISOLATED ANTIRABIC GLOBULINS FOR METHODS OF LABORATORY DIAGNOSIS: ELISA AND MFA

¹Efimova M.A. – Doctor of Biological Sciences; ¹Mukhamedzhanova A.G. – postgraduate;
¹Chernov A.N. – Doctor of Biological Sciences; ^{1,2}Khaertynov K.S. – Candidate of Biological Sciences;
¹Akhmadeev R.M. – Candidate of Veterinary Sciences; ¹Nasyrov Sh.M. – Candidate of Veterinary Sciences;
¹Samerkhanov I.I. – Researcher Officer; ¹Aleeva Z.Z. – Researcher Assistant;
¹Arutyunyan G.S. – Researcher Assistant; ¹Yarullina G.M. – Researcher Assistant.

¹Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan (e-mail: antonina-95@yandex.ru).

²Kazan State Medical Academy – Branch Campus of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Kazan.

To isolate and purify antirabic immunoglobulins we used serum of sheep immunized with a highly purified rabies virus antigen from the strain "Ovechiy" of the GNKI. The globulin isolating was carried out by the method of triple reprecipitation with a saturated solution of ammonium sulfate, with subsequent dialysis in the buffer system, which resulted in the preparation of purified fractions. For the preliminary evaluation of these fractions activity we used electrophoresis in a 7.5% separating polyacrylamide gel. This characteristic of the investigated fractions was confirmed by the method of indirect immunoenzyme (ELISA) with homologous and heterologous antigens of the rabies virus. Subsequently, the obtained immunoglobulins were labelled with fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) followed by gel filtration using gel Sefadex G-250. The activity and specificity of fluorescent immunoglobulins were assessed by the method of fluorescent antibodies (MFA) in brain prints of mice infected with rabies virus and Aujeszky's disease virus, in brain prints of intact mice as well as according to indicators of concentration of labelled protein and the molar ratio of FITC / protein. We identified the most active immunoglobulin fractions and determined their optimal working dilutions, that in prospects will make it possible their using as specific components of express test systems to diagnosing rabies based on ELISA and MFA.

KEYWORDS: rabies virus, antirabic immunoglobulin, electrophoresis, immunoenzyme analysis, immunofluorescence.

References

1. Gulyukin, A.M. Znachimost sovremennykh metodov laboratornoy diagnostiki i indikatsii vzbuditelya beshenstva dlya immunologicheskogo monitoringa dannogo zoonoza [The importance of modern methods of laboratory diagnosis and indications of rabies for the immunological monitoring of this zoonosis] / A.M.Gulyukin // Voprosy virusologii. – 2014. – № 3. – P. 5–10.
2. Monitoring beshenstva u dikih zhivotnykh v Bryanskoj oblasti [Monitoring of rabies in wild animals in the Bryansk region] / A.L.Elakov [et al.] // Veterinariya. – 2015. – №1. – P. 11–14.
3. Vydelenie, ochistka i otsenka serologicheskoy aktivnosti antigenov virusa beshenstva [Isolation, purification and evaluation of serological activity of rabies virus antigens] / M.A.Efimova [et al.] // Problemy osobo opasnykh infekciy. – 2017. – № 4. – P. 27–30.
4. Razrabotka i primenenie immunoglobulinov diagnosticheskikh fluoesciruyushchih dlya vyavleniya vzbuditelya kampilobakterioza, leptospiroza [Development and using immunoglobulins diagnostic fluorescent for detection of causative agents of campylobacteriosis, leptospirosis] / I.V.Zharnikova [et al.] // Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza. – 2006. – №1. – P. 12–14.
5. Movsesyants, A.A. Beshenstvo: osobennosti sovremennoy epizooticheskoy i epidemiologicheskoy situatsii v Rossii [Rabies: features of the modern epizootic and epidemiological situation in Russia] / A.A.Movsesyants // Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika. – 2011. – №5(60). – P.4–5.
6. Cherkasskiy, B.L. Epidemiologicheskij nadzor za beshenstvom v Rossiyskoy Federatsii [Epidemiological surveillance of rabies in the Russian Federation] / B.L.Cherkasskiy, O.S.Hadartsev, A.A.Movsesyants // Buletten «Vakcinationsiya. Novosti vaktsinoprofilaktiki». – 2005. – №1 (37). – P. 7–8.
7. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – № 227(5259). – P. 680–5.
8. Meslin, F.X. Laboratory techniques in rabies / F.X.Meslin, M.M.Kaplan, H.Koprowski // Laboratory techniques in rabies. 4-th ed. – Geneva: WHO, 1996. – P. 9–27.

СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИПЕПТИД rMPV70 ВЫЯВЛЯЕТ СПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

^{1,2}Э.А.Шуралев – кандидат ветеринарных наук, доцент, вед.н.с.; ¹Т.Х.Фаизов – доктор ветеринарных наук, профессор, зав. лабораторией; ¹Н.И.Хаммадов – кандидат биологических наук, вед.н.с.; ¹К.А.Осянин – кандидат биологических наук, ст.н.с.; ¹К.В.Усольцев – кандидат ветеринарных наук, вед.н.с.; ²Н.М.Александрова – кандидат биологических наук, вед.н.с.

¹ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г.Казань (420008, г. Казань, Научный городок-2, тел. +7(843) 239-53-20, e-mail: vniivi@mail.ru)

²ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г.Казань (420008, г.Казань, ул.Кремлевская, 18, тел.+7 (843) 233-71-09, e-mail:public.mail@kpfu.ru).

Рассматривается оценка антигенной активности сконструированного синтетического полипептида иммунного эпитопа rMPV70 для выявления специфических антител при туберкулезе крупного рогатого скота (КРС). Биоинформационным анализом была определена антигенная детерминанта белка rMPV70, наиболее специфичная для вирулентных штаммов *Mycobacterium bovis*. Далее был сконструирован и синтезирован полипептид rMPV70t, который использовали в качестве антигена в иммуноферментном анализе (ИФА). Показания читки реакции ИФА с образцами проб сыворотки крови 54 животных из благополучных хозяйств составляли 0,050...0,350 OD, что интерпретируется как отрицательный результат. При исследовании 47 образцов сыворотки крови КРС из неблагополучных по туберкулезу хозяйств методом ИФА, антитела к rMPV70t выявлялись на высоком уровне (0,500...3,500 OD) у 19 животных и интерпретировались как положительные, у 6 животных – они были на низком уровне (0,360...0,470 OD) и интерпретировались как сомнительные. У 22 животных специфические антитела не выявлялись, а результаты читки реакции находились в диапазоне 0,050...0,350 OD, что интерпретируется как отрицательный результат. Средние значения показателя оптической плотности результатов ИФА в группах составили: 0,175±0,102 OD для отрицательных, 0,415±0,044 OD – для сомнительных, и 1,199±0,788 OD – для положительных проб. Статистически подтверждено, что интерпретация результатов ИФА с антигеном rMPV70t достоверна ($p < 0,05$) при использовании критериев: $\leq 0,350$ OD – результат отрицательный; 0,350...0,500 OD – результат сомнительный; $\geq 0,500$ OD – результат положительный. Таким образом, установлена высокая антигенная активность rMPV70t для выявления специфических антител при туберкулезе КРС.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Mycobacterium bovis*, туберкулез, крупный рогатый скот, антигены, антитела, серологическая диагностика.

Туберкулез остается одной из главных проблем современности и создание современных высокоэффективных методов диагностики этого заболевания является актуальным. В настоящее время для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота (КРС) используется туберкулиновый тест, который последние годы становится малоэффективным в борьбе с этим заболеванием. Регулярно выявляются животные с неспецифическими реакциями на туберкулин, связанными, в том числе, и с циркулирующей нетуберкулезных микобактерий [1], что требует усовершенствования их дифференциации. С этой целью продолжается работа по повышению эффективности симультанной туберкулиновой пробы с ППД для млекопитающих и комплексного аллергена из атипичных микобактерий [2]. Проводятся испытания нового рекомбинантного аллергена [3].

С другой стороны, существует проблема персистенции L-форм *Mycobacterium bovis* в организме КРС с латентным течением заболевания, способных реверсировать в исходный бактериальный вид, что является фактором рецидива туберкулеза в оздоров-

ленных хозяйствах [4]. Такие животные часто дают отрицательную реакцию на туберкулин, а для эффективной диагностики скрытых форм туберкулеза требуются более глубокие исследования иммунного статуса животных с определением фагоцитарной активности крови и цитохимическим исследованием лейкоцитов на миелопероксидазу [5].

Большие успехи достигнуты в совершенствовании ПЦР-индикации *M.bovis* [6, 7], но диагностическая эффективность данного метода высока только при пост-мортальных исследованиях.

Для более совершенного контроля распространения инфекционных заболеваний необходимы инновационные подходы, с использованием современных иммуноаналитических и молекулярно-биологических методов. При этом актуальной проблемой в борьбе с туберкулезом остается прижизненная лабораторная диагностика данного заболевания у КРС и других видов животных. Поиск высокоспецифичных антигенов *M.bovis* и *M.tuberculosis* даёт предпосылки внедрения в ближайшем будущем серологической, в том числе дифференциальной, диагностики туберкулеза [8,

9]. Особое место в этом направлении занимают иммунохроматографические экспресс-тесты [10, 11]. Успешные результаты получены при использовании тест-системы на основе дот-блот иммуноферментного анализа для проведения скрининговых исследований на туберкулез [12]. Более информативными в этом плане являются мультиплексные технологии, позволяющие проводить анализ с выявлением антител к нескольким антигенам одновременно [13].

Одним из перспективных направлений является разработка серологических тест-систем на основе синтетических пептидов иммуногенных эпитопов антигенов *M. bovis* [14]. Ранее проведенными исследованиями были выявлены микобактериальные белки, среди которых потенциальными антигенными свойствами обладают секреторные (ESAT-6 и CFP-10) и структурные (MPB70 и MPB83) белки [15], которые также позволяют дифференцировать вакцинированных BCG и инфицированных *M. bovis* животных [16] и идентифицировать животных со скрытым течением туберкулеза, реагирующих отрицательно на туберкулин [17].

Целью данной работы была оценка антигенной активности сконструированного синтетического полипептида иммуногенного эпитопа белка MPB70 для выявления специфических антител при туберкулезе КРС.

Материалы и методы. Для конструирования синтетического антигена на основе аминокислотных последовательностей иммуногенного эпитопа (антигенных детерминант) белка MPB70 (*M. bovis*) применяли методы биоинформатики с использованием инструментов программы «Standard Protein BLAST» и ресурсов базы данных «National Center for Biotechnology Information» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Для определения основных физико-химических показателей пептидов на стадии конструирования использовали программу «Peptide property calculator» («Innovagen AB», Швеция) (<https://pepcalc.com/>). Синтез сконструированных пептидов провели в компании ООО «АТГ Сервис Ген». Полученный материал подвергли хроматографическому анализу на чистоту целевого продукта. Данный синтетический полипептид использовали в качестве испытуемого антигена.

Биологическим материалом для исследований служили пробы сыворотки крови КРС из неблагополучных (n=47) и благополучных (n=54) по туберкулезу хозяйств (из коллекции ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»).

Сыворотки крови исследовали иммуноферментным анализом (ИФА). Антиген в концентрации 5 мкг/мл в карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,0) иммобилизовали на дно лунок высокосвязывающих планшетов (Corning) в течение 16 ч при t 4°C с последующей 4-х кратной промывкой фосфатно-буферным раствором с 0,05% твина-20 (ФБР-Т). В лунки планшет вносили блокирующий буфер (ФБР-Т с 1% блокирующего агента (БА)) с экспозицией 2 ч при t 37°C с последующей 4-х кратной промывкой ФБР-Т. Сыворотки крови в разведении 1:200 в ФБР-Т с 1% БА

инкубировали в течение 60 мин при t 30°C с последующей 4-х кратной промывкой ФБР-Т. Далее вносили кроличьи антитела против IgG КРС, меченные пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich), которые инкубировали в течение 30 мин при t 30°C с последующей 4-х кратной промывкой ФБР-Т. Визуализацию продуктов реакции проводили при помощи тетраметилбензидинового субстрата (ТМБ), который инкубировали в течение 15 мин при 30°C, с последующей остановкой реакции 0,1M серной кислотой. Читку реакции осуществляли на спектрофотометре Multiskan GO (Thermo Scientific), при этом оценивали уровень антител в оптических единицах (OD) при длине волны 450 нм.

При статистической обработке результатов использовали программу ANOVA (Vassar Stats) (<http://vassarstats.net/>), определили показатели: среднее значение (M), стандартное отклонение (m), медиана (F(x)), максимальное (X_{max}) и минимальное (X_{min}) значения, коэффициент асимметрии (γ₁), дисперсия случайной величины (D[X]), коэффициент эксцесса (γ₂). Для оценки достоверности результатов определяли показатель Student's t-test.

Результаты исследований. Используя базы данных PubMed, определена антигенная детерминанта (иммуногенный эпитоп) белка MPB70, наиболее специфичная для вирулентных штаммов *M. bovis*. В результате был сконструирован полипептидный антиген rMPB70, который имеет следующую аминокислотную последовательность: SVQGMSSQDPVAVAAASNNPEL.

В виду низкой адсорбции синтетического полипептида к белковому носителю N-конца, была необходима его модификация без потери функционально важных участков. Нами была проведена модификация полипептида (rMPB70m) с добавлением линк-последовательности (L-), после чего вновь были оценены физико-химические показатели (табл. 1). Модификацией было увеличено количество аминокислотных последовательностей до 25, молекулярная масса составила 2431 г/моль. Добавление линк-последовательности не повлияло на коэффициент экстинкции, а показатели изоэлектрической точки и суммарного заряда сдвинулись в более эффективную позицию. Растворимость в воде синтетического полипептида rMPB70m после модификации также повысилась. Однако для такого рода пептидов необходима предварительная обработка с использованием ДМСО и/или раствора с крайне щелочной рН.

Полученный синтетический полипептид был исследован на чистоту целевого продукта хроматографическим методом. Чистота продукта составила 98%. Синтезированный полипептид удовлетворял поставленным при дизайне и конструировании требованиям, что позволило использовать его в дальнейшем в качестве антигена в ИФА.

Для интерпретации полученных результатов ИФА с rMPB70m использовали следующие критерии оценки:

Таблица 1

Основные характеристики сконструированного полипептида rMPB70 и его модифицированного варианта MPB70m

| Показатель | rMPB70 | rMPB70m |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Химическая формула последовательности | C83N136N24O32S1 | C99N164N30O39S1 |
| Количество аминокислотных остатков | 20 | 25 |
| Молекулярная масса | 2014 г/моль | 2431 г/моль |
| Коэффициент экстинкции | 0 M-1cm-1 | 0 M-1cm-1 |
| Изоэлектрическая точка | pI = pH 0,63 | pI = pH 3,93 |
| Суммарный заряд при pH=7 | - 2 | - 1 |

– при значениях оптической плотности $\leq 0,350$ OD – результат считается отрицательным,
 – при значениях оптической плотности $0,350...0,500$ OD – результат считается сомнительным,
 – при значениях оптической плотности $\geq 0,500$ OD – результат считается положительным.

Показания читки реакции ИФА с образцами проб сыворотки крови 54 животных из благополучных хозяйств составляли $0,050...0,350$ OD (рисунок), что интерпретируется как отрицательный результат. При

исследовании 47 образцов сыворотки крови КРС из неблагополучных по туберкулезу хозяйств методом ИФА, антитела к синтетическому пептиду MPB70 выявлялись на высоком уровне ($0,500...3,500$ OD) у 19 животных и интерпретировались как положительные, у 6 животных – они были на низком уровне ($0,360...0,470$ OD) и интерпретировались как сомнительные. У 22 животных специфические антитела не выявлялись, а результаты читки реакции находились в диапазоне $0,050...0,350$ OD, что интерпретируется как отрицательный результат.

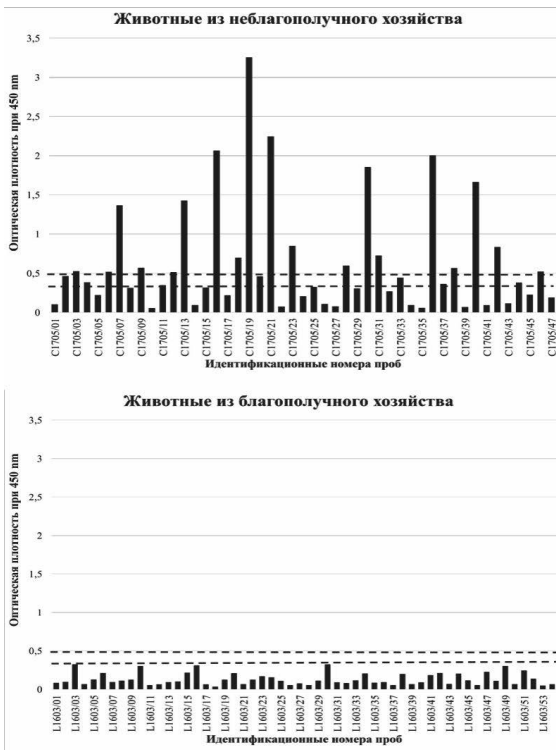


Рис. Результаты ИФА к антигену rMPB70m с образцами сывороток крови КРС из благополучного и неблагополучного по туберкулезу хозяйств (пунктирной линией выделен участок, где результат интерпретируется как сомнительный).

Отсутствие положительных результатов ИФА при исследовании 54 голов КРС из благополучного по туберкулезу хозяйства указывает на специфичность изучаемого антигена рМРВ70m и невозможность неспецифических реакций «антиген-антитело». Следовательно, положительные результаты ИФА с данным антигеном означают наличие специфических антител в исследуемой сыворотке крови, указывающих на развитие туберкулезного инфекционного процесса в организме животного.

В данном исследовании мы использовали 47 образцов сыворотки крови КРС из благополучного по туберкулезу хозяйства. Отбор проб крови осуществлялся до проведения туберкулинизации. Понятно, что среди этих 47 голов туберкулезный процесс был на разных стадиях, и, естественно, не всё поголовье было заражено. Этим объясняется разнообразие уровня антител к антигену рМРВ70m, выявляемого в ИФА.

К тому же белок МРВ70 не во всех случаях приводит к образованию специфических антител в организме КРС, инфицированного *M. bovis*, о чем свидетельствуют ранее проведенные исследования с использованием рекомбинантного антигена МРВ70 [15]. В связи с этим рекомендуется проводить исследования по выявлению сывороточных специфических антител к нескольким антигенам *M. bovis* [18].

Для получения ответа на вопрос о диагностической значимости сконструированного и синтезированного антигена был проведен статистический анализ полученных результатов ИФА в проекции сопоставления их согласно интерпретации: для отрицательной, сомнительной и положительной групп. Средние значения показателя оптической плотности результатов ИФА в группах составили: $0,175 \pm 0,102$ OD для отрицательных, $0,415 \pm 0,044$ OD для сомнительных, и $1,199 \pm 0,788$ OD – для положительных проб (табл. 2).

Таблица 2

Статистические показатели результатов ИФА с антигеном рМРВ70m

| Группа | M | m | F(x) | X _{max} | X _{min} | γ ₁ | D[X] | γ ₂ |
|---------------|-------|-------|-------|------------------|------------------|----------------|--------|----------------|
| Отрицательные | 0,175 | 0,102 | 0,152 | 0,346 | 0,054 | 0,335 | 0,0103 | 1,514 |
| Сомнительные | 0,415 | 0,044 | 0,413 | 0,464 | 0,364 | 0,000 | 0,0019 | 0,000 |
| Положительные | 1,199 | 0,788 | 0,833 | 3,254 | 0,514 | 1,029 | 0,6230 | 3,120 |

В таблице даны следующие показатели: среднее значение (M), стандартное отклонение (m), медиана (F(x)), максимальное (X_{max}) и минимальное (X_{min}) значения, коэффициент асимметрии (γ₁), дисперсия случайной величины (D[X]), коэффициент эксцесса (γ₂).

Оценки различия в указанных группах по критерию Student's t-test (табл. 3) указывают на достоверность полученных результатов. Таким образом, статистически подтверждается, что в указанных выше условиях и режимах проведения ИФА с ан-

тигеном рМРВ70m интерпретация результатов будет достоверной при использовании критериев: $\leq 0,350$ OD – результат отрицательный; $0,350 \dots 0,500$ OD – результат сомнительный; $\geq 0,500$ OD – результат положительный.

Таблица 3

Достоверность различий в разных группах для p<0,05

| Показатель | Сравниваемые группы | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | положительная v's отрицательная | сомнительная v's положительная | сомнительная v's отрицательная |
| Степень свободы | 19 | 18 | 20 |
| Абсолютное t-распределение Стьюдента | 5,619 | 4,314 | 8,570 |
| Критическое t-распределение Стьюдента | 2,093 | 2,101 | 2,086 |
| Абсолютное > критическое | ДА | ДА | ДА |
| Результат | достоверно | достоверно | достоверно |

Статистической обработкой результатов установлена высокая антигенная активность сконструированного синтетического полипептида рМРВ70m для выявления специфических антител при туберкулезу КРС. Полученные данные открывают перспективы серологической диагностики туберкулеза КРС, эффективность (высокая чувствительность и специфичность) которой можно будет достичь при использовании также

синтетических полипептидов антигенных детерминант и других антигенов (ESAT-6, CFP-10, МРВ83 и других) в комбинации с антигеном рМРВ70m, что определяет дальнейшую научную работу в этом направлении.

Заключение. Биоинформационным анализом сконструирован синтетический полипептидантгенной детерминанты белка МРВ70 *M. bovis*, физико-химические показатели которого после

модификации с добавлением линк-последовательности (pMPB70m) были удовлетворительными для использования последнего в качестве антигена в ИФА. Проведенными исследованиями проб сыворотки крови КРС, установлена и подтверждена высокая антигенная активность синтетического

полипептида pMPB70m для выявления специфических антител при туберкулезе. Дальнейшие исследования секреторных и структурных белков *M. bovis* позволят подобрать комбинации синтетических антигенов для эффективной серологической диагностики туберкулеза КРС.

Литература

1. Проблема неспецифических реакций на туберкулин и совершенствование симультанной пробы для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / А.Х.Найманов, Г.И.Устинова, Н.Г.Толстенко [и др.] // Ветеринария. – 2015. – № 6. – С. 20–25.
2. Совершенствование симультанной туберкулиновой пробы для дифференциации неспецифических реакций у КРС / А.Х.Найманов, Г.И.Устинова, Н.Г.Толстенко [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2016. – № 1. – С. 11–13.
3. Ощепков, В.Г. Новый перспективный аллерген (НРА) для диагностики туберкулеза у животных / В.Г.Ощепков, Н.Н.Кошечев // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29, №10. – С. 91–94.
4. Макаров, Ю.А. Выявление некультивируемых форм микобактерий туберкулеза при латентном течении инфекции / Ю.А.Макаров, Н.Е.Горковенко, И.Ю.Макаров // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». – 2017. – № 2. – С. 54–58.
5. Макаров, Ю.А. Выявление крупного рогатого скота со скрытым течением туберкулезной инфекции / Ю.А. Макаров, Н.Е.Горковенко // Ветеринария Кубани. – 2015. – № 6. – С. 4–5.
6. ПЦР на современном этапе борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота / А.Х.Найманов, Е.П.Вангели, Н.Г.Толстенко [и др.] // Ветеринария. – 2016. – № 2. – С. 20–23.
7. Дифференциальная диагностика туберкулеза у человека и животных с применением мультиплексной тест-системы / Н.М.Александрова, Н.И.Хаммадов, Э.А.Шуралев [и др.] // Молекулярная диагностика 2017: сб. трудов IX Всерос. науч.-практ. конф. с Междунар. участием. – М: ООО фирма «Юлис», 2017. – С. 493.
8. Валеева, А.Р. Влияние интоксикации кадмием на антителогенез кроликов при экспериментальном инфицировании *Mycobacterium bovis* / А.Р.Валеева // Ветеринарный врач. – 2016. – № 3. – С. 48–55.
9. Функционирование и серологическая активность экстракта клеток и продуктов экспрессии *Mycobacterium bovis* / Э.А.Шуралев, К.С.Хаертынов, А.Р.Валеева [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2017. – № 3. – С. 103–105.
10. Изыскание экспресс метода диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / Р.Г.Ильязов, Т.А.Яхно, Р.А.Хамзин [и др.] // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2014. – Т. 220, №4. – С. 115–118.
11. Использование экспресс-теста Bovine TB для проведения скрининговых исследований на туберкулез крупного рогатого скота / Д.Н.Мингалеев, Р.Х.Равилов, Н.И.Садыков [и др.] // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2016. – Т. 225, №1. – С. 50–52.
12. Джакаит, Д.А. Дот-блот ИФА тест-система для выявления антител к микобактериям туберкулеза крупного рогатого скота / Д.А.Джакаит // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э.Баумана. – 2017. – Т. 231. – С. 37–40.
13. Выявление специфических антител у вапиту при туберкулезе / Э.А.Шуралев, М.Н.Мукминов, К.Велан [и др.] // Ветеринария. – 2013. – № 8. – С. 54–57.
14. Шуралев, Э.А. Микобактериальные антигены: синтетические пептиды и рекомбинантные белки / Э.А. Шуралев // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – Т. 216. – С. 403–407.
15. Multiplex immunoassay for serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle / C.Whelan, E.Shuralev, G.O'Keefe [et al.] // Clinical and Vaccine Immunology. – 2008. – Vol. 15 (12). – P. 1834–1838. doi: 10.1128/CVI.00238-08.
16. Performance of the Enferplex TB assay with cattle in Great Britain and assessment of its suitability as a test to distinguish infected and vaccinated animals / C.Whelan, A.O.Whelan, E.Shuralev [et al.] // Clinical and Vaccine Immunology. – 2010. – Vol. 17 (5). – P. 813–817. doi: 10.1128/CVI.00489-09.
17. Use of a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay to detect a subpopulation of *Mycobacterium bovis*-infected animals deemed negative or inconclusive by the single intradermal comparative tuberculin skin test / C.Whelan, E.Shuralev, H.F.Kwok [et al.] // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 2011. – Vol. 23 (3). – P. 499–503.
18. Мультиплексный ИФА с хемилюминесцентной меткой для диагностики туберкулеза у кабанов / Э.А.Шуралев, М.Н.Мукминов, А.Р.Валеева [и др.] // Ветеринария. – 2013. – № 2. – С. 25–28.

SYNTHETIC POLYPEPTIDE PMPB70 DETECTS SPECIFIC ANTIBODIES IN CATTLE WITH TUBERCULOSIS

^{1,2}Shuralev E.A. – Candidate of Veterinary Sciences; ¹Faizov T.Kh. – Doctor of Veterinary Sciences, Professor; ¹Khammadov N.I. – Candidate of Biological Sciences; ¹Osyenin K.A. – Candidate of Biological Sciences; ¹Usoltsev K.V. – Candidate of Veterinary Sciences; ^{1,2}Aleksandrova N.M. – Candidate of Biological Sciences.

¹Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan (e-mail: vnivi@mail.ru).

²Kazan Federal University, Kazan (e-mail: public.mail@kpfu.ru).

The evaluation of the antigenic activity of the engineered synthetic polypeptide of the immunogenic epitope MPB70 for the detection of specific antibodies in cattle tuberculosis (CRS) is considered. Using the bioinformatic analysis, the antigenic determinant of the MPB70 protein, the most specific for the virulent strains of *Mycobacterium bovis*, was determined. At the next step, a polypeptide pMPB70m was designed and synthesized which was used as an antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The readings of the IFA response with serum samples from 54 animals from healthy farms were 0.050 ... 0.350 OD, which was interpreted as a negative. When 47 samples of blood serum from the farm with persisting tuberculosis were tested by ELISA, the antibodies to pMPB70m were detected at a high level (0.500 ... 3.500 OD) in 19 animals and were interpreted as positive, in 6 animals the results were at a low level (0.360 ... 0.470 OD) and interpreted as inconclusive. In 22 animals, the specific antibodies were not detected, and the ELISA results were in the range of 0.050 ... 0.350 OD, which were interpreted as negative. The ELISA mean values of the optical density in the groups were: 0.175±0.102 OD for negative, 0.415±0.044 OD for inconclusive, and 1.199±0.788 OD for positive samples. The interpretation of the ELISA results with the antigen pMPB70m was statistically confirmed to be reliable ($p < 0.05$) when using the criteria: ≤ 0.350 OD – the result was negative; 0.350 ... 0.500 OD – the result was inconclusive; ≥ 0.500 OD – the result was positive. Thus, the high antigenic activity of pMPB70m for the detection of specific antibodies in cattle with tuberculosis was confirmed.

KEYWORDS: *Mycobacterium bovis*, tuberculosis, cattle, antigens, antibodies, serological diagnosis.

References

1. Problema nespetsificheskikh reaktsii na tuberkulin i sovershenstvovaniye simultannoi probi dlya diagnostiki tuberkuleza krupnogo rogatogo skota [The problem of nonspecific reaction to tuberculin and development of simultaneous probe for bovine tuberculosis diagnostics] / A.H.Naymanov, G.I.Ustinova, N.G.Tolstenko [et al.] // Veterinariya. – 2015. – № 6. – P. 20–25.
2. Sovershenstvovaniye simultannoi tuberkulinovoi probi dlya differentsiatsii nespetsificheskikh reaktsii u KRS [Development of simultaneous probe for differentiation of nonspecific reactions in cattle] / A.H.Naymanov, G.I.Ustinova, N.G. Tolstenko [et al.] // Veterinariya i kormleniye. – 2016. – № 1. – P. 11–13.
3. Oschepkov, V.G. Novyi perspektivnyi allergen (NPA) dlya diagnostiki tuberkuleza u zhivotnikh [New promising allergen (NRA) for the diagnosis of tuberculosis in animals] / V.G.Oschepkov, N.N.Koshcheev // Dostizheniya nauki i tekhniki APK. – 2015. – № 29 (10). – P. 91–94.
4. Makarov, Yu.A. Viyavleniye nekultiviruyemykh form mikobakterii tuberkuleza pri latentnom techenii infektsii [Detecting noncultivated forms *Mycobacteria* of tuberculosis at the latent course of an infection] / Yu.A.Makarov, N.E.Gorkovenko, I.Yu.Makarov // Rossiyskiy zhurnal «Problemy veterinarnoi sanitarii, gigieny i ekologii». – 2017. – № 2. – P. 54–58.
5. Makarov, Yu.A. Viyavleniye krupnogo rogatogo skota so skritym techeniem tuberkuleznoy infektsii [Identification of cattle with a hidden course of tuberculosis infection] / Yu.A.Makarov, N.E.Gorkovenko // Veterinariya Kubani. – 2015. – № 6. – P. 4–5.
6. PCR na sovremennom etape borbi s tuberkulezom krupnogo rogatogo skota [Using PCR for bovine tuberculosis control in the present time] / A.K. Naimanov, E.P. Vangely, N.G. Tolstenko [et al.] // Veterinariya. – 2016. – № 2. – P. 20–23.
7. Differentsialnaya diagnostika tuberkuleza u cheloveka i zhivotnikh s primeneniem multipleksnoi test-sistemy [Differential diagnostics of tuberculosis in humans and animals using a multiplex test system] / N.M.Aleksandrova, N.I.Khammadov, E.A.Shuralev [et al.] // Molekularnaya diagnostika 2017: proceedings of IX Russian research conference with international participation. – M.: «Yulis», 2017. – P. 493.
8. Valeeva, A.R. Vliyaniye intoksikatsii kadmiiem na antitologenez krolikov pri eksperimentalnom infitsirovani *Mycobacterium bovis* [Cadmium-intoxication impact on antibody response of experimentally *Mycobacterium bovis* infected rabbits] / A.R.Valeeva // Veterinarny vrach. – 2016. – № 3. – P. 48–55.

9. Funktsionirovaniye i serologicheskaya aktivnost ekstrakta kletok i produktov ekspressii Mycobacterium bovis [Functioning and serological activity of the extract of cells and products of Mycobacterium bovis expression] / E.A.Shuralev, K.S.Khaertynov, A.R.Valeeva [et al.] // Veterinariya i kormleniye. – 2017. – № 3. – P. 103–105.
10. Izkisnaniye ekspress metoda diagnostiki tuberkuleza krupnogo rogatogo skota [Finding a rapid method of bovine tuberculosis diagnostics] / R.G.Ilyazov, T.A.Yakhno, R.A.Khamzin [et al.] // Ucheniye zapiski Kazanskoj gosudarstvennoj akademii veterinarnoy meditsini im. N.E. Baumana. – 2014. – № 220 (4). – P. 115–118.
11. Ispolzovaniye ekspress-testa Bovine TB dlya provedeniya skringovoykh issledovaniy na tuberkulez krupnogo rogatogo skota [Using express-test Bovine TB for undertaking screening studies on bovine tuberculosis] / D.N.Mingaleev, R.Ch.Ravilov, N.I.Sadykov [et al.] // Ucheniye zapiski Kazanskoj gosudarstvennoj akademii veterinarnoy meditsini im. N.E.Baumana. – 2016. – № 225 (1). – P.50–52.
12. Jakait, J.A. Dot-blot IFA test-sistema dlya viyavleniya antitel k mikobakteriyam tuberkuleza krupnogo rogatogo skota [Dot-blot immunoanalysis test-system for the detection of antibodies to Mycobacteria of bovine tuberculosis] // Ucheniye zapiski Kazanskoj gosudarstvennoj akademii veterinarnoy meditsini im. N.E.Baumana. – 2017. – № 231. – P. 37–40.
13. Viyavleniye spetsificheskikh antitel u vapiti pri tuberkuleze [Detection of specific antibodies in elk infected by tuberculosis] / E.A.Shuralev, M.N.Mukminov, C.Whelan [et al.] // Veterinariya. – 2013. – № 8. – P. 54–57.
14. Shuralev, E.A. Mikobakterialnye antigeny: sinteticheskie peptidy i rekombinantnye belki [Mycobacterial antigens: synthetic peptides and recombinant proteins] / E.A.Shuralev // Ucheniye zapiski Kazanskoj gosudarstvennoj akademii veterinarnoy meditsini im. N.E.Baumana. – 2013. – № 216. – P. 403–407.
15. Multiplex immunoassay for serological diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle / C.Whelan, E.Shuralev, G.O'Keeffe [et al.] // Clinical and Vaccine Immunology. – 2008. – № 15 (12). – P. 1834–1838. doi: 10.1128/CVI.00238-08.
16. Performance of the Enferplex TB assay with cattle in Great Britain and assessment of its suitability as a test to distinguish infected and vaccinated animals / C.Whelan, A.O.Whelan, E.Shuralev [et al.] // Clinical and Vaccine Immunology. – 2010. – № 17 (5). – P. 813–817. doi: 10.1128/CVI.00489-09.
17. Use of a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay to detect a subpopulation of Mycobacterium bovis-infected animals deemed negative or inconclusive by the single intradermal comparative tuberculin skin test / C.Whelan, E.Shuralev, H.F.Kwok [et al.] // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 2011. – № 23 (3). – P. 499–503.
18. Multipleksniy IFA s khemilyuminescentoy metkoy dlya diagnostiki tuberkuleza u kabanov [Multiplex ELISA with chemiluminescent label for the diagnosis of tuberculosis in wild boars] / E.A.Shuralev, M.N.Mukminov, A.R.Valeeva [et al.] // Veterinariya. – 2013. – № 2. – P. 25–28.

УДК 619:616.98:579.841.93

ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БРУЦЕЛЛ ВИДА ABORTUS, НАХОДЯЩИХСЯ В РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ДИССОЦИАЦИИ

**М.А.Косарев – кандидат биологических наук, зав. сектором по изучению бруцеллеза;
А.М.Фомин – доктор ветеринарных наук, профессор, гл.н.с.; Г.М.Сафина – кандидат ветеринарных наук, вед.н.с.; С.А.Григорьева – мл.н.с.; Л.А.Тухватуллина – мл.н.с.**

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г.Казань (420075, Казань, Научный городок – 2, тел.+7(843)239-53-31, e-mail: vnivi@mail.ru)

Целью исследования являлось изучение культурально-морфологических свойств бруцелл, находящихся в различной степени диссоциации. Культурально-морфологические свойства бруцелл штамма *B.abortusR-1096* (R-форма) изучали в сравнении с штаммами *B.abortus* 19 (S-форма) и 82 (SR-форма) в комплексе тестов: скорость и характер роста на питательных селективных средах – печеночно-пептонноглюкозо-глицериновом агаре (ППГА), на питательных средах с красками (тионин 1:25 тыс., 1:50 тыс., 1:100 тыс; фуксин 1:50 тыс., 1:100 тыс.), способность образовывать сероводород, потребность в повышенном содержании углекислого газа, окраска колоний по Уайт-Вилсону, чувствительность к пенициллину (0,5; 5; 50; 100 ЕД/мл), антигенные свойства культур с использованием специфических бруцеллезных S- и R-сывороток и монорецепторных «А» и «М» сывороток,

проба термоагглютинации, проба с трипафлавином (акрифлавином). Культура штамма R-1096 во все сроки учета термоагглютинации, а также в пробе с трипафлавином показывала положительные результаты. Наиболее интенсивное выделение сероводорода было у штамма R-1096 в сравнении с другими вакцинными штаммами V.abortus 19 и 82. Штамм R-1096 рос во всех разведениях анилиновых красок, и наблюдали сплошной рост на средах, где концентрация антибиотика составляла 0,5 – 5,0 и 50 ЕД/мл. Изучение культурально-морфологических свойств бруцелл, находящихся в различной степени диссоциации показало отличительные свойства культуры штамма R-1096 в сравнении с другими исследуемыми штаммами во всех проведенных тестах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бруцеллез, диссоциированная форма, культурально-морфологические свойства.

Бруцеллез относится к наиболее распространенным заболеваниям, и полная его ликвидация является актуальной задачей, стоящей перед ветеринарной и медицинской наукой [7-12]. Сложность этой проблемы обуславливается рядом особенностей биологии возбудителя этого заболевания.

У бруцелл описаны явления диссоциации с образованием R- и S-форм [1-3]. Из организма животных и человека нередко выделяли диссоциированные формы бруцелл [4].

В хозяйствах с длительным неблагополучием по бруцеллезу наиболее проявляется действие различных факторов на антигенную структуру бруцелл, отсюда идет увеличение количества атипичных и диссоциированных форм бруцелл [5, 6].

Целью наших исследований было изучение культурально-морфологических свойств бруцелл вида abortus, находящихся в различной степени диссоциации.

Материалы и методы. Для достижения поставленной цели проведена серия исследований по изучению культурально-морфологических свойств бруцелл штамма V.abortus R-1096, полученного на печено-пептонном глюкозо-глицериновом агаре. В качестве контролей при этом были использованы штаммы V.abortus 19 (S-форма) и 82 (SR-форма). В число рекомендуемых методов вошли комплекс тестов: скорость и характер роста на питательных селективных средах, рост на печеночно-пептонном глюкозо-глицериновом агаре (ППГА), на питательных средах с красками (тионин 1:25 тыс., 1:50 тыс., 1:100 тыс.; фуксин 1:50 тыс., 1:100 тыс.), потребность в повышенном содержании углекислого газа, способность образовывать

сероводород, окраска колоний по Уайт-Вилсону, чувствительность к пенициллину (0,5; 5; 50; 100 ЕД/мл), антигенные свойства культур с использованием специфических бруцеллезных S- и R-сывороток и монорецепторных «А» и «М» сывороток, проба термоагглютинации, проба с трипафлавином (акрифлавином).

Результаты исследований. Установлено, что характер роста культур на ППГА через одни сутки выглядел в виде прозрачного налета на поверхности питательной среды. На вторые сутки со дня посева рост культуры штамма R-1096 был мутнее других. Через трое суток культуры штаммов R-1096 и 82 росли в виде матового налета, а культура штамма 19 была прозрачной, блестящей и соломенно-желтого цвета.

При определении потребности для роста углекислого газа было установлено, что культуры всех вакцинных штаммов не нуждались в его повышенном содержании. Они более обильно росли под ватно-марлевыми пробками.

Культуры штаммов 19 и 82 показывали отрицательную пробу термоагглютинации. Во все сроки учета столбик жидкости оставался равномерно мутным, а с культурой штамма R-1096 наблюдали положительный результат во все сроки учета, при этом взвесь бруцелл оседала на дно пробирки, а столбик жидкости оставался прозрачным.

У штамма 19 отмечали отрицательную пробу с трипафлавином, у штамма 82 регистрировали положительную пробу с оценкой на два креста, а у штамма R-1096 – положительную с оценкой на 4 креста, при этом на стекле образовывались крупные хлопья, а жидкость оставалась прозрачной (табл.1).

Таблица 1

Результаты проб термоагглютинации и с трипафлавином

| Наименование штамма | Сроки учета пробы термоагглютинации | | | Проба с трипафлавином |
|---------------------|-------------------------------------|-----|------|-----------------------|
| | Спустя 30 мин | 1 ч | 24 ч | |
| V. abortus R-1096 | + | + | + | ++++ |
| V. abortus 19 | - | - | - | - |
| V. abortus 82 | - | - | - | ++ |

Вакцинные штаммы V. abortus 19, 82 и R-1096 в процессе метаболизма на питательных средах выделяли сероводород. Интенсивность его выделения была более выражена у штамма R-1096.

При определении способности роста культур с красками, установили, что штамм 19 не рос на средах, содержащих тионин, а на агаре с фуксином наблюдали интенсивный рост (табл.2).

Таблица 2

Результаты роста культур штаммов *B. abortus* 19, R-1096 и 82 на средах с красками

| Наименование штамма | Рост на средах с красками | | | | |
|--------------------------|---------------------------|----------|-----------|----------|-----------|
| | Тионин | | | Фуксин | |
| | 1:25 тыс | 1:50 тыс | 1:100 тыс | 1:50 тыс | 1:100 тыс |
| <i>B. abortus</i> R-1096 | + | + | + | + | + |
| <i>B. abortus</i> 19 | - | - | - | + | + |
| <i>B. abortus</i> 82 | + | + | + | + | + |

Культуры штаммов 82 и R-1096 росли на питательных средах со всеми разведениями анилиновых красок.

Штамм 19 показывал обильный урожай бакте-

риальной массы на среде с содержанием 0,5 и 5 ЕД антибиотика на 1 мл среды. При более высокой концентрации пенициллина рост данной культуры отсутствовал (табл. 3).

Таблица 3

Оценка результатов роста культур штаммов *B. abortus* 19, R-1096 и 82 на средах с пенициллином

| Наименование штамма | Концентрация антибиотика в 1 мл среды | | | |
|--------------------------|---------------------------------------|---------|----------|-----------|
| | 0,5 ЕД/мл | 5 ЕД/мл | 50 ЕД/мл | 100 ЕД/мл |
| <i>B. abortus</i> R-1096 | + | + | + | - |
| <i>B. abortus</i> 19 | + | + | - | - |
| <i>B. abortus</i> 82 | + | + | + | - |

Культуры штаммов 82 и R-1096 давали сплошной рост на средах, где концентрация антибиотика составляла от 0,5 до 50 ЕД/мл.

При окрашивании колоний бруцелл по Уайт-Вилсону колонии штамма 19 не окрашивались. Они имели желтый центр и фиолетовый ободок, это объясняется тем, что *B. abortus* штамм 19 – типичная культура, находящаяся в S-форме, а колонии штамма 82 также имели желтый центр и фиолетовый ободок, но по всему желтому фону были фиолетовые вкрапления или исчерченность, это свидетельствует о том, что данная культура находится в SR-форме.

Колонии штамма R-1096 полностью были фиолетового цвета, так как данный штамм находится в R-форме.

Культура штамма 19, находящаяся в S-форме, реагировала только с S-агглютинирующей и «А» монорецепторными сыворотками и не вступала в реакции с R-агглютинирующей и «М» монорецепторными сыворотками, а культуры штамма 82, находящиеся в SR- и RS-формах, агглютинировали в S-, R- и «А» сыворотках и не вступали в реакцию с «М» сывороткой. В то же время культура штамма R-1096, находящаяся в R-форме, положительно реагировала лишь с R-сывороткой, при отрицательных результатах со всеми другими сыворотками (табл. 4).

Таблица 4

Результаты реакции агглютинации с S-, R-агглютинирующими и «А», «М» монорецепторными сыворотками

| Наименование штамма | Реакция агглютинации с сыворотками | | | |
|------------------------|------------------------------------|---|-----------------|-----|
| | агглютинирующие | | монорецепторные | |
| | R | S | «А» | «М» |
| <i>B. abortus</i> 19 | - | + | + | - |
| <i>B. abortus</i> 82 | + | + | + | - |
| <i>B. abortus</i> 1096 | + | - | - | - |

Заключение. Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод, что культура штамма R-1096 во все сроки учета термоагглютинации, а также в пробе с трипафлавином давала положительные результаты на четыре креста. Наиболее интенсивное выделение сероводорода было у штамма R-1096 по сравнению с аналогичным показателем штаммов *B. abortus* 19 и 82. Культура штамма R-1096 росла во всех разведениях анилиновых красок, и

при этом наблюдали сплошной рост на средах, где концентрация антибиотика составляла 0,5-5,0 и 50 ЕД/мл.

Таким образом, изучение культурально-морфологических свойств бруцелл, находящихся в различной степени диссоциации свидетельствует о том, что культура штамма *B. abortus*R-1096 по своим свойствам отличается от штамма *B. abortus* 19 и 82 во всех проведенных тестах.

Литература

1. The new global map of human brucellosis / G.Pappas [et al.] // *Lancet Infect Dis.* – 2006. – Vol. 6. – P. 91–99.
2. Brucella as a biological weapon / G.Pappas, P.Panagopoulou, L.Christou, N.Akritidis // *Cellular and molecular life sciences CMLS.* – 2006. – Vol. 63. – P. 2229–2236.
3. Solera, J. Update on brucellosis: therapeutic challenges / J.Solera // *International journal of antimicrobial agent.* – 2010. – Vol. 36. – P. 18–20.
4. Modulation of Brucella-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication / M.Watarai [et al.] // *Cellular Microbiology.* – 2002. – Vol. 4. – P. 341–355.
5. Pizarro-Cerda, J. Invasion and intracellular trafficking of Brucella abortus in nonphagocytic cells / J.Pizarro-Cerda, E.Moreno, J.P.Gorvel // *Microbes and Infection.* – 2000. – Vol. 2. – P. 829–835.
6. Vector development for the expression of foreign proteins in the vaccine strain Brucella abortus S19 / D.J.Comerci [et al.] // *Infect Immun.* – 1998. – Vol. 66. – P. 3862–3866.
7. Metabolic control of virulence genes in Brucella abortus. HutC coordinates virB expression and the histidine utilization pathway by direct binding to both promoters / R.Sieira [et al.] // *J Bacteriol.* – 2010. – Vol. 192. – P. 217–224.
8. Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in Brucella abortus / J.Lamontagne [et al.] // *J Proteome Res.* – 2007. – Vol. 6. – P. 1519–1529.
9. Жилина, Н.Я. Бруцеллез в Российской Федерации в 2001 – 2005 годах / Н.Я.Жилина // *Санитарный врач.* – 2007. – № 6. – С. 14–21.
10. Русанова, Д.В. Эпидемиологические особенности бруцеллеза в Ставропольском крае / Д.В.Русанова, Г.И.Лямкин // *Проблемы особо опасных инфекций.* – 2010. – № 3. – С. 27–30.
11. Лямкин, Г.И. Эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу в Южном федеральном округе / Г.И.Лямкин // *Проблемы современной эпидемиологии. Перспективные средства и методы лабораторной диагностики и профилактики актуальных инфекций: труды Всерос. науч. конф., СПб, 19-20 ноября 2009 г.* – СПб, 2009. – С. 242.
12. Кологоров, А.И. Эпидемиологическая ситуация по природно-очаговым и зоонозным инфекциям в Приволжском федеральном округе в 2000-2009 гг. и прогноз на 2010 г. / А.И.Кологоров // *Проблемы особо опасных инфекций.* – 2010. – Вып. 104. – С. 5–10.

STUDY OF CULTURAL AND MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF BRUCELLAS ABORTUS IN VARIOUS DEGREES OF DISSOCIATION

Kosarev M.A. – Candidate of Biological Sciences; Fomin A.M. – Doctor of Veterinary Sciences, professor; Safina G.M. – Candidate of Veterinary Science; Grigorieva S.A. – Research Assistant; Tuhvatullina L.A. – Research Assistant.

Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan (e-mail: vnivi@mail.ru).

The purpose of the research was to study the cultural and morphological properties of Brucella in different degrees of dissociation. Cultural and morphological properties of strain of Brucella B. abortus R-1096 were studied in comparison with control strains B. abortus 19 (S-form) and 82 (SR-form) in the set of tests: speed and character of growth on nutrient elective media – liver-peptone glucose-glycerol agar (PPGA), growth on nutrient media with dyes (thionin 1:25 million, 1:50k; 1:100k; 1:50k; 1:100 thousand), hydrogen sulfide ability, the need for an increased content of carbon dioxide, color of the colonies at white-Wilson, sensitivity to penicillin (0.5; 5; 50; 100 U/ml), antigenic properties of cultures using specific Brucella S- and R-serums and minor "A" and "M" of the serum, the sample of thermoagglutination, test with tripaflavine (acriflavine). The culture of the strain R-1096 in all terms of thermoagglutination registering as well as in the sample with tripaflavin showed a positive results. The most intense release of hydrogen sulfide was registered in R-1096 in comparison with other vaccine strains of B. abortus – 19 and 82. Strain R-1096 showed the growth in all dilutions of aniline dyes and also showed continuous growth in media where the concentration of drug was 0.5 – 5.0 and 50 U/ml. The study of cultural and morphological properties of Brucella in different degrees of dissociation showed the distinctive properties of the culture of the R-1096 strain in comparison with other studied strains in all tests.

KEYWORDS: brucellosis, dissociated form, cultural and morphological properties.

References

1. The new global map of human brucellosis / G.Pappas, P.Papadimitriou, N.Akritidis, L.Christou // *Lancet Infect Dis.* – 2006. – Vol. 6. – P. 91-99.
2. Brucella as a biological weapon / G.Pappas, P.Panagopoulou, L.Christou, N.Akritidis // *Cellular and molecular life sciences CMLS.* – 2006. – Vol. 63. – P. 2229-2236.
3. Solera, J. Update on brucellosis: therapeutic challenges / J.Solera // *International journal of antimicrobial agent.* – 2010. – Vol. 36. – P. 18-20.
4. Modulation of Brucella-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication / M.Watarai, S.Makino, Y.Fujii, K.Okamoto // *Cellular Microbiology.* – 2002. – Vol. 4. – P. 341-355.
5. Pizarro-Cerda, J. Invasion and intracellular trafficking of Brucella abortus in nonphagocytic cells / J. Pizarro-Cerda, E.Moreno, J.P.Gorvel // *Microbes and Infection.* – 2000. – Vol. 2. – P. 829-835.
6. Vector development for the expression of foreign proteins in the vaccine strain Brucella abortus S 19 / D.J.Comerci, G.D.Pollewick, A.M.Vigliocco, A.C.Frasch // *Infect Immun.* – 1998. – Vol. 66. – P. 3862-3866.
7. Metabolic control of virulence genes in Brucella abortus. HutC coordinates virB expression and the histidine utilization pathway by direct binding to both promoters / R.Sieira, G.M.Arocena, L.Bukata, D.J.Comerci // *J. Bacteriol.* – 2010. – Vol. 192. – P. 217-224.
8. Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in Brucella abortus / J.Lamontagne, H.Butler, E.Chaves-Olarte [et al.] // *J Proteome Res.* – 2007. – Vol. 6. – P.1519-1529.
9. Zhilina, N.J. Brucellosis v Rossijskoj Federacii v 2001 – 2005 godah [Brucellosis in the Russian Federation in 2001-2005] / N.J.Zilina // *Sanitarnij vrach.* – 2007. – Vol. 6. – P.14-21.
10. Rusanova, D.V. Epidemiologicheskie osobennosti brucellosa v Stavropolskom krae [Epidemiological features of brucellosis in the Stavropol region] / D.V.Rusanova, G.I.Lyamkin // *Problemi osobo opasnykh infekcij.* – 2010. – Vol. 3. – P.27-30.
11. Lyamkin, G. I. Epidemiologicheskaj obstanovka po brucellesu v Yuzhnom federalnom okruge [The Epidemiological situation for brucellosis in the Southern Federal district] / G.I.Lyamkin // *Problemy sovremnnoj epidemiology. Perspektivnie sredstva i metody laboratornoj diagnostiki i profilaktiki aktualnykh infekcij: Tr. Vseros nauch. conf.; 19-20 Noyabr. 2009.* – SPb, 2009. – P. 242. [The problems of modern epidemiology. Prospective means and methods for laboratory diagnostics and prevention of actual infections: proceedings of All-Russian conf., November 2009. – SPb, 2009. – P. 242.]
12. Kologorov, A.I. Epidemiologicheskaya situatsiya po prirodno-ochagovym i zoonoznym infektsiyam v Privolzhskom federalnom okruge v 2000 – 2009 i prognoz na 2010 [The Epidemiological situation on natural-focal and zoonotic infections in the Volga Federal district in 2000 – 2009 and forecast for 2010] / A.I.Kologorov // *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* – 2010. – Vol. 104. – P. 5-10.

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ГЕРЕФОРДСКОЙ ПОРОДЫ В РАЗНЫЕ СЕЗОНЫ ГОДА

В.И.Раицкая – кандидат ветеринарных наук, руководитель ветеринарной группы.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт аграрных проблем Хакасии» (ФГБНУ НИИАП Хакасии), г.Абакан (655132, Усть-Абаканский район, п. Зелёное, ул. Садовая, 5, тел.: +7(390-32) 2-56-09; e-mail: raickaya19@mail.ru).

Проанализированы изменения некоторых гематологических и биохимических параметров крови у разновозрастных групп крупного рогатого скота герефордской породы в разные сезоны года. Весной параметры крови достоверно отличаются от осенних и летних, тогда как в одноименные сезоны эти параметры весьма близки между собой. Уменьшение числа эритроцитов в крови животных разных половозрастных групп может быть обусловлено неполноценным кормлением в зимний период за счёт недостатка белков. В зимний период содержание количества эритроцитов в крови у быков-производителей составило 3,7 г/л, у коров 4,1 г/л, у нетелей 4,4 г/л, что ниже физиологической нормы на 41,27%, 34,92%, 30,16%, соответственно, а в весенний, летний и осенний сезоны года – стабилизировалось. Зимой у всех половозрастных групп происходит снижение кальция: у быков-производителей до 6,6 мг/%, бычков (отъём) до 6,1 мг/%, коров до 7,8 мг/%, нетелей до 6,6 мг/%, что ниже физиологической нормы соответственно на – 30,32%, 36,00%, 16,95 и на 30,74%, а в весенний, летний и осенний периоды соответствовало установленной норме. В сыворотке крови животных отмечаются незначительные изменения холестерина, щелочной фосфатазы, что может быть вызвано недостатком в кормах отдельных минеральных веществ (цинка, магния) и витаминов. Поэтому, в зимний и весенний периоды времени необходимо проводить профилактические мероприятия, направленные на нормализацию углеводного, минерально-витаминового и белкового обменов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: герефордская порода, гематологические и биохимические показатели крови.

Наличие в кроветворных органах и системах организма интерорецепторов служит доказательством того, что кроветворные органы включены в систему рефлекторных взаимодействий и через них в деятельность всего организма как целого [7, 2].

Поэтому метод морфологического и биохимического анализа крови используется не только при постановке диагноза и прогноза многих заболеваний, но и приобретает большое значение при нормировании кормления в разные сезоны года животных и прогноза их продуктивности.

В результате изменения технологии ведения сельскохозяйственного производства и условий окружающей среды, возникает несоответствие между биологической природой животного организма и его физиологическими возможностями [1, 4].

В период адаптации к новым технологическим процессам выращивания, организм животных постоянно испытывает многочисленные воздействия отрицательных факторов внешней среды. Он отвечает на них стресс-реакцией, чтобы обеспечить согласованное функционирование всех физиологических систем, активизировать защитные силы организма [3, 5].

Цель наших исследований – изучить морфофункциональное состояние показателей крови у половозрастных групп крупного рогатого скота герефордской породы в разные сезоны года.

Материалы и методы. Лабораторные исследования по определению биохимических и гематоло-

гических показателей крови крупного рогатого скота проводились на разновозрастных группах крупного рогатого скота герефордской породы, принадлежащих ООО «Андрюановский», Боградского района Республики Хакасия.

Для исследования крови использовали приборы: БиАн-Е 9343 (программируемый биохимический анализатор) и ВС-2800 Vet (Mindray) (ветеринарный гематологический анализатор).

Венозную кровь для биохимических исследований брали в количестве 20 мл от 10 животных из каждой половозрастной группы зимой, весной, летом и осенью. В сыворотке крови определяли общий белок, общий кальций, неорганический фосфор, резервную щелочность, сахар и холестерин.

Для гематологического исследования от тех же животных брали цельную венозную кровь в количестве 5 мл в вакуумную пробирку или вносили консервант (трилон).

Кровь определяли по 18 показателям: количество лейкоцитов WBC, лимфоцитов Lymph, моноцитов Mon, гранулоцитов Gran, процент лимфоцитов Lymph%, процент моноцитов Mon%, процент гранулоцитов Gran% эритроциты RBC, концентрацию гемоглобина HGB, гематокрита HCT, средний объем эритроцита MCV, среднее содержание гемоглобина в эритроците MCH, среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците MCHC, ширину распределения эритроцитов RDW, тромбоциты PLT, средний объем тромбоцита MPV, ши-

рину распределения тромбоцитов PDW, тромбоцит PCT определяли на приборе Mindray BC-2800Vet.

Статистическую обработку данных проводили в «Microsoft Excel», входящей в пакет программ «Microsoft XP 2003».

Результаты исследований. Гематологические параметры крупного рогатого скота определяли у животных, взятых в весенний, летний зимний и осенний периоды года. При этом установлено, что полученные результаты отличаются от аналогичных литературных показателей [4]. Экспериментальные исследования по крови у животных позволили выявлять скрыто протекающие патологические процессы, появление осложнений и нарушения обмена веществ.

Анализ морфологического состава крови крупного рогатого скота герфордской породы половозрастных групп свидетельствует об оптимальном уровне форменных элементов в ней и незначительном их различии по группам а, следовательно, физиологических возможностях животных.

Понижение абсолютного числа лимфоцитов происходит в весенний период, что составило ниже физиологической нормы у нетелей на – 33,4%, бычков-производителей на – 30,19%, бычков (отъем) на – 40,60%, и у коров на – 69,81%.

В дальнейшем в летний и осенний периоды их количество находилось в пределах физиологической нормы, кроме бычков в период отъема (в летний период), что составило ниже физиологической нормы на 52,83%.

Процентное содержание лимфоцитов у коров в весенний период составило $1,6 \times 10^9/\text{л}$, а осенний – $1,70 \times 10^9/\text{л}$, что ниже физиологической нормы, соответственно на 20,83% и 30,30%. Это форменный элемент, который отвечает за выработку иммунитета и борьбу с микробами и вирусами и играет значительную роль в образовании иммунных тел.

Пониженное содержание лимфоцитов в крови у коров объясняется тем, что в их организме окислительно-восстановительные процессы протекали очень слабо.

Эритроциты служат носителями гемоглобина, обеспечивающего организм кислородом, переносят углекислый газ из тканей в легкие, принимают участие в регуляции кислотно-щелочного равновесия, транспортируют к тканям аминокислоты, липиды, адсорбируют токсины, участвуют в ряде ферментативных процессов [5].

В зимний период количество эритроцитов в крови у бычков-производителей составило 3,7 г/л, у коров – 4,1 г/л, у нетелей – 4,4 г/л, что ниже физиологической нормы на 41,27%, 34,92% и на 30,16%, соответственно, а в весенний, летний и осенний сезоны года стабилизировалось.

Уменьшение числа эритроцитов в крови животных разных половозрастных групп может быть обусловлено неполноценным кормлением в зимний период за счёт недостатка белков, витамина В, кобальта, железа, меди в кормах. При длительных интоксикациях могут наблюдаться воспалительные процессы, отравления, инвазионные болезни.

Снижение уровня гранулоцитов в крови у нетелей отмечено в осенний период на 53,60%, у бычков в зимний период на 29,2%.

Уровень гемоглобина у бычков-производителей в зимний период понижен на 3,7%. Выявлялось из-за неполноценного кормления при недостатке в рационе белка, кобальта, железа, меди и витамина В [3, 6].

У остальных половозрастных групп в весенний, летний и осенний сезоны года находился в пределах физиологической нормы. Тромбоциты, ширина распределения эритроцитов, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, средний объём эритроцита и др. показатели в крови во все периоды года находились в пределах физиологической нормы.

При биохимическом исследовании сыворотки крови у животных определяются показатели, указывающие на происходящие в организме изменения.

Данные таблиц характеризуют уровень процессов в организме животных, где происходят незначительные изменения в сыворотке крови (табл. 1-4).

У бычков-производителей – 11,88 мг/% в весенний период, а в осенний составил 11,60 мг/%, что выше физиологической нормы соответственно на 65,0% и 65,7%. Это проявляется при недостатке форменного элемента в кормах при плохом его усвоении, вследствие нарушения соотношения кальция и фосфора.

Зимой у всех половозрастных групп происходит снижение кальция: у бычков до 6,62 мг/%, бычков (отъем) – 6,08 мг/%, коров – 7,89 мг/%, нетелей – 6,58 мг/%, что ниже физиологической нормы соответственно на – 30,32%, 36,00%, 16,95 и на – 30,74%, а в весенний, летний и осенний периоды соответствовало установленной норме – это происходит за счёт недостатка витамина Д в крови.

Содержание холестерина в осенний период у бычков-производителей составило 150,45 мг/%, а у коров – 151,51 мг/%, что ниже физиологической нормы соответственно на – 5,97% и 5,31%.

Содержание щелочной фосфатазы у нетелей в зимний период ниже физиологической нормы на – 12,48%, а в весенний период у них же на – 1,08%.

Это вызвано недостатком в рационе отдельных минеральных веществ (цинка, магния) и витаминов в стойловый период, когда в организме животных накапливается большое количество недоокисленных продуктов обмена, кислот, которые связывают бикарбонаты и другие щелочные компоненты крови [5].

В весенний период белок в крови у бычков-производителей ниже физиологической нормы на 43,29%, у бычков (отъем) – 38,49%, у коров – на 32,88% и нетелей – 38,49%.

Следует отметить, снижение общего белка в сыворотке крови проявляется вследствие недостатка макро- и микроэлементов, витамина.

Отмечено увеличение уровня неорганического фосфора в сыворотке крови у коров в весенний период до 9,27 мг/% и в осенний период до 11,90 мг/%, что соответственно выше физиологической нормы на 32,43% и 70%.

Таблица 1

**Биохимические и гематологические показатели крови крупного рогатого скота (коров)
в разные сезоны года**

| Показатель | Сезон года | | | |
|------------------------------------|-------------|------------|--------------|-------------|
| | зима | лето | весна | осень |
| Гематологические показатели | | | | |
| Лейкоциты, 10 ⁹ /л | 6,7±0,9 | 7,4±1,4 | 7,4±1,4 | 7,43±0,12 |
| Лимфоциты, 10 ⁹ /л | 5,4±1,3 | 1,6±0,7 | 1,6±0,3 | 1,7±0,60 |
| Моноциты, 10 ⁹ /л | 0,7±0,1 | 1,0±0,2 | 1,0±0,2 | 0,65±0,06 |
| Гранулоциты, 10 ⁹ /л | 1,3±0,5 | 3,6±0,2 | 3,6±1,0 | 3,23±0,85 |
| Эритроциты, г/л | 4,1±0,8 | 7,11±0,1 | 7,11±0,1 | 7,43±0,12 |
| Гемоглобин, г/л | 110±2,6 | 109±0,23,1 | 109,2±3,1 | 124,8±4,70 |
| Биохимические показатели | | | | |
| Общий белок, г/л | 7,67±0,35 | 7,0±0,40 | 4,90±0,39 | 8,84±0,18 |
| Фосфор неорг., мг/% | 5,91±0,98 | 6,0±0,90 | 9,27±1,67 | 11,90±1,05 |
| Кальций, мг/% | 7,89±1,74 | 8,9±0,80 | 14,76±0,62 | 14,26±0,72 |
| Глюкоза, мг/% | 55,60±3,19 | 51,0±0,80 | 39,40±4,27 | 62,76±4,05 |
| Холестерин, мг/% | 169,00±4,47 | 164,0±6,15 | 140,22±11,65 | 151,51±7,18 |
| Щелочная фосфатаза, % | 60,17±0,77 | 51,0±1,01 | 57,88±1,05 | 60,9±1,08 |

Таблица 2

**Биохимические и гематологические показатели крови крупного рогатого скота (быки производители)
в разные сезоны года**

| Показатель | Сезон года | | | |
|------------------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | зима | лето | весна | осень |
| Гематологические показатели | | | | |
| Лейкоциты, 10 ⁹ /л | 5,8±0,5 | 8,1±0,7 | 8,2±0,7 | 6,25±0,63 |
| Лимфоциты, 10 ⁹ /л | 3,7±0,6 | 3,8±1,1 | 1,8±0,1 | 4,80±0,13 |
| Моноциты, 10 ⁹ /л | 0,7±0,1 | 0,9±0,3 | 0,9±0,1 | 0,83±0,15 |
| Гранулоциты, 10 ⁹ /л | 1,5±0,1 | 2,2±0,6 | 5,2±0,6 | 3,65±0,41 |
| Эритроциты, г/л | 3,7±0,9 | 6,2±0,2 | 7,2±0,2 | 7,16±0,38 |
| Гемоглобин, г/л | 95,3±3,1 | 110,0±53,3 | 115,5±3,3 | 118,0±5,26 |
| Биохимические показатели | | | | |
| Общий белок, г/л | 7,37±0,58 | 6,14±0,94 | 4,14±0,94 | 6,49±1,07 |
| Фосфор неорг., мг/% | 5,84±0,95 | 9,88±1,32 | 11,88±1,32 | 6,03±2,67 |
| Кальций, мг/% | 6,62±0,34 | 12,80±1,93 | 12,80±1,93 | 11,75±1,25 |
| Глюкоза, мг/% | 66,88±3,21 | 60,82±5,17 | 57,82±5,17 | 60,24±2,96 |
| Холестерин, мг/% | 189,80±7,43 | 161,20±16,87 | 161,20±16,87 | 218,50±15,32 |
| Щелочная фосфатаза, % | 57,98±4,34 | 50,22±2,79 | 55,22±2,79 | 60,96±3,97 |

Таблица 3

Морфологические показатели крови крупного рогатого скота (нетели) в разные сезоны года

| Показатель | Сезон года | | | |
|------------------------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| | зима | лето | весна | осень |
| Гематологические показатели | | | | |
| Лейкоциты, 10 ⁹ /л | 6,4±1,2 | 7,9±1,2 | 7,2±2,2 | 5,4±1,2 |
| Моноциты, 10 ⁹ /л | 0,6±0,1 | 1,0±0,2 | 1,0±0,2 | 0,6±0,1 |
| Гранулоциты, 10 ⁹ /л | 1,2±0,4 | 2,8±1,2 | 3,8±0,2 | 1,2±0,4 |
| Эритроциты, г/л | 4,4±0,3 | 6,4±0,2 | 7,4±0,2 | 4,4±0,3 |
| Гемоглобин, г/л | 118,4±2,0 | 103±2,2 | 106±2,2 | 120,4±2,0 |
| Биохимические показатели | | | | |
| Общий белок, г/л | 6,37±0,74 | 7,49±1,07 | 4,49±1,07 | 7,11±1,07 |
| Фосфор неорганический, мг/% | 9,35±1,18 | 5,03±2,67 | 10,03±2,67 | 7,03±2,67 |
| Кальций, мг/% | 6,58±0,41 | 11,75±1,25 | 16,75±1,25 | 12,75±1,25 |
| Глюкоза, мг/% | 38,70±2,76 | 49,24±2,96 | 37,24±2,96 | 61,24±2,96 |
| Холестерин, мг/% | 183,74±9,38 | 208,50±15,32 | 208,50±15,32 | 211,50±5,32 |
| Щелочная фосфатаза, % | 43,76±4,23 | 49,96±3,97 | 49,96±3,97 | 58,06±3,97 |

Таблица 4

Морфологические показатели крови крупного рогатого скота (бычки до года) в разные сезоны года

| Показатель | Сезон года | | | |
|------------------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | зима | лето | весна | осень |
| Гематологические показатели | | | | |
| Лейкоциты, 10 ⁹ /л | 9,2±0,6 | 8,1±0,5 | 8,5±0,5 | 6,3±0,5 |
| Лимфоциты, 10 ⁹ /л | 4,1±0,9 | 2,5±0,2 | 2,5±0,2 | 4,8±0,2 |
| Моноциты, 10 ⁹ /л | 1,0±0,2 | 1,2±0,1 | 1,2±0,2 | 0,8±0,1 |
| Гранулоциты, 10 ⁹ /л | 2,8±0,6 | 2,2±0,5 | 4,9±0,5 | 3,7±0,5 |
| Эритроциты, г/л | 7,3±0,3 | 7,3±0,4 | 7,3±0,4 | 7,2±0,4 |
| Гемоглобин, г/л | 98±5,7 | 114,5±4,7 | 114,5±4,7 | 118,0±4,7 |
| Биохимические показатели | | | | |
| Общий белок, г/л | 7,98±1,05 | 6,49±1,07 | 4,49±1,07 | 7,61±1,07 |
| Фосфор неорганический, мг/% | 7,98±0,74 | 6,03±2,67 | 10,03±2,67 | 6,03±2,67 |
| Кальций, мг/% | 6,08±0,37 | 11,75±1,25 | 16,75±1,25 | 10,75±1,25 |
| Глюкоза, мг/% | 57,90±1,80 | 60,24±2,96 | 50,24±2,96 | 62,24±2,96 |
| Холестерин, мг/% | 171,83±5,80 | 218,50±15,32 | 208,50±15,32 | 201,50±15,32 |
| Щелочная фосфатаза, % | 64,58±3,27 | 60,96±3,97 | 59,96±3,97 | 52,06±3,97 |

Содержание сахара в сыворотке крови у нетелей весной составляет 37,40 мг%, что ниже физиологической нормы на 6,90%. Это снижение в сравнении с нормой может проявляться вследствие дефицита легкоусвояемых углеводов в кормах. Это свидетельствует о слабой работе рубца и печени, так как основной синтез глюкозы в печени осуществ-

ляется в процессе глюконеогенеза из летучих жирных кислот, образующихся при брожении.

Заключение. Сезонное колебание параметров крови здоровых особей крупного рогатого скота мясного направления разных половозрастных групп (быков-производителей, нетелей и коров, бычков), наблюдается снижение количе-

ственного состава лейкоцитов, гемоглобина, эритроцитов и имеют прямую зависимость от сезона года, экологического состояния территорий, на которых содержатся животные, их возраст. В

зимнее-весенний периоды необходимо проводить профилактические мероприятия, направленные на нормализацию углеводного, минерально-витаминового и белкового обменов.

Литература

1. Дунин, И.М. Результаты функционирования отрасли мясного скотоводства в Российской Федерации / И.М. Дунин, В.И.Шаркаев, А.В.Кочетков // Молочное и мясное скотоводство. – 2011. – № 5. – С. 2–4.
2. Николаева, О.Н. Гематологические показатели телят при использовании композиции фитопробиотиков и полисолой микроэлементов / О.Н.Николаева // Проблемы и перспективы развития аграрного производства: тезисы Междунар. науч. конф., г. Смоленск, 31 дек. – 1 янв. 2007 г. – Смоленск, 2007. – С. 289–291.
3. Эффективность отбора производителей по собственной продуктивности в мясном скотоводстве / Х.А.А-мерханов, В.Ю.Хайнацкий, Ф.Г.Каюмов, С.Д.Тюлебаев. // Молочное и мясное скотоводство. – 2011. – № 3. – С. 2–5.
4. Позов, С.А. Микроэлементы плазмы крови и эритроцитов у овец при бронхопневмонии в ассоциации с саркоцистозом / С.А.Позов, В.А.Шальгина, С.А.Эзиев // Диагностика, лечение, профилактика заболеваний с/х животных: сб. науч. тр. – Ставрополь, 2010. – С. 41–42.
5. Соболев, Н.А. Производство говядины может и должно быть прибыльным / Н.А.Соболев // Животноводство России. – 2012. – № 8. – С. 2–5.
6. Делян, А.С. Влияние возраста первого отёла на продуктивность и долголетие коров / А.С.Делян, А.И.Ивашков // Молочное и мясное скотоводство. – 1999. – № 8. – С. 14–17.
7. Николаева, О.Н. Гематологические показатели телят при использовании композиции фитопробиотиков и полисолой микроэлементов / О.Н.Николаева // Проблемы и перспективы развития аграрного производства: Междунар. науч. конф., г. Смоленск, 31 дек. – 1 янв. 2007 г. – Смоленск, 2007. – С. 289–291.

AGE-RELATED CHANGES OF BLOOD CORPUSCLES OF CATTLE HEREFORD BREED IN DIFFERENT SEASONS OF THE YEAR

Raickaya V.I. – Candidate of Veterinary Sciences.

Institute of Agrarian Problems of Khakassia, Abakan (e-mail:raickaya19@mail.ru).

The article analyzes the changes of some hematological and biochemical parameters of blood of different age and sex groups cattle of Hereford breed in different seasons of the year. The spring blood parameters differ significantly from autumn and summer ones, while in the same seasons these parameters are very close to each other. Reducing the number of red blood cells in the blood of animals of different age groups may be caused by inadequate feeding in winter due to lack of proteins. In winter, the content of red blood cells in the blood of bulls was 3.7 g/l, of cows – 4.1 g/l, heifers 4.4 g/l, which were below than the physiological norm by 41.27%, 34.92%, 30.16%, respectively, and in the spring, summer and autumn seasons - stabilized. In winter, calcium decreases in all age and sex groups: in manufacturing bulls - up to 6.6 mg/%, bulls (weaning) – up to 6.1 mg/%, cows – up to 7.8 mg/%, heifers – up to 6.6 mg/%, which are below the physiological norm, respectively – by 30.32%, 36.00%, 16.95 and – 30.74%, and in the spring, summer and autumn periods - corresponds the established norm. There are slight changes in cholesterol and alkaline phosphatase in animals blood serum, which may be caused by lack of individual minerals in feed (zinc, magnesium) and vitamins. Therefore, in winter and spring it is necessary to carry out preventive measures aimed at the normalization of carbohydrate, mineral, vitamin and protein metabolism.

KEYWORDS: Hereford breed, hematological and biochemical parameters of blood.

References

1. Dunin, I. Rezultaty funkcionirovaniya otrasli myasnogo skotovodstva v Rossiyskoy Federatsii [The results of functioning of the beef cattle breeding industry in the Russian Federation] / I.Dunin, V.Sharkaev, A.Kochetkov. // Molochnoe i myasnoe skotovodstvo. – 2011. – № 5. – P. 2-4.
2. Nikolaeva, O.N. Gematologicheskie pokazateli telyat pri ispolzovanii kompozitsii fitoprotibiotikov i polisoley mikroelementov / O.N.Nikolaeva [Hematologic parameters of calves when using a composition of phytoprobiotics and microsilica polysaccharides] // Problemy i perspektivy razvitiya agrarnogo proizvodstva: tezisy Mezhdunar. nauch. konf., g. Smolensk, 31 dek. – 1 yanv. 2007 g. – Smolensk, 2007. – P. 289–291 [Problems and prospects for the development of agrarian production: the theses of the Intern. sci. conf., Smolensk, 31 December. - Jan. 1 2007. – P. 289–291].

3. Effektivnost otbora proizvoditeley po sobstvennoy produktivnosti v myasnom skotovodstve [Efficiency of selecting producers for their own productivity in meat cattle breeding] / H.Amerhanov, V.Hajnickij, F.Kajumov, S.Tjulebaev. // Molochnoe i myasnoe skotovodstvo. – 2011. – № 3. – P.2–5.

4. Pozov, S.A. Mikroelementy plazmy krovi i eritrocitov u ovets pri bronkhopnevmonii v assotsiatsii s sarkotsistozom [Microelements of blood plasma and erythrocytes in sheep with bronchopneumonia in association with sarcocystosis] / S.A.Pozov, V.A.Shalygina, S.A.Jeziev // Diagnostika, lechenie, profilaktika zabolevaniy s/kh zhivotnykh: sb. nauch. tr. Stavropol, 2010. – P. 41–42 [Diagnostics, treatment, prevention of farm animals diseases: collection of scientific papers. – Stavropol, 2010. – P. 41–42].

5. Sobol, N. Proizvodstvo govyadiny mozhet i dolzhno byt pribylnym [Beef production can be and should be profitable] / N.Sobol // Zhivotnovodstvo Rossii. – 2012. – №8. – P.2–5.

6. Delyan, A.S. Vliyaniye vozrasta pervogo otela na produktivnost i dolgoletie korov [The influence of the age of the first calving on the productivity and longevity of cows] / A.S.Delyan, A.I.Ivashkov // Molochnoe i myasnoe skotovodstvo. – 1999. – № 8. – P. 14–17.

7. Nikolaeva, O.N. Gematologicheskie pokazateli telyat pri ispolzovanii kompozitsii fitoprotibiotikov i polisoley mikroelementov / O.N.Nikolaeva [Hematologic parameters of calves when using a composition of phytoprobiotics and polysilica polysaccharides] // Problemy i perspektivy razvitiya agrarnogo proizvodstva: Mezhdun. nauch. konf., g. Smolensk, 31 dek. – 1 janv. 2007 g. – Smolensk, 2007. – P. 289–291 [Problems and prospects for the development of agricultural production: Intern. sci. conf., Smolensk, 31 December. – Jan. 1 2007 – Smolensk, 2007. – P. 289–291.].

УДК 619:615.03:616.2:636.2

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НПВС НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА ТЕЛЯТ, БОЛЬНЫХ БРОНХОПНЕВМОНИЕЙ

**М.С.Жуков – кандидат ветеринарных наук, мл.н.с.; Ю.Н.Алехин – доктор ветеринарных наук, гл.н.с.;
И.Р.Никulina – соискатель.**

**ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт патологии, фармакологии и терапии»,
Россельхозакадемии (ГНУ ВНИВИПФиТ), г.Воронеж
(394087, Воронеж, Ломоносова, 1146, тел. +7 (473) 253-62-10, e-mail: maxim.zhukoff2015@yandex.ru).**

Представлены результаты исследования влияния кетопрофена и флуниксина миглума на систему гемостаза телят с острыми респираторными болезнями. В исследовании были задействованы животные 4-5 месячного возраста (n=24) с диагнозом острая катаральная пневмония и клинически здоровые. Из числа этих телят по принципу подбора аналогов были сформированы 4 группы по 6 телят в каждой. В группу 1 (n=6, положительный контроль) вошли клинически здоровые животные, которым фармакологические средства не назначались, во вторую, третью и четвертую – больные бронхопневмонией животные, получавшие курс antimicrobных препаратов. Помимо этого, телятам в 3 группе однократно внутримышечно ввели кетопрофен, в дозе 3мг/кг, а телятам 4-ой (n=6) – флуниксина меглумин, в дозе 3,69 мг/кг. Полученные данные показали, что применение НПВС при бронхопневмонии у телят оказывает жаропонижающий эффект, который оказался более выражен после введения флуниксина меглума. Также было установлено, что кетопрофена и флуниксина меглума оказывают влияние на систему гемостаза телят больных бронхопневмонией. Начало данного влияния начинается уже через 2 ч, но клинически значимые изменения наблюдаются через 4 часа. Однако наиболее выраженное и продолжительное действие оказал флуниксин миглума

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: телята, кетопрофен, флуниксина миглумин, гемостаз, бронхопневмония.

Постоянным компонентом патогенеза бронхопневмонии является наличие воспалительной реакцией и вентиляционно-перфузионных нарушений, оказывающие отрицательное влияние на систему гемостаза. Так, имеются данные о взаимосвязи между нарушением функции внешнего дыхания и состоянием системы гемостаза. Например, с ухудшением бронхиальной проходимости и гипервентиляцией появляется склонность к гиперкоагуляции [4]. В процессе развития пневмонии происходят деструктивные изменения

в паренхиме легких, и усиливается синтез прокоагулянтов, активирующих внешний и внутренний каскад свёртываемости крови с последующим нарушением гемоциркуляции и усилением выраженности дисбаланса перфузии [6]. Поэтому нормализация гемостаза является объективной необходимостью терапии при бронхолегочных заболеваниях, хотя в ветеринарии выбор соответствующих средств ограничен. Поэтому особый интерес представляют препараты, оказывающие сопутствующее влияние на систему свёртывания

крови. Для снижения выраженности воспаления наиболее часто применяют нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), которые помимо антифлоггенного, так же оказывают жаропонижающее, анальгезирующее и антиагрегационное действие [5]. Однако при назначении данной группы препаратов, как правило, не учитываются сопутствующие эффекты, что в определенной мере обусловлено ограниченностью знаний о механизмах их возникновения и особенностях в зависимости от химической структуры.

Поэтому целью данной работы стало изучение влияния НПВС из группы производных пропионовой кислоты (кетопрофен) и никотиновой кислоты (флуниксина меглумин) на систему гемостаза телят при острой бронхопневмонии.

Материалы и методы. Исследования проводились на базе хозяйства специализирующемся на откорме молодняка крупного рогатого скота. В опыте были задействованы животные 4-5 месячного возраста (n=24) клинически здоровые и с диагнозом острая катаральная пневмония средней тяжести течения. Из числа этих телят по принципу подбора аналогов были сформированы 4 группы по 6 животных в каждой. В группу №1 (контроль) вошли клинически здоровые животные, которым никаких фармакологических средств не назначали, в №2, №3 и №4 – больные бронхопневмонией, получавшие курс антимикробной терапии. Помимо этого, телятам в группе №3 однократно внутримышечно ввели кетопрофен, в дозе 3 мг/кг внутримышечно, а №4 – флуниксина меглумин, в дозе 3,69 мг/кг.

Задействованные в опыте животные находились под постоянным наблюдением. Помимо этого, до введения указанных препаратов, а также через 30 мин, 2, 4 и 24 ч после, у них отбирали пробу крови из яремной вены в пластиковую пробирку, содержащую 3,8% цитрата натрия в соотношении 9:1. С целью снижения

экстрааналитической вариабельности показателей при пункции вены не использовали жгут. Полученные образцы исследовали на коагулографе Н-334 (Россия), определяя время свёртывания крови (ТО), продолжительность её первой (Т1) и второй (Т2) фаз [2]. Вместе с этим также проводился этаноловый тест, позволяющий нам судить о наличии продуктов деградации фибрина [1].

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы Statistica v6.1, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m) и достоверность разницы (p) по критерию Стьюдента [3].

Результаты исследования. Клинические показатели телят из группы положительного контроля соответствовали референсным значениям здоровых животных. В течение опыта (24 ч) их состояние, в том числе и параметры системы гемостаза, существенно не изменились (табл.).

У всех больных в начале опыта наблюдали общую слабость, снижение аппетита, тахикардию с усилением второго тона на лёгочной артерии (слева, третье межреберье под анконеусами), субфебрильную лихорадку, смешанную одышку, влажный кашель, выделение из носовых отверстий слизисто-гнояного экссудата желто-зелёного цвета, жесткое везикулярное дыхание и мелкопузырчатые хрипы при аускультации зоны проекции лёгких. Указанные симптомы дают основание для постановки диагноза – бронхопневмония средней тяжести течения. Среди показателей гемостаза отсутствовали достоверные межгрупповые различия, но в сравнении с параметрами здоровых телят, наблюдались выраженные признаки гиперкоагуляции, проявляющиеся снижением общего времени свёртывания на 26%, которое происходит за счёт сокращения на 31,8% первой и на 18,2% второй фазы, что также сочетается с наличием продуктов деградации фибрина.

Таблица

Влияние кетопрофена и флуниксин меглумина на систему гемостаза телят с острой катаральной пневмонией

| Показатель | № гр. | до | 30 мин | 2 ч | 4 ч | 24 ч |
|------------------------|-------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Клинические показатели | | | | | | |
| ЧСС/мин | 1 | 80,0±2,60 | 78,0±2,50 | 80,6±2,60 | 77,8±2,25 | 78,0±2,60 |
| | 2 | 112,0±2,25 | 114,5±2,30 | 110,5±2,50 | 111,0±1,95 | 116,5±2,85* |
| | 3 | 110,0±1,85 | 111,0±2,60 | 109,0±2,20 | 105,5±1,24 | 106,5±2,50* |
| | 4 | 112,0±2,25 | 112,0±1,95 | 110,4±2,30 | 107,0±1,85 | 107,5±2,30 |
| ЧДД/мин | 1 | 24,2±0,95 | 23,9±0,85 | 24,2±0,80 | 24,2±0,95 | 22,5±0,95 |
| | 2 | 39,2±1,55 | 39,0±1,25 | 39,0±1,25 | 39,2±1,55 | 42,4±0,77* |
| | 3 | 39,8±0,88 | 39,5±1,05 | 39,5±1,05 | 38,2±0,95 | 39,0±1,25 |
| | 4 | 39,0±1,25 | 38,8±1,42 | 39,0±1,25 | 38,2±0,95 | 38,8±1,42 |
| Т, мин | 1 | 38,9±0,05 | 38,9±0,05 | 38,9±0,05 | 38,9±0,05 | 38,7±0,05 |
| | 2 | 39,8±0,02 | 39,8±0,02 | 39,8±0,02 | 39,8±0,02 | 39,8±0,05 |
| | 3 | 39,8±0,05 | 39,8±0,05 | 39,6±0,03* | 39,2±0,05* | 39,7±0,03 |
| | 4 | 39,8±0,05 | 39,8±0,05 | 39,4±0,02* | 39,0±0,05* | 39,1±0,02* |

Продолжение таблицы

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-------------------------|---|----------|-----------|-----------|------------|-----------|
| Показатели гемостаза | | | | | | |
| T ₁ , мин | 1 | 4,4±0,10 | 4,1±0,05* | 4,2±0,04* | 4,2±0,05* | 4,5±0,07 |
| | 2 | 3,0±0,04 | 2,7±0,04* | 2,9±0,05 | 2,9±0,07 | 2,6±0,05* |
| | 3 | 2,6±0,04 | 2,3±0,04* | 3,4±0,05* | 4,2±0,01* | 3,0±0,04* |
| | 4 | 3,1±0,02 | 3,0±0,02 | 2,9±0,02* | 4,3±0,02* | 2,8±0,03* |
| T ₂ , мин | 1 | 3,3±0,03 | 3,1±0,04* | 3,1±0,03* | 3,0±0,06* | 3,2±0,05* |
| | 2 | 2,7±0,04 | 2,4±0,04* | 2,5±0,05* | 2,4±0,06* | 2,4±0,06* |
| | 3 | 2,4±0,03 | 1,8±0,04* | 1,5±0,03* | 1,7±0,03* | 2,2±0,04* |
| | 4 | 2,5±0,02 | 2,5±0,03 | 2,7±0,02* | 2,7±0,02* | 3,0±0,05* |
| T ₀ , мин | 1 | 7,7±0,12 | 7,2±0,08* | 7,3±0,06* | 7,2±0,07* | 7,7±0,08 |
| | 2 | 5,7±0,07 | 5,1±0,08* | 5,4±0,09* | 5,3±0,010* | 5,0±0,09* |
| | 3 | 5,0±0,08 | 4,1±0,05* | 4,9±0,07 | 5,9±0,05* | 5,2±0,04* |
| | 4 | 5,6±0,06 | 5,5±0,06 | 5,6±0,05 | 7,0±0,08* | 5,8±0,07* |
| Этаноловый тест, +/- | 1 | - | - | - | - | - |
| | 2 | + | + | + | + | ++ |
| | 3 | + | + | + | + | ± |
| | 4 | + | + | + | + | - |

Примечание: * – $p \leq 0,05$ разница статистически достоверна в сравнении с исходными данными.

Дальнейшее наблюдение показало, что у животных из группы отрицательного контроля в течение 24 ч сохранился исходный клинический статус, но усилилась выраженность тахикардии и одышки. В это же время наблюдается усиление выраженности нарушений гемостаза. Так, в сравнении с исходным уровнем, произошло усиление выраженности гиперкоагуляции о чём свидетельствует снижение общего времени свёртываемости крови на 12,3% за счёт сокращения первой (на 13,3%) и второй (на 11,1%) её фаз. Вместе с этим также наблюдается увеличение количества продуктов деградации фибрина.

У больных из группы 3 через 30 мин после введения кетопрофена клинические параметры достоверно не изменились, но отмечено сокращение общего времени свёртывания крови на 18% за счёт сдвига в этом же направлении продолжительности первой фазы на 11,5%.

Через 2 ч у этих телят снизилась температура тела на $0,2 \pm 0,003$ и ЧСС на 1%, а в течение последующих двух часов ещё на $0,4 \pm 0,002$ и 3,2%, соответственно. В конце опыта указанные показатели вновь приблизились к исходному уровню. Анализ крови показал, что в течение первых двух часов после инъекции произошло удлинение на 30,8% первой, но на 37,5% сокращение второй фазы и на 2% общей продолжительности коагуляции. Через 4 ч показатель T₂ снизился на 29,2%, но длительность общего времени свёртывания на 18%. В результате последующих изменений, через 24 ч после введения кетопрофена, сформировался гемостатический профиль, который в сравнении с показателями отрицательного контроля, характеризовался более высоким уровнем длительности общего времени свёртывания крови (на 4%), его первой фазы (на 15,4%), а также уменьшением продуктов деградации фибрина и длительности второй фазы свёртывания крови на 8,3%.

У телят, которым ввели флуниксин меглума в течение всего периода наблюдения сохранились специфические симптомы бронхопневмонии, но отмечено было снижение температуры тела на $0,8 \pm 0,003$ °C, ЧСС на 7,7% и ЧДД на 8,5%. Анализ коагулограммы крови показал, что через 30 мин после инъекции препарата сократилось общая продолжительность свёртывания и её первой фазы на 3,2 и 18%, соответственно, хотя вторая фаза при этом достоверно не изменилась. В течение последующего периода наблюдения, изучаемые показатели достоверно не изменяются, но через 4 ч в сравнении с исходным уровнем длительность первой и второй фазы свёртывания увеличивается на 38,7 и 8%, что стало причиной удлинения общего времени коагуляции на 25%. На заключительном этапе опыта сформировался гемостатический профиль, который в сравнении с показателями отрицательного контроля, характеризовался более высоким уровнем длительности общего времени свёртывания крови (на 16%), его первой и второй фазы на 7,7 и 25%, а также исчезновением продуктов деградации фибрина.

Полученные данные показали, что применение НПВС при бронхопневмонии у телят оказывает жаропонижающий эффект, который оказался более выражен после введения флуниксин меглума, что вероятно обусловлено особенностью механизма действия этого препарата. Результаты исследований подтвердили влияние нестероидных противовоспалительных средств на систему гемостаза, в частности, показано их нормализующее воздействие на нарушенные механизмы свёртывания крови при бронхопневмонии средней тяжести течения. При этом у большинства больных имеет место гиперкоагуляция, обусловленная сокращением продолжительности первой и второй фаз свёртываемости крови. Введение кетопрофена и

флуниксин меглумина начинает оказывать влияние на гемостаз уже через 2 ч, но клинически значимые изменения наблюдаются через 4 ч и проявляются достоверным увеличением общего времени свёртывания крови. Через 24 ч после однократного введения изучаемых препаратов помимо снижения выраженности гиперкоагуляции происходит уменьшение содержания в крови комплексов фибрин/мономера с продуктами расщепления фибриногена/фибрина и фибриногена, что указывает прерыванию каскада развития синдрома диссеминированного внутрисосудистого свёртывания крови, одного из наиболее опасных патологических явлений, определяющих исход болезни.

Интегральным эффектом изучаемых препаратов у больных с наличием гиперкоагуляции является увеличение времени свёртывания крови, однако выявленные особенности его проявления указывают на наличие различий в механизме влияния на гемостаз. Снижение выраженности гиперкоагуляции и риска развития синдрома ДВС в большей степени проявляется после введения флуниксин меглумина. Так, через 24 ч после инъекции длительность общего времени свёртываемости крови оказалось на 11,5% выше, чем у больных, которым назначали кетопрофен. При этом отмеченный эффект достигается преимущественно

за счёт удлинения второй, но не первой фазы свёртывания, как это наблюдается после инъекции кетопрофена. Так же следует отметить, что в течение 24 ч после введения флуниксин меглумина у большинства больных исчезают продукты деградации фибрина, в то время как введения препарата сравнения приводит только к снижению их количества.

Заключение. Подтверждено влияние нестероидных противовоспалительных средств на систему гемостаза и показано их нормализующее воздействие на нарушенные механизмы свёртывания крови у телят больных бронхопневмонией. Полученные данные показали, что производные никотиновой кислоты (флуниксин меглумина) оказывает более выраженное жаропонижающий и гемостазнормализующий эффект, чем препараты, полученные на основе пропионовой кислоты (кетопрофен). Выявленные особенности влияния кетопрофена и флуниксин меглумина на систему гемостаза указывают на разную выраженность ульцерогенного действия у НПВС разной химической структуры, что необходимо учитывать при их назначении. При этом возникает интерес к изучаемым препаратам, как к перспективным средствам для терапии коагулопатий, однако для этого необходимо расширить знания о механизме их влияния на систему свёртывания крови.

Литература

1. Алехин, Ю.Н. Патология фибринолитической системы: клиническое проявление и диагностика (методические рекомендации) / Ю.Н.Алехин, С.В.Куркин. – Воронеж, 2007. – 30 с.
2. Воробьёв, В.Б. Анализ состояния гемостаза с использованием новых возможностей дифференцированной электрокоагулографии / В.Б.Воробьёв, Н.А.Бехтерева, Т.В.Ускова // Фундаментальные исследования. – 2004. – № 5. – С. 19–21.
3. Гржибовский, А.М. Описательная статистика с использованием пакетов статистических программ STATISTICA и SPSS / А.М.Гржибовский, С.В.Иванов, М.А.Горбатова // Наука и здравоохранение. – 2016. – № 1. – С. 7–23.
4. Заславская, Р.М. Легочные синдромы и проблема терапии (Бронхоспастический синдром, гемостаз, застойные лёгкие, временная организация) / Р.М.Заславская, Г.В.Векленко, С.А.Сейтмагамбетова – М.: ИД «МЕД-ПРАКТИКА-М», 2007. – 208 с.
5. Захаренко, А.Г. Нестероидные противовоспалительные средства / А.Г.Захаренко // Вестник фармации. – 2006. – № 1 (31). – С. 57–69.
6. Исмоилов, К.И. Особенности различных звеньев гемостаза при пневмонии у детей грудного возраста / К.И.Исмоилов, С.Т.Давлатов, М.А.Исмоилова // Здравоохранение Таджикистана. – 2015. – № 4. – С. 16–20.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE EFFECT OF NSAIDS ON THE HEMOSTASIS SYSTEM OF CALVES WITH BRONCHOPNEUMONIA

Zhukov M.S. – Candidate of Veterinary Sciences; Alekhin Yu.N. – Doctor of Veterinary Science; Nikulina I.R. – postgraduate.

State Scientific Institution All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy of the Russian Academy of Agricultural Sciences, Voronezh (e-mail: maxim.zhukoff2015@yandex.ru).

The paper presents the results of a study on the effect of ketoprofen and flunixin meglumine on the hemostasis system of calves with acute respiratory diseases. The study involved 4-5 month old animals (n=24) diagnosed with acute catarrhal pneumonia and clinically healthy. From the number of these calves, according to the principle of selection of analogues, 4 groups of 6 heads each were formed. Group 1 (n=6, positive control) included clinically healthy animals that

did not receive pharmacological drugs, in No.2, No.3 and No.4 – animals with bronchopneumonia receiving a course of antimicrobial drugs. In addition, calves in group 3 were injected with intramuscular injection of ketoprofen, at a dose of 3 mg/kg intramuscularly, and No. 4 (n=6) – flunixin meglumine, at a dose of 3.69 mg/kg. The data obtained showed that the use of NSAIDs in bronchopneumonia in calves had antipyretic effect, which was more pronounced after the administration of flunixin meglumine. The ketoprofen and flunixin meglumine was also found to have an effect on the hemostasis system of calves with bronchopneumonia. The beginning of this influence begins after 2 hours, but clinically significant changes are observed after 4 hours. However, the most pronounced and long-lasting effect was rendered by flunixin meglumine.

KEYWORDS: calves, ketoprofen, flunixin meglumine, hemostasis, bronchopneumonia.

References

1. Alekhin, Yu.N. Patologiya fibrinoliticheskoy sistemy: klinicheskoe proyavlenie i diagnostika (metodicheskie rekomendatsii) [Pathology of the fibrinolytic system: clinical manifestations and diagnostics (methodical recommendations)] / Yu.N.Alekhin, S.V.Kurkin. – Voronezh, 2007. – 30 p.
2. Vorobyev, V.B. Analiz sostoyaniya gemostaza s ispol'zovaniem novykh vozmozhnostej differentsirovannoj ehlektrokoagulografii [The analysis of a condition of a hemostasis with use of new opportunities of differentiated elektrokoagulography] / V.B.Vorobyev, N.A.Bekhtereva, T.V.Uskova // Fundamental research. – 2004. – Vol. 5. – P. 19–21.
3. Grzhibovskiy, A.M. Opisatel'naya statistika s ispol'zovaniem paketov statisticheskikh programm STATISTIKA i SPSS [Descriptive statistics using STATISTIKA and SPSS software] / A.M.Grjibovski, S.V.Ivanov, M.A.Gorbatova // Science & Healthcare. – 2016. – Vol. 1. – P. 7–23.
4. Zaslavskaya, R.M. Legochnye sindromy i problema terapii (Bronkhospasticheskiy sindrom, gemostaz, zastojnye lyogkie, vremennaya organizatsiya) [Pulmonary syndromes and the problem of therapy (bronchospastic syndrome, hemostasis, congestive lungs, temporary organization)] / R.M.Zaslavskaya, G.V.Veklenko, S.A.Sejtmagambetova. – M. ID «MEDPRAKTIKA-M», 2007. – 208 p.
5. Zakharenko A.G. Nesteroidnye protivovospalitelnye sredstva [Non-steroidal anti-inflammatory drugs] / A.G.Zakharenko // Vmsnik farmacm. – 2006. – Vol. 1 (31). – P. 57–69.
6. Ismoilov, K.I. Osobennosti razlichnykh zven'ev gemostaza pri pnevmonii u detej grudnogo vozrasta [Features of the various components of hemostasis of pneumonia in infants] / K.I.Ismoilov, S.T.Davlatov, M.A.Ismoilova // Health care of Tajikistan. – 2015. – № 4. – P. 16–20.

УДК 619:616.995.1-07.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗНЫХ ГЕЛЬМИНТООВОСКОПИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ АССОЦИАТИВНЫХ ИНВАЗИЙ ЛОШАДЕЙ

¹Т.Р.Щитковская – кандидат биологических наук; ¹Д.Г.Латыпов – доктор ветеринарных наук, доцент кафедры; ²Л.А.Гайсина – кандидат ветеринарных наук, преподаватель.

¹ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана», г.Казань (420029, г.Казань, Сибирский тракт, 35, e-mail: gtr110285@rambler.ru).

²Казанский кооперативный институт, г.Казань (420087, г.Казань, Даурская, 32, e-mail: ya40360@mail.ru).

Целью настоящего исследования явилось испытание различных гельминтоовоскопических методов при диагностике ассоциативных инвазий лошадей. Наибольшей диагностической эффективностью при нематодозах лошадей обладал усовершенствованный метод Дарлинга с использованием трехингредиентной флотационной жидкости. Данный метод имеет оптимальное сочетание различных факторов: плотности ($p-1,460$), вязкости ($\eta-2,86$), прозрачности поверхностной пленки, замедленной кристаллизации капель на стекле, что способствует повышению диагностической эффективности. Нами были опробованы флотационные растворы из этих же ингредиентов и с большей плотностью $p-1,480-1,520$, но при увеличении плотности, повышается и вязкость и ускоряется время кристаллизации капель на стекле, а поверхностная пленка загрязняется неперевавшими частицами корма, что затрудняет обнаружение яиц гельминтов. Таким образом, усовершенствованный метод Дарлинга с трехингредиентной флотационной смесью $ZnCl_2$, NH_4NO_3 , $C_3H_8O_3$, где плотность флотационного раствора составляет $1,460$, а вязкость $\eta-2,86$, дает возможность диагностировать возбудителей ассоциативных инвазий лошадей, даже при низкой интенсивности инвазии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: диагностика, лошади, нематодозы, параскароз, оксиуроз, кишечные стронгилятозы.

В настоящее время различные желудочно-кишечные гельминты лошадей широко распространены на всей территории России и в странах, входящих в состав ближнего зарубежья. Чаще других встречаются нематоды *Parascaris equorum*, *Oxyurus equi* и *Strongyloides westeri* [2, 3, 4].

Основными методами прижизненной диагностики нематодозов лошадей (параскариоз, кишечные стронгилятозы и др.) являются копрологические методы.

Классическим методом лабораторной диагностики нематодозов лошадей является метод Фюллеборна с использованием насыщенного раствора хлорида натрия, который широко применяется в ветеринарных лабораториях нашей страны [1, 7, 8]. Однако, по мнению ряда исследователей, диагностическая эффективность данного метода низкая, и он не всегда выявляет яйца нематод, особенно при низкой интенсивности инвазии у животных [5, 6].

В результате низкой диагностической эффективности используемых методов не проводится своевременная дегельминтизация лошадей, что приводит к падежу, особенно жеребят, и снижению продуктивности этих животных.

Поэтому разработка новых, более чувствительных, гелинтоовоскопических методов при диагностике нематодозов лошадей является актуальной задачей.

Материалы и методы. Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана» и в хозяйстве ООО «Мирас».

В целях сравнительной оценки эффективности существующих и усовершенствованного нами метода для диагностики нематодозов лошадей было исследовано 15 проб фекалий лошадей, спонтанно инвазированных кишечными нематодами.

Для изучения диагностической эффективности испытывали флотационные и комбинированные методы: Фюллеборна, Калантарян, Дарлинга. В качестве контроля апробировали также усовершенствованный метод Дарлинга.

Флотационные и комбинированные методы с различными флотационными растворами проводили согласно инструкциям по их применению.

Для проведения усовершенствованного метода Дарлинга использовали комбинированную флотационную смесь из трех ингредиентов. Вначале готовили отдельно базовые насыщенные растворы:

1. На 1 л кипящей воды растворили 2 кг цинка хлорида ($ZnCl_2$, $\rho=1,82$);
2. На 1 л кипящей воды растворили 1,5 кг аммиачной селитры (NH_4NO_3 , $\rho=1,32$);
3. Глицерин ($C_3H_8O_3$) $\rho=1,26$.

Перед употреблением эти растворы смешивали, удельный вес трехингредиентной флотационной жидкости равнялся $\rho=1,460$.

Усовершенствованный метод Дарлинга проводили по следующей схеме: пробу фекалий массой 3 г

помещали в стаканчик объемом 50 мл и с помощью дозатора заливали 10 мл горячей воды ($45-50^\circ C$) и тщательно размешивали массу до получения однородной взвеси и при постоянном помешивании добавляли остальную часть воды несколькими порциями, доводя объем до 50 мл. Полученную фекальную взвесь фильтровали через сито (размер ячеек $0,25 \times 0,25$) в другой стаканчик и оставляли на 5 минут. Затем надосадочную жидкость осторожно сливали, а на дне оставляли такое количество взвеси, которое бы вошло в центрифужную пробирку (10 мл) и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 2-х минут. После, всю жидкость из пробирки сливали, осадок на дне взбалтывали с помощью стеклянной палочки до получения взвеси к нему добавляли трехингредиентную флотационную жидкость и снова центрифугировали в том же режиме. Далее прикосанием металлической петли (диаметр 8-10 мм) снимали 5 капель поверхностной пленки жидкости из пробирки и переносили на предметное стекло для микроскопирования.

Для стандартизации исследований в опыте использовали один и тот же материал (фекалии массой 3 г), идентичную посуду (стаканчики высотой 50 мм и объемом 50 мл, флотационные сеточки с размерами ячеек $0,5 \times 0,5$ или $0,25 \times 0,25$ мм, металлические петли диаметром 0,9 мм), отстаивали, флотировали и центрифугировали пробы в течение одного и того же времени.

В каждом варианте, подсчет яиц вели с использованием камеры ВИГИСа, внося в нее 0,2 мл (5 капель) фекальной взвеси.

Таким образом, исследовали весь объем осадка, или поверхностной пленки, а количество обнаруженных яиц суммировали в каждом варианте исследований. Все исследования проводили в пяти повторностях, а полученные результаты подвергали статистическому анализу.

Для подбора флотационной смеси исследовали ее кроме плотности (ρ), времени кристаллизации на стекле и на вязкость (η).

Вязкость измеряли стеклянным вискозиметром с диаметром – $d=0,82$. Рассчитывали относительную вязкость по формуле:

$$\eta = \frac{T_1}{T_0}$$

где (η -вязкость раствора, T_1 – вязкость исследуемой жидкости при данной температуре; T_0 – вязкость эталонной жидкости при данной температуре).

Результаты исследований. Нами было проведено исследование и осуществлен подбор флотационной смеси с оптимальной плотностью, вязкостью и образованию прозрачной поверхностной пленки, а также замедленной кристаллизации капель на стекле.

Диагностическая эффективность разных методов гелинтоовоскопии при диагностике нематодозов лошадей отражена на рисунке 1.

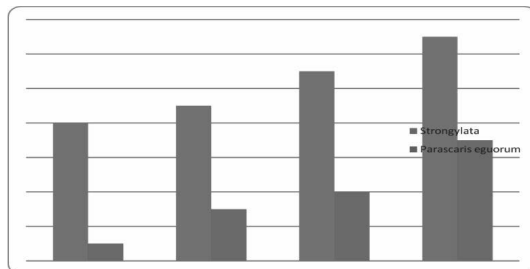


Рис. 1. Диагностическая эффективность разных гельминтоовоскопических методов.

Из рисунка 1 видно, что метод Фюллеборна, где в качестве флотационной жидкости используется хлорид натрия, позволил обнаружить яйца *Strongylata* у 8 (63,5%) лошадей, а *Parascaris equorum* у одного животного.

Метод Калантарян с использованием насыщенного раствора нитрата натрия проявил более высокую диагностическую эффективность: у 9 лошадей были обнаружены яйца *Strongylata*, и у 3-х обнаружены яйца – *Strongylata*, и 4-х *Parascaris equorum*. При этом методе поверхностная пленка после центрифугирования была чистой, а исследуемые капли на стекле не подвергались кристаллизации за счет глицерина. Однако из-за низкой плотности и высокой вязкости флотационного раствора, флотация яиц паразитов происходила медленно и часть их не поднималась на поверхностную пленку.

Наибольшей диагностической эффективностью обладал усовершенствованный метод Дарлинга с использованием трехингредиентной флотационной жидкостью, яйца *Strongylata* удалось выявить у 13 лошадей, что составляет 86,7% и у пяти (33,3%) *Parascaris equorum*. При данном методе сочетаются оптимальная плотность (ρ -1,460), вязкость (η -2,86), прозрачная поверхностная пленка и замедленная кристаллизации капель на стекле, что способствует повышению диагностической эффективности.

Нами были опробованы флотационные растворы из этих же ингредиентов и с большей плотностью ρ -1,480-1,520, путем увеличения содержания цинка хлорида ($ZnCl_2$), но при увеличении плотности, повышается и вязкость и ускоряется время кристаллизации капель на стекле, а поверхностная пленка загрязняется неперевааренными частицами, что затрудняет обнаружение яиц гельминтов.

У флотационных растворов, применяемых по методу Фюллеборна и Калантарян относительно низкая вязкость и составляет, η =1,23 и 1,44, но из-за быстрой кристаллизации капель на стекле затрудняется диагностика нематодозов.

Применение трехингредиентной флотационной жидкости (из насыщенных растворов хлорида цинка, аммиачной селитры и глицерина) с плотностью 1,46 и вязкостью η – 2,86, дало возможность диагностировать возбудителей нематодозов лошадей, при низкой интенсивности инвазии (рис.2). Освободившиеся от фекальных масс яйца гельминтов после центрифугирования быстро всплывали в поверхностный слой, из-за достаточно высокой плотности и низкой вязкости флотационного раствора и замедленной кристаллизации капель. Благодаря прозрачности поверхностной пленки с помощью усовершенствованного метода Дарлинга легко выявлялись яйца стронгилят и параскарисов.

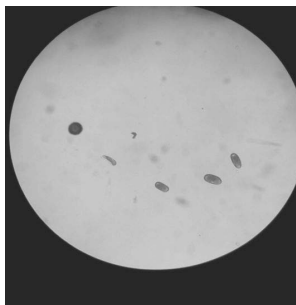


Рис.2. Усовершенствованный метод Дарлинга.

Заключение. Резюмируя, полученные нами данные, можно считать, что в экспериментальных условиях диагностическая эффективность усовершенствованного метода Дарлинга с использованием трехингредиентной флотационной смеси $ZnCl_2$, NH_4NO_3 , $C_3H_8O_3$, где

плотность флотационного раствора составляет 1,460, а вязкость – 2,86, превосходит результаты классического метода Дарлинга, что дает возможность диагностировать возбудителей ассоциативных инвазий лошадей, даже при низкой интенсивности инвазии.

Литература

1. Демидов, Н.В. Гельминтозы животных / Н.В.Демидов. – М.:Агропромиздат, 1987. – 335с.
2. Канокова, А.С. Гельминты лошадей и их сородичей в Кабардино-Балкарской Республике / А.С.Канокова // Бюллетень ВИГИС. – 2003. – Вып. 53. – С. 213–217.
3. Кленова, И.Ф. Гельминтозы лошадей и меры борьбы с ними / И.Ф.Кленова, В.В.Горохов, Л.А.Бундина // Ветеринария. – 2001. – №10. – С. 26–29.
4. Распространение гельминтозов у лошадей табунного содержания в Республике Саха (Якутия) / Л.М.Кокколова, Л.Ю.Гаврильева, З.К.Иванова и [др.] // Российский паразитологический журнал. – 2014. – № 3. – С. 30–33.
5. Котельников, Г.А. Диагностика гельминтозов животных / Г.А.Котельников. – М.: Колос, 1974. – 240 с.
6. Латыпов, Д.Г. Гельминтовооскопическая диагностика ассоциативных инвазий крупного рогатого скота / Д.Г.Латыпов, Л.А.Гайсина // Ветеринарный врач. – 2010. – №1. – С. 50 – 52.
7. Методические рекомендации по диагностике, профилактике и мерам борьбы с гельминтозами цирковых животных / В.Е.Пасечник, А.В.Успенский, Ю.И.Микулец, В.Ю.Жданова. – М.: Россельхозакадемия, 2008. – 50 с.
8. Сидоркин, В.А. Справочник по диагностике и терапии гельминтозов животных и птиц / В.А.Сидоркин. – М.: Аквариум. – 2001. – 128 с.

EFFECTIVENESS OF DIFFERENT HELMINTHOSCOPIC METHODS IN DIAGNOSTICS OF ASSOCIATE INVASION OF HORSES

¹*Schitkovskaya T.R. – Candidate of Biological Sciences; ¹D.G.Latypov – Doctor of Veterinary Sciences; ²Gaysina L.A. – Candidate of Veterinary Sciences.*

¹*Bauman N.E. Kazan State Academy of Veterinary Medicine, Kazan (e-mail: gtr110285@rambler.ru). ²Kazan Cooperative Institute, Kazan (e-mail: ya40360@mail.ru).*

The aim of this study was to test various helminthoscopic methods in the diagnostics of associative horse infestations. The improved Darling method with the use of trichingredient flotation fluid was the most effective for horses' nematodes. This method has an optimal combination of various factors: density (ρ -1.460), viscosity (η -2.86), transparency of the surface film, slow crystallization of droplets on the glass, which contributes to increased diagnostic efficiency. We tested flotation solutions from these same ingredients and with a higher density of ρ -1.480-1.520, but with increased density, the viscosity increases and the crystallization time of droplets on the glass also increases, and the surface film becomes contaminated with undigested particles of the feed, making it difficult to detect helminths. Thus, the improved Darling method with trichingredient flotation mixture $ZnCl_2$, NH_4NO_3 , $C_3H_8O_3$, where the density of the flotation solution is 1.460, and the viscosity of η -2.86, makes it possible to diagnose causative agents of associative infestations of horses, even at low invasion rates.

KEYWORDS: diagnostics, horses, nematodes, parascariosis, oxyurosis, intestinal strongylatoses.

References

1. Demidov, N.V. Gel'mintozy zhivotnykh [Helminthiasis of animals] / N.V.Demidov. – М.: Агропромиздат, 1987. – 335 p.
2. Kanokova, A.S. Gel'minty loshadey i ikh sorodichey v Kabardino-Balkarskoy Respublike [Helminths of horses and their relatives in the Kabardino-Balkarian Republic] / A.S.Kanokova // Buleten WIGIS. – 2003. – Issue 53. – P. 213–217.
3. Klenova, I.F. Gel'mintozy loshadey i mery borby s nimi [Helminthiasis of horses and measures to combat them] / I.F.Klenova, V.V.Gorokhov, L.A.Bundina // Veterinariya – 2001. – № 10. – P. 26–29.
4. Rasprostraneniye gel'mintozov u loshadey tabunnogo sodержaniya v Respublike Sakha (Yakutiya) [Distribution of helminthiasis in horses of herd maintenance in the Republic of Sakha (Yakutia)] / L.M.Kokolova, L.Y.Gavrilieva, Z.K.Ivanova [et al.] // Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal – 2014. – №. 3. – P. 30–33.
5. Kotelnikov, G.A. Diagnostika gel'mintozov zhivotnykh [Diagnostics of helminthiasis of animals] / G.A.Kotelnikov. – М.: Колос, 1974. – 240 p.
6. Latypov, D.G. Gel'mintovoskopicheskaya diagnostika assotsiativnykh invaziy krupnogo rogatogo skota [Helminthoscopic diagnostics of associative invasions of cattle] / D.G.Latypov, L.A.Gaysina // Veterinarny vrach. – 2010. – № 1. – P.50-52.
7. Metodicheskie rekomendatsii po diagnostike, profilaktike i meram borby s gel'mintozami tsirkovykh zhivotnykh [Methodical recommendations on diagnostics, prevention and measures to combat helminthiasis of circus animals] / V.E.Pasechnik, A.V.Uspenskiy, Y.I.Mikuletz, V.Y.Zhdanova. – М.: Rosselkhozakademiya, 2008. – 50 p.
8. Sidorkin, V.A. Spravochnik po diagnostike i terapii gel'mintozov zhivotnykh i ptits [Handbook of diagnostics and therapy of helminthiasis of animals and birds] / V.A.Sidorkin. – М.: Аквариум, 2001. – 128 p.

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ «ИНСПЕКТОР КВАДРО»

¹М.В.Арисов – доктор ветеринарных наук, зав. лабораторией;

²И.П.Белых – кандидат ветеринарных наук, ст.н.с.; ¹В.В.Артемов – аспирант.

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений имени К.И.Скрябина», г. Москва (117218, г. Москва, Б. Черемушкинская, 28; e-mail: arisov_vet@mail.ru).

²ЗАО «Научно-производственная фирма «Экопром» (140070, Московская обл., Люберецкий р-н, пос. Томилино, ул. Гаршина, 11, литер Ф, а/я 917; e-mail: belykh@ekoprom.org).

В статье представлены результаты изучения аллергизирующих свойств нового комбинированного лекарственного препарата для ветеринарного применения «Инспектор Квадро» (празиквантел, фипронил, пирипроксифен, моксидектин), предназначенного для лечения и профилактики арахнозотомозов, нематодозов, цестодозов у собак и кошек. Для исследования были взяты 50 морских свинок массой 300-320 г. Эпикутанную сенсibilизацию проводили на 40 морских свинках путем 20 повторных (по 5 раз в неделю) накожных аппликаций на участки боковой поверхности туловища без шерсти размером 2×2 см в дозе 0,05 мл (1 капля) раствора, нанося равномерным слоем на весь участок. Через 10 сут после сенсibilизации проводили кожную (эпикутанную), внутрикожную, конъюнктивальную и назальную пробы; сыворотку от сенсibilизированных и контрольных животных тестировали в непрямой реакции дегрануляции тучных клеток (НРДТК). Для каждой пробы использовали 10 сенсibilизированных свинок и 10 несенсibilизированных – контроль (наносили физиологический раствор). При оценке эпикутанной пробы установлено, что в течение 72 ч после нанесения препарата сенсibilизированным и контрольным животным по характеру кожной реакции (отсутствии гиперемии, инфильтрации) обработанные участки не отличались у опытных и контрольных свинок. При постановке внутрикожной пробы по истечении 48 ч на коже сенсibilизированных и контрольных свинок было отмечено легкое шелушение. Зафиксированные отклонения в течение 12 ч наблюдения, при постановке конъюнктивальной и назальной проб в обеих группах свидетельствуют о слабовыраженном действии препарата на слизистые оболочки. Показатели, полученные при постановке реакции непрямой дегрануляции тучных клеток, не отличались в группах сенсibilизированных и контрольных животных, что также свидетельствует об отсутствии у препарата аллергизирующих свойств. На основании полученных результатов тестирования установлено, что препарат при 20-ти кратной накожной сенсibilизации в дозе 0,05 мл не вызывает аллергенной активности организма животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лекарственный препарат, раствор, празиквантел, фипронил, пирипроксифен, моксидектин, сенсibilизация, дегрануляция, морские свинки.

Механизм развития аллергической реакции зависит от физико-химических свойств фармакологического средства, дозы, способа и продолжительности введения, способности соединяться с белками организма и др. В связи с этим аллергические реакции развиваются по «немедленному» или «замедленному» типу. Реакции немедленного типа развиваются быстро (10-20 мин), в механизме их участвуют как основное звено реакции антиген-антитело в тканях и в жидких тканевых средах организма, так еще одна составляющая в механизме возникновения аллергической реакции большое значение имеет высвобождение гистамина. Реакции замедленного типа развиваются в течение нескольких часов, иногда суток. Это в основном реакции пролиферативного типа, когда роль играют процессы раздражения эпидермальных соединительнотканых структур и формирование различных типов воспаления. Воспаление обусловлено действием медиаторов, которые высвобождаются из сенсibilизированных лимфоцитов [1, 2].

Исследование новых фармакологических средств на аллергенность должно включать в себя набор методов аллергодиагностики *in vivo* и *in vitro*, из которых в каждом конкретном случае можно выбрать оптимальное сочетание тестов, позволяющих выявить разные типы гиперчувствительности. Поскольку исследуемый препарат используют путем топикального (точечного) нанесения препарата на кожу плотоядным животным, выбраны тесты *in vivo*: кожная (эпикутанная), внутрикожная, конъюнктивальная и назальная пробы; *in vitro*: реакция непрямой дегрануляции тучных клеток (НРДТК).

Материалы и методы. Настоящие исследования проводили в соответствии Методическими указаниями по определению аллергенных свойств новых противопаразитарных препаратов (2009), и руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (2005).

Аллергизирующие свойства препарата изучали на 50 морских свинках массой 300-320 г. Эпикутанную сенсibilизацию проводили на 40 морских свинках

путем 20 повторных (по 5 раз в неделю) кожных аппликаций на участки боковой поверхности туловища без шерсти размером 2×2 см в дозе 0,05 мл (1 капля) раствора, нанося равномерным слоем на весь участок.

Через 10 сут после сенсибилизации проводили кожную (эпикутанную), внутрикожную, конъюнктивальную и назальную пробы; сыворотку от сенсибилизированных и контрольных животных тестировали в непрямой реакции дегрануляции тучных клеток (НРДТК) [5]. Для каждой пробы использовали 10 сенсибилизированных свинок и 10 несенсибилизированных – контроль (наносили физиологический раствор).

Для проведения эпикутанной пробы препарат наносили на выстриженные участки кожи спины (2×2 см) в дозе 0,1 мл (близкая к рекомендованной для клинических испытаний терапевтическая доза). После нанесения препарата, через 15, 30 мин, 24, 48 и 72 ч осматривали кожный покров, состояние которого оценивали в баллах по следующей шкале: 0 – видимой реакции нет; 1 – бледно-розовая эритема по всему участку или по периферии; 2 – ярко-розовая эритема по всему участку или по его периферии; 3 – красная эритема по всему участку; 4 – инфильтрация и отек кожи (утолщение кожной складки) при наличии или отсутствии эритемы, образование корки; 5 – эритема, выраженная инфильтрация, корочки на коже, очаговые изъязвления, возможны геморрагии.

Для проведения внутрикожной пробы сенсибилизированным и контрольным животным (по 10 свинок) однократно вводили 0,01 мл препарата внутрикожно на выстриженном участке 1×1 см. Результаты учитывали через 20-30 мин (аллергическая реакция немедленного типа), через 4-6 ч (немедленно-замедленного типа), через 24 ч (замедленного типа). Отмечали реакцию кожи – возможные появления эритемы, инфильтрата.

Для конъюнктивальной и назальной проб на слизистую конъюнктивы (под верхнее веко) и носовой полости закапывали по 1 капле препарата сенсибилизированным и контрольным животным, соответственно. Оценка конъюнктивальной реакции проводили визуально под лупой при увеличении ×2 через 15 мин (реакция немедленного типа) и через 24-48 ч (замедленного типа) по бальной шкале: 0 – видимых реакций нет; 1 – легкое покраснение слезного протока; 2 – покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице; 3 – покраснение всей конъюнктивы и склеры [3, 4].

При оценке назальной реакции учитывали состояние слизистой оболочки, наличие чихания и усиления секреции слизи в сопоставлении с контрольными животными.

Для постановки непрямой реакции дегрануляции тучных клеток (НРДТК) получали сыворотку от 10 сенсибилизированных животных. Тучные клетки выделяли из перитониальной жидкости 2-х белых крыс массой 300 г после внутрибрюшинного введения физиологического раствора с гепарином в объеме 8-10 мл, подогретого до 37°C. Затем, на предметные стекла, предварительно окрашенные 0,3% спиртовым

раствором нейтрального красного, наносили по 0,03 мл исследуемой сыворотки крови от опытных животных, тучных клеток и аллергена – препарат в разведении 1:100 [6]. Препараты микроскопировали под увеличением объектива ×20, подсчитывали 100 клеток и среди них отмечали дегранулированные (НРДТК оценивали в процентах). Учет реакции: отрицательная – до 10% дегранулированных клеток; слабовыраженная – 11-19%; положительная – 20-29%; резко положительная – 30% и выше.

В контрольную пробу брали тучные клетки и сыворотку крови от тех же свинок. Пробы микроскопировали и подсчитывали 100 тучных клеток, среди которых отмечали дегранулированные в процентах. Реакцию оценивали как отрицательную, если процент дегранулированных тучных клеток в пробе не превышал 10.

Результаты исследований. При оценке эпикутанной пробы установлено, что в течение 72 ч после нанесения препарата сенсибилизированным и контрольным животным по характеру кожной реакции (отсутствие гиперемии, инфильтрации) обработанные участки не отличались у опытных и контрольных свинок. Реакция оценена по шкале в баллах: 0 – видимой реакции нет. Отрицательная кожная реакция свидетельствует об отсутствии гиперчувствительности немедленного и замедленного типа как у сенсибилизированных, так и контрольных животных.

При постановке внутрикожной пробы после введения препарата у сенсибилизированных и контрольных свинок на месте инъекции появилось покраснение в виде «пуговки». В течение 12 ч покраснение у животных обеих групп на месте введения препарата рассасывалось и постепенно переходило в бледно-розовый оттенок с мелким шелушением эпидермиса. По истечении 48 ч на коже сенсибилизированных и контрольных свинок было отмечено легкое шелушение.

Конъюнктивальная реакция при закапывании препарата не отличалась у сенсибилизированных и контрольных животных. В течение 1 ч отмечали покраснение всей конъюнктивы и склеры, в последующем покраснение уменьшалось. Через 24 и 48 ч не было отмечено каких-либо изменений слизистой оболочки и склеры глаз в обеих группах. При оценке назальной реакции установлено, что при закапывании испытуемого препарата наблюдали чихание, усиление секреции слизи и незначительную гиперемии слизистой оболочки в обеих группах. Через 24 и 48 ч никаких отклонений на слизистой оболочке носа отмечено не было.

Зафиксированные отклонения в течение 12 ч наблюдения при постановке конъюнктивальной и назальной проб в обеих группах свидетельствуют о слабовыраженном действии препарата на слизистые оболочки.

О выраженности сенсибилизирующих свойств препарата судили по реакции дегрануляции тучных клеток. Тканевые тучные клетки и базофилы крови играют важную роль при аллергических реакциях,

принимая участие в высвобождении гистамина, гепарина, серотонина и др. Образующиеся при аллергии иммуноглобулины Е в комплексе с аллергеном, адсорбируясь на тучных клетках, способствуют высвобождению из них вазоактивных аминов, что выражает-

ся в их разбухании, образовании вакуолей и выхода содержимого клетки за ее пределы. Это явление называется дегрануляцией тучных клеток, что и фиксируем как положительную реакцию. Результаты исследований приведены в таблице.

Таблица

Результаты исследования реакции дегрануляции тучных клеток

| № животного | Процент дегрануляции тучных клеток в опыте | Процент дегрануляции тучных клеток в контроле | Разница дегрануляции тучных клеток в опыте и контроле, % |
|-------------|--|---|--|
| 1 | 5 | 6 | 1 |
| 2 | 7 | 8 | 1 |
| 3 | 6 | 7 | 1 |
| 4 | 8 | 7 | 1 |
| 5 | 7 | 5 | 2 |
| 6 | 6 | 5 | 1 |
| 7 | 5 | 7 | 2 |
| 8 | 6 | 6 | 0 |
| 9 | 8 | 7 | 1 |
| 10 | 7 | 6 | 1 |
| M±m | 6,5±0,77 | 6,4±0,69 | 1,1±0,4 |

Согласно полученным данным процент дегрануляции тучных клеток у опытных животных был на уровне 6,5±0,77, в контроле – 6,4±0,69. Считается, что препарат не обладает сенсibiliзирующими свойствами, если количество дегранулированных тучных клеток в пробе не превышает 10%.

Заключение. Из проведенных исследований следует, что при эпикутанном, внутрикожном, конъюнктивальном и назальном тестировании наблюдается отсутствие гиперчувствительности немедленного и замедленного типа как у сенсibiliзированных, так и контрольных животных. Отклонения, отмеченные в опытной и контрольной группах, при постановке конъ-

юнктивальной и назальной проб, свидетельствуют о слабо выраженном действии препарата на слизистые оболочки. Показатели, полученные при постановке реакции непрямой дегрануляции тучных клеток, не отличались в группах сенсibiliзированных и контрольных животных, что также свидетельствует об отсутствии у препарата алергизирующих свойств. Таким образом, на основании полученных результатов тестирования установлено, что лекарственный препарат для ветеринарного применения «Инспектор Квадро» при 20-ти кратной кожной сенсibiliзации в близко терапевтической дозе не вызывает алергической активности организма животных.

Литература

1. Адо, А.Д. Общая алергология / А.Д.Адо. – М.: Медицина, 1978. – 426 с.
2. Алексеева, О.Г. Аллергия к промышленным химическим соединениям / О.Г.Алексеева, Л.А.Дуева. – М.: Медицина, 1978. – 271 с.
3. Курочкина, К.Г. Методические указания по определению алергических свойств новых противопаразитарных препаратов / К.Г.Курочкина. – М., 2009. – 15 с.
4. Методы определения сенсibiliзации организма животных. Методические рекомендации. – Новочеркасск, 1987. – 31 с.
5. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных: приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г. – М., 1977. – 7 с.
6. Радунская, С.Ф. Тест непрямой дегрануляции ТК крыс как метод оценки специфической активности инфекционных алергенов: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.00.36 / С.Ф.Радунская. – М., 1982. – 16 с.
7. Фрадкин, В.А. Аллергодиагностика in vitro / В.А.Фрадкин. – М.: Медицина, 1975. – 143 с.

STUDY OF ALLERGENIC PROPERTIES OF THE DRUG FOR VETERINARY USE "INSPECTOR QUADRO"

¹Arisov M. V. – Doctor of Veterinary Sciences; ²Belykh I. P. – Candidate of Veterinary Sciences;
¹Artemov V. V. – postgraduate.

¹All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants
named after K. I. Skryabin (e-mail: arisov_vet@mail.ru).
²JSC "Research and Production Company "Ekoprom" (e-mail: belykh@ekoprom.org).

The article presents the results of studying the allergenic properties of the new combined drug for veterinary use "Inspector Quadro" (praziquantel, fipronil, pyriproxifen, moxidectin) intended for the treatment and prevention of arachnoentomosis, nematodosis, cestodosis in dogs and cats. For the study, 50 guinea pigs weighing 300-320 g were taken. Epicutaneous sensitization was carried out on 40 guinea pigs by 20 repeated (5 times per week) cutaneous applications on the sides of the trunk without wool 2 x 2 cm in a dose of 0.05 ml (1 drop) solution, applying a uniform layer on the entire site. Ten days after sensitization, the cutaneous (epicutaneous), intradermal, conjunctival and nasal samples were performed; serum from sensitized and control animals was tested in an indirect mast cell degranulation (NTDT) reaction. 10 sensitized guinea pigs and 10 non-sensitized controls were used for each sample (saline was applied). When assessing the epicutaneous test, it was established that within 72 hours after the application of the preparation to the sensitized and control animals, the treated areas did not differ in the pattern of the skin reaction (absence of hyperemia, infiltration) in the experimental and control guinea pigs. When the intradermal test was performed after 48 hours, slight peeling was observed on the skin of the sensitized and control guinea pigs. Fixed deviations during 12 hours of observation, with conjunctival and nasal samples in both groups, indicate a mild effect of the drug on the mucous membranes. The indicators obtained during the reaction of indirect degranulation of mast cells did not differ in the groups of sensitized and control animals, which also indicated the absence of allergic properties in the preparation. On the basis of the obtained test results the preparation with a 20-fold cutaneous sensitization in a dose of 0.05 ml is not found to cause allergenic activity of animal's organism.

KEYWORDS: drug, solution, praziquantel, fipronil, pyriproxifen, moxidectin, sensitization, degranulation, guinea pigs.

References

1. Ado, A. D. Obschchaya allergologiya [General Allergology] / A. D. Ado. – M.: Medicine, 1978. – 426 p.
2. Alekseeva O. G. Allergiya k promyshlennym himicheskim soedineniyam [Allergy to industrial chemicals] / O. G. Alekseeva, L. A. Dueva. – M.: Medicine, 1978. – 271 p.
3. Kurochkina, K. G. Metodicheskie ukazaniya po opredeleniyu allergennykh svojstv novykh protivoparazitarnykh preparatov [Guidelines for determining the allergenic properties of new antiparasitic drugs] / K. G. Kurochkina. – M., 2009. – 15 p.
4. Metody opredeleniya sensibilizatsii organizma zhivotnykh. Metodicheskie rekomendatsii [Methods for determining the sensitizing animals. Guidelines]. – Novocherkassk, 1987. – 31 p.
5. The Rules of work with experimental animals: order of the Ministry of Health of the USSR number 755 of 12.08.77. – M., 1977. – 7 p.
6. Radunskaya, S. F. Test nepryamoj degranulyatsii TK krysa, kak metod ocenki specificheskoy aktivnosti infektsionnykh allergenov: abstract dis. ... candidate of biological sciences: 14.00.36 [Test of indirect degranulation of mast cells of rats, as a method of evaluation of the specific activity of infectious allergens] / S. F. Radunskaya. – M., 1982. – 16 p.
7. Fradkin, V. A. Allergodiagnostika in vitro [Allergodiagnosics in vitro] / V. A. Fradkin. – M.: Medicine, 1975. – 143 p.

ВЛИЯНИЕ АПИФИТОПРЕПАРАТА «ВИТА-ФОРЦЕ М» НА ОКСИДАТИВНЫЙ РАДИАЦИОННЫЙ СТРЕСС

М.З. Тухфатулов – соискатель.

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань (420075, Казань, Научный городок-2, тел. +7-(843)-239-53-20, e-mail: vniivi@mail.ru).

Модель экспериментального радиационного стресса (РС) воспроизводилась на 40 белых крысах, разделенных на 4 группы. I группа – опытные животные; II группа – облученные животные; III группа – облученные и получавшие в качестве стресс-протектора апифитопрепарат «Вита-Форце М», IV группа – животные, получавшие в качестве стресс-протектора апифитопрепарат «Вита-Форце М» с последующим облучением. Моделирование радиационного стресса проводили путем однократного внешнего облучения животных в дозе 7,7 Гр на гамма установке «Пума» с источником излучения Co^{60} . В течение 10 дней до (III группа) и в течение 10 дней после облучения (IV группа), животные ежедневно получали с кормом апифитопрепарат «Вита-Форце М» в количестве 0,1 г/кг корма. Для оценки антиоксидантной эффективности препарата исследовали степень накопления малонового диальдегида, и активность одного из ключевых ферментов антиоксидантной защиты – пероксидазы. Установлено, что радиогенный стресс индуцировал интенсификацию процессов пероксидации липидов, увеличивая концентрацию малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови на 39,8% по сравнению с контролем с одновременным ингибированием активности фермента – пероксидазы. Применение апифитопрепарата на фоне радиогенного стресса сопровождалось благоприятным течением острой лучевой болезни (выживаемость 66% при 100% гибели летально облученных животных), при которой активность пероксидазы и концентрация МДА приближалась к показателям контрольной (необлученной) группы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: радиогенный стресс, гамма-облучение, фермент антиоксидантной защиты пероксидаза, продукт перекисного окисления малонового диальдегид, апифитопрепарат «Вита-Форце М».

Одной из важнейших сторон метаболизма и играющей существенную роль в обеспечении процессов жизнедеятельности организма животных является свободнорадикальное окисление липидов (СРОЛ), нарушение которого приводит к развитию оксидативного (окислительного) стресса, что диктует необходимость своевременной коррекции этих нарушений препаратами природного происхождения [3].

Модификация рационов кормления животных путем введения в их состав биологически активных веществ, обладающих способностью регулировать функциональную активность организма, является перспективным направлением ведения животноводства в условиях интенсивного техногенеза.

С учетом изложенного нами разработана натуральная биологически активная кормовая добавка «Вита-Форце М» на основе продуктов пчеловодства (прополис, перга, трутневый расплод, пчелиный подмор), животного (кровяная мука), растительного (хвоя, травяная мука) и минерального (бентонит) происхождения, обладающая полифункциональными (метаболизм стимулирующим, иммуностимулирующим, противомикробным, радиозащитными свойствами) [2]. В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы было изучение антиоксидантного действия препарата «Вита-Форце М» на модели радиационного стресса.

Материалы и методы. Опыты по оценке антиоксидантного действия апифитопрепарата «Вита-Форце М» проводили на 40 белых крысах, разделенных на 4 группы по 10 животных в каждой.

Первая группа животных, не подвергнутая радиационному стрессу и, получавшая обычный рацион, без кормовой добавки служила биологическим контролем. Животные II группы были подвергнуты радиационному стрессу путем гамма облучения в дозе 7,7 Гр, вызывающей тяжелую степень острой лучевой болезни (ОЛБ) (контроль облучения – радиационный стресс). III группа – облученные в дозе 7,7 Гр животные в течение 10 дней до облучения получали с обычным рационом кормовую добавку «Вита-Форце М» в количестве 0,1 г/кг корма. Облученные в вышеуказанной дозе гамма-лучами животные IV группы в течение 10 дней после облучения получали в составе обычного рациона кормовую добавку «Вита-Форце М» в дозе 0,1 г/кг корма.

Фармакоррекцию окислительного радиационного стресса оценивали по ингибированию интенсивности процессов окисления липидов – снижение накопления МДА [4], содержанию уровня антиокислительного фермента-пероксидазы в сыворотке крови облученных и получавших апифитопрепарат «Вита-Форце М» [5]. Об активности перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по содержанию малонового диальдегида, образующего реакцию окрашивания с тиобарбитуратовой кислотой (ТБК), интенсивность которого регистрировали спектрофотометром СФ-46 при длине волны 535 нм. В качестве окисляемого субстрата при определении пероксидазной активности использовали пирогаллол, который окисляясь превращается в пурпурогаллин с максимумом поглощения 430 нм. Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре СФ-46.

Используемый раствор содержал 0,8 мл 0,006М натрий-фосфатного буфера pH 6,8; 0,12 мл, ферментной вытяжки (сыворотка крови); 0,5 мл 0,15%-ной H₂O₂; 1,1 мл H₂O и 0,5 мл 0,003М пиригаллола. В контроле вместо H₂O₂ добавляли 0,5 мл H₂O.

Активность фермента определяли по формуле:

$$A = D_{12} - D_{11} / t_2 - t_1 / C,$$

где A – активность фермента, D – оптическая плотность, t – время (с), C – концентрация. Измерения проводили в течение 5-3 минут.

В качестве интегрального показателя антирадикальной защиты организма на фоне радиогенного стресса использовали выживаемость летально облученных животных, получавших в качестве биоантиоксиданта – кормовую добавку «Вита-Форце М».

Результаты исследований. Динамика изменения концентрации продуктов липопероксидации липидов и антиоксидантного фермента – пероксидазы в сыворотке крови подвергнутых радиогенному стрессу и получавших на этом фоне потенциальный биооксидант – апифитопрепарат «Вита-Форце М» представлена в таблице.

Из данных таблицы видно, что содержание продуктов пероксидации липидов (ПОЛ), представленных в виде МДА в крови облученных в дозе 7,7 Гр животных, получавших стандартный рацион кормления, достоверно увеличивается после воздействия гамма-лучей (радиогенный стресс).

Таблица

Динамика МДА и фермента антиоксидантной защиты – пероксидазы в организме крыс на фоне применения апифитопрепарата «Вита-Форце М»

| Группа | Фон | Срок исследования, сут | | |
|--|-----------|------------------------|-----------------|----------------|
| | | 5 | 10 | 15 |
| МДА мкмоль/л | | | | |
| I | 1,15±1,13 | 1,18±0,03 | 1,15±0,01 | 1,13±0,01 |
| II | 1,17±0,13 | 2,48±0,05* | 2,51±0,07** | 2,57±0,03** |
| III | 1,15±0,11 | 1,77±0,04* | 1,79±0,03* | 1,25±0,05 |
| IV | 1,13±0,17 | 1,81±0,03 | 1,83±0,03* | 1,31±0,07 |
| Пероксидаза ×10 ⁻³ (с-1 мг-1) | | | | |
| I | 0,04±0,01 | 0,05±0,03 | 0,03±0,01 | 0,04±0,01 |
| II | 0,03±0,01 | 0,01±0,001** | 0,007±0,0001*** | 0,003±0,001*** |
| III | 0,05±0,01 | 0,04±0,01 | 0,04±0,001 | 0,04±0,001 |
| IV | 0,04±0,01 | 0,03±0,007 | 0,02±0,001 | 0,03±0,001 |

* – P<0,05; ** – P<0,01; *** – P<0,001.

Так, через 5 сут после радиогенного стресса (II группа), концентрация продуктов ПОЛ в сыворотке крови возросла в 2,12 раза, через 10 – в 2,14 раза и через 15 сут – 2,2 раза (P<0,01) по сравнению с необлученными животными. При этом активация ПОЛ, по видимому, была связана как с увеличением скорости генерации O₂- [1], так и со снижением активности антиоксидантных ферментов [6].

Результаты параллельных биохимических исследований сыворотки крови подвергнутых радиогенному стрессу животных показали, что радиоиндуцированное повышение продуктов липопероксидации липидов (ПОЛ) сопровождалось реципрокным ингибированием активности антиоксидантного фермента – пероксидазы (табл.). Как видно из данных таблицы, в ответ на воздействие гамма-излучения, концентрация пероксидазы в сыворотке крови облученных животных (II группа) понижалась на 33,3 %, 42,8% и 100% на 5, 10 и 15 сут после радиогенного стресса соответственно (P<0,01, P<0,001).

Внесение в кормовой рацион добавки «Вита-Форце М» приводило к нормализации прооксидантно-антиоксидантной системы организма, снижая содержание продуктов липопероксидации на 5 и 10 сут после облучения в 1,4 раз (P<0,01) и на 15 сут – в 2,06 раза (P<0,01) по сравнению с облученными животными, содержащими на обычном рационе. Добавление в рацион кормления апифитопрепарата как до, так и после облучения обеспечивало сохранение активности антиоксидантного фермента – пероксидазы, концентрация которой во все сроки исследования достоверно отличалась от таковой контрольной (необлученной) группы животных.

Нормализация системы прооксидантно-антиоксидантной системы организма на фоне применения апифитопрепарата «Вита-Форце М» сопровождалось повышением резистентности организма к стрессирующему агенту ионизирующей радиации – выживаемость летально облученных животных на фоне применения испытуемого препарата («Вита-Форце М») составила 64,6% при 100%-ной гибели только облученных животных.

Заключение. Обобщая полученные данные по влиянию апифитопрепарата «Вита-Форце М» на систему антиоксидантной защиты организма, можно сделать заключение, что испытываемая биологически активная кормовая добавка обладает антирадикальным, антиоксидантным свойством, что подтверждается установленной взаимосвязью между продуктом пероксидации

липидов и антирадикальным ферментом (пероксидазой). Кроме того, полученные результаты дополняют имеющиеся в литературе сведения о механизмах функционирования животных в условиях техногенеза и внесет определенный вклад в вопросы, связанные с повышением адаптационных возможностей животных к условиям среды с высокой стрессгенностью.

Литература

1. Барабой, В.А. Перекисное окисление и радиация / В.А.Барабой, В.Э.Орел, И.М.Карноух. – Киев: Наук. Думка, 1991. – 256с.
2. Патент RU № 2522339, МПК А23К 1/16, А23К 1/00. Натуральная биологически активная кормовая добавка «Вита-Форце М» / А.В.Иванов [и др.]; заявитель и патентообладатель ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». – № 2013108131/13; заявлено 22.02.2013; опубл. 10.07.2014, Бюл. № 19. – 8 с.
3. Зинков, Н.К. Окислительный стресс / Н.К.Зинков, В.З.Ломкин, Е.Б.Меньшикова. – М.: Наука, 2004. – 343 с.
4. Кудряшов, Ю.Б. Роль радиотоксинов в реализации лучевых поражений / Ю.Б.Кудряшов, Е.Н.Гончаров. // Инф. Блог. Радиобиол. – 1964. – В. 30. – С. 3-5.
5. Кушманова, О.Д. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии / О.Д.Кушманова, Г.М.Иванченко. – М.: Медицина, 1983. – 267с.
6. Halliwell, B. Free Radicals in biology and medicine. – Oxford: Univ. Press, 2002. – 936p.

INFLUENCE OF APIPHYTOPREPARATION “VITA-FORCE M” ON OXIDATIVE RADIATION STRESS

Tukhfatulov M.Z. – applicant.

Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan (e-mail: vnivi@mail.ru).

The model of the experimental radiation stress (RS) was applied on 40 white rats divided into four groups: 1 group – experimental animals; 2 group – animals exposed to radiation; 3 group – irradiated and taken stress protector apiphytopreparation “Vita-Force M” followed by exposure. The modeling of radiation stress was carried out by once external exposure of animals at a dose of 7.7 g on the gamma-installation “Puma” with radiation source of Co 60. Every day, the animals was taken 0.1 g/kg apiphytopreparation “Vita-Force M” with feed for 10 days before exposure (3 group) and for 10 days after exposure (4 group). To evaluate antioxidant efficacy of the preparation we studied degree of malonic dialdehyde accumulation as well as activity of one of the main enzymes of antioxidant protection - peroxidase. The radiogenic stress was found to induce the intensification of lipid peroxidation processes, increasing the concentration of malondialdehyde (MDA) in the blood serum by 39.8% compared to the control while inhibiting the activity of peroxidase enzyme. The use of apiphytopreparation on the background of radiogenic stress was accompanied by a favorable course of acute radiation sickness (survival rate of 66% with 100% death of lethally irradiated animals), at which peroxidase activity and MDA concentration were close to those of the control (nonirradiated) group.

KEYWORDS: radiogenic stress, gamma-exposure, enzyme of antioxidant protection – peroxidase, the product of peroxidation malondialdehyde, apiphytopreparation “Vita-Force M”.

References

1. Baraboy, V.A. Perekisnoe okislenie i radiatsiya [Peroxide oxidation and radiation] // V.A.Baraboy, V.E.Orel, I.M.Karnoukh. – Kiev: Naukova dumka, 1991. – 256 p.
2. Patent RF № 2522339, МПК А23К 1/16, А23К 1/00. Naturalnaya biologicheskii aktivnaya kormovaya dobavka “Vita-Force M” [Natural biologically active additive “Vita-Force M”] / A.V.Ivanov [et al]; applicant and patentee FGBU “FCTRB-VNIVI”. – № 2013108131/13; declared 22.02.2013; published 10.07.2014, Bulletin № 19. – 8 p.
3. Zinkov, N.K. Okislitelny stress [Oxidative stress] / N.K.Zinkov, V.Z.Lomkin, E.B.Menshikova. – М.: Nauka, 2004. – 343 p.
4. Kudryashov, Yu.B. Rol radiotoksinov v realizatsii luchevykh porazheniy [The role of radiotoxins in the implementation of radiation damages] / Yu.B.Kudryashov, E.N.Goncharov // Informatsionnyy blog Radiobiologii. – 1964. – Issue 30. – P. 3–5.
5. Kushmanova, O.D. Rukovodstvo k laboratornym zanyatiyam po biologicheskoy khimii [Manual to laboratory studies in biological chemistry] / O.D.Kushmanova, G.M.Ivanchenko. – М.: Medicina, 1983. – 267 p.
6. Halliwell, B. Free Radicals in biology and medicine. – Oxford: Univ. Press, 2002. – 936 p.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОЛУЧЕНИЯ НАТИВНОГО НЕЙРОТОКСИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* ТИПА А МЕТОДОМ КОНЦЕНТРАЦИИ И ВЫСАЛИВАНИЯ СУЛЬФАТОМ АММОНИЯ

¹Э.Н. Мустафина – кандидат ветеринарных наук, вед. н. с.; ²Т.Р. Мустафин – кандидат биологических наук, зав. лабораторией; ¹Н.С. Садыков – доктор ветеринарных наук, профессор, гл. н. с.

¹ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань (420075, г. Казань, Научный городок-2, тел. (843)239-53-20, e-mail: vnivi@mail.ru).
²Предприятие «ПромАсептика», г. Казань (420140, г. Казань, ул. Минская, 6, оф. 136, тел. (906)323-85-31, e-mail: swa862@mail.ru).

Одной из основных задач, для разработки новых способов диагностики и лечения ботулизма, является изучение его токсинов. По этой причине, в данном исследовании мы сравниваем и оцениваем два способа получения и накопления нативного нейротоксического комплекса (токсина) *Cl. Botulinum* тип А. Первый метод получения и накопления нейротоксического комплекса, представляет собой концентрацию токсина неорганическим бинарным соединением, аммонийной соли серной кислоты. Второй способ следует по пути высаливания нативного нейротоксического комплекса (токсина) *Cl. Botulinum* тип А, тем же сульфатом аммония, но при других условиях, количестве и способе введения его в культуральную жидкость. Наряду с вышеизложенным, методы отличаются подготовкой культуральной жидкости полученной от *Clostridium botulinum* тип А. По результатам экспериментов по сравнению методов получения и накопления нативного нейротоксического комплекса (токсина) *Cl. Botulinum* тип А, наиболее эффективным и специфичным, является метод концентрации токсина сульфатом аммония.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ботулизм, токсин, сульфат аммония, концентрация, высаливание.

Ботулизм – острое заболевание, обусловленное действием протеинового нейротоксина, вырабатываемого вегетативными формами *Clostridium Botulinum*. В настоящее время известно 8 типов возбудителя ботулизма (А, В, С α , С β , D, E, F, G), которые отличаются между собой по антигенным свойствам вырабатываемых ими токсинов и некоторыми другими признаками.

Возбудитель ботулизма относится к политропным представителям микробов, которые в ходе инфекционного процесса занимают ряд последовательных локализаций в организме, тем самым обнаруживая свою адаптированность к ряду различных органов и тканей, однако это есть единая форма болезни, в которой разные локализации возбудителя соответствуют разным стадиям болезни (кишечник, печень, легкие, нервная система) [1, 3, 4, 6].

Токсины *Clostridium Botulinum* состоят из нескольких токсических факторов: нейротоксина, гемолизина, липазы и протеазы. Из них основным токсином для всех типов возбудителя, имеющим решающее значение в интоксикации организма, служит нейротоксин. Протеолитические ферменты пищеварительного тракта не разрушают токсины типа А, В, С, F, G и усиливают активность токсина типа Е (в основном вырабатывается бактериальной клеткой в виде протоксина) [2]. Токсин ботулизма представляет собой протеин, состоящий как бы из двух фрагментов, связанных дисульфидными мостиками и, попадая в кишечник животного, всасывается в кровь и разносится по всему организму. Вследствие разрушения нервных

центров продолговатого мозга развиваются параличи глотки, жевательных мышц и языка. Токсин подавляет выделение ацетилхолина, а это ведет к расслаблению скелетных мышц, нарушению движения, к параличам дыхательных и сердечных мышц, асфиксии и смерти животных и человека [5].

Цель работы заключалась в сравнении двух методов получения нативного нейротоксического комплекса (токсина) *Clostridium Botulinum* тип А.

Материалы и методы. Метод № 1 – «Концентрация токсина сульфатом аммония». Осуществляли посев культуры *Clostridium botulinum* тип А на среду Китта-Тароцци с 1% глюкозой под вазелиновым маслом и культивировали в термостате при 350С трое суток. По истечении культивирования, выкачивали культуральную жидкость, освобожденную от кусочков печени и вазелинового масла, и помещали в ультразвуковой дезинтегратор, для направленного разрушения клеток *Cl. botulinum*, в диапазоне не менее 15 микрон в течение 15 минут. В полученную лизированную смесь добавляли сульфат аммония, в расчете 60% аммония от общего объема полученной культуральной жидкости. Смесь ставили на магнитную мешалку, без подогрева, до полного растворения сульфата аммония. Далее, центрифугировали раствор при 6000 об/мин в течение 45 мин, супернатант удаляли, а осадок ресуспензировали стерильной дистиллированной водой, разбавляя его в 10 раз. Раствор диализировали против карбонатно-бикарбонатного буфера (КББ), с целью освобождения от солей сульфата аммония. Диализ раствора проводили от 1-1,5

недели, исходя из учета количества диализируемого раствора (диапазон времени диализа выявлен в ходе наших сравнительных экспериментов). По окончании диализа, раствор, освобожденный от сульфата аммония, вводили внутривентриально белым мышам, для подтверждения наличия нейротоксического комплекса *Cl. botulinum* тип А.

Метод № 2 – «Высаливание токсина сульфатом аммония». Производили посев *Cl. botulinum* тип А, аналогично методу № 1, освобождая культуральную жидкость от кусочков печени и вазелинового масла, и добавляли растертый до состояния муки и высушенный серноокислый аммоний, в расчете 70% соли от общего объема полученной культуральной жидкости. Смесь помещали на магнитную мешалку, без подогрева, до полного растворения сульфата аммония и выдерживали при + 40°C в холодильнике в течение 3 часов. По

истечении этого времени, с поверхности смеси собрали образовавшуюся пленку и разбавили ее в 10 раз стерильной дистиллированной водой. Аналогично методу № 1 проводили диализ против карбонатно-бикарбонатного буфера (КББ) и вводили белым мышам, с сохранением тех же условий и рекомендаций.

Результаты исследований. Сравнение методов получения нативного нейротоксического комплекса (токсина) *Cl. botulinum* тип А производили путем постановки биологической пробы на белых мышах. Все мыши имели примерно одинаковый вес (отклонение не более 2 г), а все исследуемые образцы вводились внутривентриально, при одинаковых условиях. Дозы введения образцов варьировались от 0,1-1 см³, в целях более точного выявления наилучшего метода концентрации токсина ботулизма. В опыте было использовано 40 мышей (табл.).

Сравнение методов получения нативного нейротоксического комплекса (токсина) *Clostridium Botulinum* тип А при внутривентриальном введении белым мышам

| Показатель | Метод № 1. | | | | Метод № 2. | | | |
|----------------------------------|--|-----|-----|---|---------------------------------------|-----|-----|---|
| | Концентрация токсина сульфатом аммония | | | | Высаливание токсина сульфатом аммония | | | |
| Доза введения (см ³) | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 1 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 1 |
| Количество мышей | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Пало | 5 | 5 | 5 | 5 | - | 1 | 5 | 5 |
| Живы | - | - | - | - | 5 | 4 | - | - |

За мышами наблюдали в течение 10 сут с момента введения им нативного токсина.

В первые сутки эксперимента падеж мышей был зарегистрирован после введения токсина, полученного методом №1: в дозе 1 см³ – 5; в дозе 0,5 см³ – 5 и в дозе 0,2 см³ – 4 мыши. При введении токсина, полученного методом №2, в дозе 1 см³ пали 5 мышей; при дозе 0,5 см³ – 2.

На вторые сутки картина была следующей: при введении токсина, полученного первым способом, в дозе 0,2 см³ – пала одна мышь, в дозе 0,1 см³ – 4; а при введении токсина, полученного вторым способом, в дозе 0,5 см³ пали 3 мыши; в дозе 0,2 см³ – 1 мышь.

В результате введения токсина, полученного методом №1 в дозе 0,1 см³, на третьи сутки эксперимента пала 1 мышь.

Клиническая картина падежа мышей была характерна картине, проявляющейся при ботулизме. Оставшихся в живых 9 мышей, на 10 сут эксперимента уничтожили гуманным способом.

Как видно из таблицы, токсин, полученный методом №1, при тех же условиях, дозах и способе введения оказывает более сильный летальный эффект, чем токсин, полученный методом №2, что, безусловно, указывает на высокое содержание в первом нейротоксического комплекса (токсина) *Cl. botulinum* тип А.

Заключение. Таким образом, по результатам исследований можно сделать вывод, что оба метода накопления нативного нейротоксического комплекса (токсина) *Cl. botulinum* тип А имеют свои плюсы и минусы. Метод № 1 «Концентрация токсина сульфатом аммония» более сложный и требует наличие соответствующего оборудования, по сравнению с методом №2 «Высаливание токсина сульфатом аммония», но раствор, полученный данным способом, во-первых, содержит более высокую концентрацию токсина, во-вторых, при ультразвуковой гомогенизации происходит полный лизис микробных клеток *Cl. botulinum*, что делает культуральную жидкость наиболее специфичным и пригодным для дальнейшей работы по изучению ботулизма.

Литература

1. Никифоров, В. В. Ботулизм : учебно-методическое пособие для врачей / В.В.Никифоров, Н.А.Малышев, Б.И.Санин // – М., 2003. – 32 с.
2. Межгосударственный стандарт (ГОСТ 10444.7-86) «Методы выявления ботулинических токсинов и *Clostridium botulinum*». – М., 2002. – 28 с.
3. Никифоров, В.Н. Ботулизм / В.Н.Никифоров, В.В.Никифоров // – М.: Медицина, 1985. – 198 с.
4. Иванова, М.А. Ботулизм : учеб.-метод. пособие / М.А.Иванова // – Минск: БГМУ, 2009. – 24 с.

5. Lindstrom, M. Multiplex PCR Assay for Detection and Identification of Clostridium botulinum Types A, B, E and F in food and fecal material / M.Lindstrom, R.Keto, A.Markkula, S.Hiell, H.Korkeala // Applied and Environmental Microbiology. – Dec 2001. – P. 5694–5699.

6. Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология / В.Н.Кисленко, Н.М.Колычев, Р.Г.Госманов // ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 746 с.

COMPARATIVE EVALUATION OF THE PRODUCTION OF THE CLOSTRIDIUM BOTULINUM A NEW NEUROTOXIC COMPLEX TYPE A BY CONCENTRATION AND EMBOSING BY SULFURIC AMMONIUM

¹Mustafina E.N. – Candidate of Veterinary Sciences; ²Mustafin T.R. – Candidate of Biological Sciences; ¹Sadykov N.S. – Doctor of Veterinary Sciences, professor.

¹Federal Center for Toxicology, Radiation and Biological Safety, Kazan (e-mail: vnivi@mail.ru).

²The company "PromAseptika", Kazan (e-mail: swa862@mail.ru).

One of the main tasks for developing new ways of diagnosing and treating botulism is to study its toxins. For this reason, in this study we compare and evaluate two methods of obtaining and accumulating a native neurotoxic complex (toxin) Cl. Botulinum type A. The first method of obtaining and accumulating a neurotoxic complex is the toxin concentration by an inorganic binary compound, an ammonium salt of sulfuric acid. The second method follows the way of salting out the native neurotoxic complex (toxin) Cl. Botulinum type A, the same ammonium sulfate, but under other conditions, the amount and method of introducing it into the culture liquid. Along with the foregoing, the methods differ in the preparation of the culture fluid obtained from Clostridium botulinum type A. Based on the results of experiments comparing methods of production and accumulation of the native neurotoxic complex (toxin) Cl. Botulinum type A, the most effective and specific, is the method of concentration of toxin by ammonium sulfate.

KEYWORDS: botulism, toxin, ammonium sulfate, concentration, salting out.

References

1. Nikiforov, V.V. Botulizm: uchebno -metodicheskoye posobiye dlya vrachey [Botulism: educational and methodological manual for physicians] / V.V.Nikiforov, N.A.Malyshev, B.I.Sanin // – M., 2003. – 32 p.

2. Mezhdgosudarstvennyy standart (GOST 10444.7-86) «Metody vyyavleniya botulinicheskikh toksinov i Clostridium botulinum» [Interstate Standard (GOST 10444.7-86) "Methods for the detection of botulinum toxins and Clostridium botulinum"] – M., 2002. – 28 p.

3. Nikiforov, V.N. Botulizm [Botulism] / V.N.Nikiforov, V.V.Nikiforov // – M.: Medicine, 1985. – 198 p.

4. Ivanova, M.A. Botulizm: ucheb.-metod. posobiye [Botulism: the teaching method. allowance] / MA Ivanova // – Minsk: BSMU, 2009. – 24 p.

5. Lindstrom, M. Multiplex PCR Assay for Detection and Identification of Clostridium botulinum Types A, B, E and F in food and fecal material / M.Lindstrom, R.Keto, A.Markkula, S.Hiell, H.Korkeala // Applied and Environmental Microbiology. – Dec 2001. – P. 5694–5699.

6. Kislenco, V.N. Veterinarnaya mikrobiologiya i immunologiya [Veterinary microbiology and immunology] / V.N.Kislenco, N.M.Kolichyev, R.G.Gosmanov // GEOTAR-Media, 2012. – 746 p.

ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ БИОАКТИВНОГО СЛОЯ ИМПЛАНТАТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА ЕГО НАНЕСЕНИЯ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO)

Н.А. Кононович – кандидат ветеринарных наук, вед. н.с.; **А.В. Попков** – доктор медицинских наук, профессор, гл. н.с.; **Е.Н. Горбач** – кандидат биологических наук, вед. н.с.; **М.В. Стогов** – доктор биологических наук, вед. н.с.; **Д.А. Попков** – доктор медицинских наук, профессор РАН, руководитель клиники Нейроортопедии.

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган (640014, Курган, М. Ульяновой, 6, тел.: (352) 241-52-73; e-mail: office@rncvto.ru).

Для обеспечения лучшей остеоинтеграции, а соответственно прочности фиксации имплантата с костью, его поверхность должна обладать остеоиндуктивными свойствами. Лучшее сходство с химическим составом костной ткани имеют кальций-фосфатные соединения. Существуют разные способы нанесения таких соединений на металлические имплантаты. В экспериментах *in vitro* изучали особенности кинетики высвобождения кальция и фосфата из биоактивного слоя, нанесенного на металлическую титансодержащую подложку. Образцы инкубировали в течение 28 сут в растворе электролита. В группе 1 слой наносили методом микродугового оксидирования (МДО), в группе 2 – высокочастотного магнетронного распыления (ВЧМР). В конце эксперимента визуально и методом сканирующей электронной микроскопии изучали состояние кальций-фосфатного слоя. Более высокую адгезионную прочность биоактивного слоя к металлической подложке определили у КФМДО. В группе 1 содержание Са было уменьшено в 3,1 раза; Р – в 1,13 раза. В группе 2 снижение Са было в 6,54 раза; Р – в 2,38 раза. Результаты исследования показали, что механизмы остеоиндуктивного действия кальций-фосфатного напыления могут быть связаны с диффузией Са с поверхности имплантатов в окружающие ткани. Степень активности данных процессов может зависеть от способа нанесения биоактивного покрытия. При использовании ВЧМР обеспечивается более кратковременное стимулирующее действие в сравнении с методом МДО. Эти данные необходимо учитывать при лечении повреждений и других патологических состояний костей, с использованием изделий покрытых биоактивным кальций-фосфатным напылением.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эксперимент, кость, имплантат, биоактивное покрытие, диффузия, кальций, фосфор.

В настоящее время, как в клинической медицине, так и в ветеринарии ведется активный поиск безопасных и эффективных материалов и технологий для лечения повреждений и заболеваний скелета, в том числе обширных костных дефектов [4, 7, 11, 12]. Достаточно перспективными в этом плане являются персонализированные биоактивные имплантаты с развитой поверхностью [1, 9]. К числу последних можно отнести изделия, изготовленные из инертных металлов покрытых биоактивным слоем. Выраженными остеоиндуктивными свойствами обладают кальций-фосфатные соединения, имеющие более близкое по химическому составу сходство с костной тканью. В зависимости от технологии их нанесения на металлические подложки, возможно получить биоактивный слой различной толщины и пористости [5, 6, 10, 14]. Скорость деградации кальция и фосфата с поверхности таких имплантатов может определять степень и продолжительность процессов остеогенной активности, что представляет интерес с прикладной и фундаментальной точки зрения. Выявление подобного рода механизмов возможно при проведении комплекса экспериментальных исследований как *in vitro*, так и *in vivo*.

Цель исследования: морфологическими методами изучить особенности кинетики высвобождения кальция и фосфата с поверхности имплантатов, в зависимости от способа нанесения биоактивного слоя.

Материалы и методы. Выполнены две группы экспериментов *in vitro*. В группе 1 титированию были подвергнуты стержни из титанового сплава Ti6Al4V с гидроксипатитным слоем, нанесенным методом микродугового оксидирования (МДО; n=10). В группе 2 биоактивное напыление наносили методом высокочастотного магнетронного распыления (КФВЧМР; n=10). Тестируемые образцы были изготовлены на базе ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет».

Каждый исследуемый образец помещали в отдельную измерительную ячейку, заполненную изотоническим 0,9%-ным раствором хлорида натрия. Объем электролита составлял 1 мл на 1 см² поверхности стержня. Далее выполняли инкубирование при температуре 37°C в течение 28 суток. После окончания инкубации осуществляли оценку поверхности каждого образца визуально макроскопически, а также методами сканирующей электронной микроскопии и рентгеновского электронно-зондового микро-

анализа (определяли содержание кальция и фосфора; (W) в вес.%) с помощью СЭМ «PhenomProX» на базе ООО «Мелитэк», г. Москва.

За контроль принимали результаты, полученные с этих же образцов перед началом экспериментов.

Полученные количественные данные подвергали статистической обработке с использованием программы Atte Stat 13.1 (Россия). Для каждого анализируемого параметра определяли средние значения (M) и стандартное отклонение (SD). Достоверность различий оценивали с помощью W-критерия Вилкоксона. Различия показателей считали достоверными при $p \leq 0,05$. Исследования выполнены с учетом рекомендаций ГОСТ ISO 10993-15-2011 «Межгосударственный стандарт. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 15. Идентификация и количественное определение продуктов деградации изделий из металлов и сплавов».

Результаты исследований. Выполненные исследования показали, что при использовании метода МДО для нанесения биоактивного покрытия на металлическую основу была сформирована матовая шероховатая пористая поверхность (рис. 1а, 2а). Методом рентгеновского электро-зондового микроанализа определили, что содержание кальция и фосфора на поверхности имплантатов составляло $6,94 \pm 0,47$ и $16,3 \pm 0,4$ вес.% соответственно, а соотношение Ca/P – $0,42 \pm 0,02$.

После инкубации тестовых образцов группы 1 в растворе электролита в течение 28 сут при макроскопической оценке видимых различий их поверхности в сравнении с контролем не обнаружили (рис. 1b). Микроскопически целостность биоактивного слоя была сохранена, трещин и повреждений другого характера не выявляли (рис. 3а). При этом в сравнении с контрольными значениями регистрировали достоверное уменьшение содержания Ca в 3,1 раза ($p=0,0003$), P – в 1,13 раза ($p=0,007$). Соответственно отношение Ca/P также было снижено в 2,8 раза ($p=0,0003$).

При визуальной оценке и СЭМ образцов группы 2 (КФВЧМР) перед началом инкубации биоактивный слой имел глянцевую гладкую структуру без наличия пор (рис. 1с, 2b). Содержание Ca составляло $10,47 \pm 0,3$ вес.%, P – $3,85 \pm 0,17$ вес.%, соотношение Ca/P было 2,72.

В этой группе опытов после окончания инкубации у всех образцов как визуально макроскопически, так и методом СЭМ определяли нарушение целостности кальций-фосфатного слоя. Поверхность имплантатов состояла из мозаично расположенных участков биоактивного покрытия. Остальную площадь занимали участки, на которых покрытие отсутствовало, либо происходило его слущивание (рис. 1d, 3b). В сравнении с исходными значениями содержание Ca уменьшалось в 6,54 раза ($p=0,0001$), P – в 2,38 раза ($p=0,0001$), а соотношение Ca/P было понижено в 1,98 раза.



Рис. 1. Внешний вид тестируемых образцов: а – КФМДО перед началом эксперимента, б – КФМДО через 28 сут после инкубации в растворе электролита, с – КФВЧМР перед началом эксперимента, d - КФВЧМР через 28 сут после инкубации в растворе электролита.

Выполненное исследование было посвящено изучению *in vitro* характеристики поверхности металлических имплантатов с кальций-фосфатным покрытием, нанесенным двумя разными технологиями, после инкубации в растворе электролита в течение 28 суток.

При выборе сроков эксперимента руководствовались результатами, полученными ранее, когда *in vivo* была показана зависимость биологического ответа

тканей от способа нанесения биоактивного слоя. Было определено, что через 4 недели вокруг внутрикостно расположенного имплантата с покрытием КФМДО образуется костная муфта плотного трабекулярного строения. При тестировании КФВЧМР к этому же сроку формировался рыхлый соединительнотканый футляр с более редкой трабекулярной сетью грубоволокнистой костной ткани. Полученные результаты напрямую

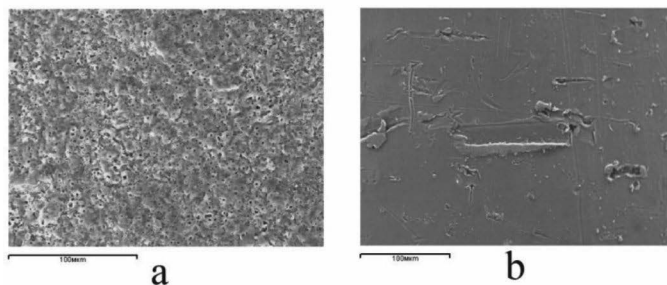


Рис. 2. Увеличенная поверхность тестируемых образцов перед началом эксперимента, СЭМ. Увеличение 400х.: а - КФМДО, б- КФВЧМР.

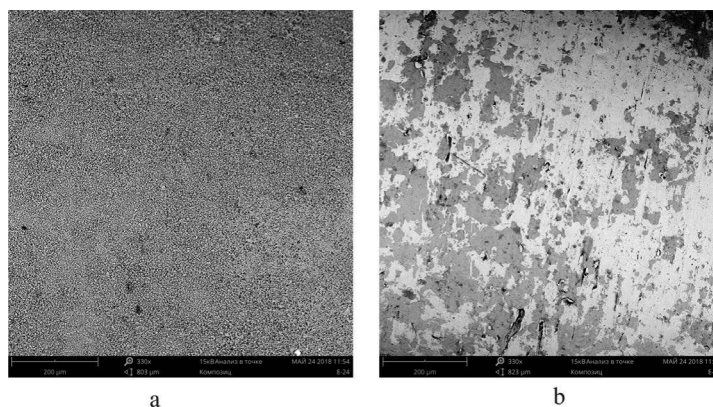


Рис. 3. Увеличенная поверхность тестируемых образцов через 28 сут после инкубации в растворе электролита, СЭМ. Увеличение 330х.: а - КФМДО, б- КФВЧМР.

зависили от архитектуры поверхности тестируемых образцов. В том и другом случаях определяли усиление остеогенной активности в сравнении с имплантатами без биоактивного слоя [3]. В работах ряда авторов также отмечается, что кальций-фосфатные покрытия с определенными характеристиками шероховатости поверхности индуцировали образование гидроксиапатита [15, 16]. По всей видимости, одним из важных факторов активизации остеогенеза являлось усиление кровообращения в окружающих тканях как следствие умеренного повышения тонуса артерий. Было выдвинуто предположение, что подобного рода эффект может быть связан с повышенной концентрацией ионов Са, которые освобождались с поверхности имплантов и тем самым оказывали воздействие на сосудистую стенку [2, 8, 13]. Однако в данных экспериментах не определяли концентрацию остеотропных элементов на поверхности используемых имплантов перед началом и остаточное их количество по окончании опыта. Это регламентировало необходимость проведения соответствующих исследований в условиях *in vitro*.

Результаты выполненных испытаний показали, что после инкубации в 0,9%-ном растворе хлорида натрия в течение 28 сут более низкую адгезионную прочность к титансодержащей основе отмечали у образцов с по-

крытием КФВЧМР. По окончании опыта на их поверхности как при визуальной макроскопической оценке, так и методом СЭМ выявляли участки повреждения кальций-фосфатного слоя различного характера.

В созданных условиях при тестировании образцов с покрытием, нанесенным методом МДО, по окончании эксперимента целостность и архитектура биоактивного слоя была сохранена, что свидетельствовало о его высокой адгезионной прочности к металлической подложке.

В обеих группах регистрировали снижение концентрации остеотропных элементов на поверхности образцов (значительнее ионов кальция, чем фосфора), что косвенно свидетельствует о их диффузии в раствор электролита. При этом в группе с напылением МДО изменение содержания этих элементов было выражено в несколько меньшей степени. Соответственно при данном способе нанесения кальций-фосфатного слоя можно рассчитывать на более длительный (продолгованный) остеостимулирующий эффект, который необходим в случаях предполагаемого лечения в течение не менее 1,5-2 месяцев. К таким заболеваниям можно отнести на пример переломы костей, сопровождающиеся значительным повреждением остеогенных тканей (со смещением по ширине и дли-

не, осколчатые, фрагментарные), обширные костные дефекты различной этиологии и другие состояния. Покрытие КФВЧМР обладает кратковременным стимулирующим действием, соответственно изделия с данным напылением целесообразнее использовать при переломах костей без смещения костных отломков в большей степени у пациентов молодого возраста.

Заключение. Результаты выполненных исследований и известные литературные данные свидетельствуют о том, что при использовании кальций-фосфатных покрытий на металлической основе индукция остеогенеза происходит в результате диффузии, в частности ионов Са с поверхности имплантатов в окружающие ткани. Адгезионная прочность таких биоак-

тивных покрытий к подложке может влиять на степень активности и продолжительность стимуляции костеобразования в области имплантации. Полученные результаты необходимо учитывать как в клинической медицине, так и в ветеринарной практике при лечении повреждений и других патологических состояний костей, с использованием изделий покрытых биоактивным кальций-фосфатным напылением.

Работа выполнена в соответствии с планом научных исследований, в рамках программы НИР Государственного задания на 2018-2020 гг: «Разработка и экспериментальное обоснование биоактивного кастомизированного остеосинтеза».

Литература

1. Баева, Л.С. Современные технологии аддитивного изготовления объектов / Л.С.Баева, А.А.Маринин // Вестник МГТУ. – 2014. – Т. 17. (1). – С. 7–12.
2. Власов, Т.Д. Механизмы гуморальной регуляции сосудистого тонуса / Т.Д.Власов // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2002. – № 4. – С. 68–73.
3. Возможность остеогенной активности интрамедуллярных имплантатов в зависимости от технологии нанесения кальций-фосфатного покрытия (экспериментальное исследование) / А.В.Попков [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2015. – №5. – С. 142–145.
4. Замещение обширных диафизарных дефектов длинных костей / А.П.Барабаш, Л.А.Кесов, Ю.А.Барабаш, С.П.Шпиняк // Травматология и ортопедия России. – 2014. – № 2 (72). – С. 93–99.
5. Кальций фосфатные покрытия, созданные методом вч-магнетронного распыления гидроксиапатита: остеогенный потенциал invitro и invivo / М.А.Сурменова, Р.А.Сурменев, И.А.Хлусов [и др.] // Известия Том.политех. ун-та. – 2010. – Том 317(2). – С. 101–106.
6. Нанопористая структура покрытий, сформированных газотермическим напылением электрокорунда и последующим микродуговым оксидированием на имплантатах из титанового сплава ВТ6 / В.А.Кашуро, М.А.Фомина, И.В.Родионов, А.А.Фомин // Медицинская техника. – 2016. – № 1. – С. 38–41.
7. Полянский, Р.К. Оценка эффективности использования межпозвоноковых имплантатов из углеситалла у собак в шейном отделе позвоночного столба / Р.К.Полянский, Н.А.Козлов // Рос.ветеринар. журнал. Мелкие домашние и дикие животные. – 2013. – № 4. – С. 11–13.
8. Реакция тканей при использовании имплантатов с биоактивным покрытием / Н.А.Кононович, А.В.Попков, А.Л.Шастов, Д.А.Попков. // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. – 2017. – Том 103(12). – С. 1361–1369.
9. Тестирование аддитивных материалов на культурах клеток фибробластов человека / Г.П.Котельников, А.В.Колсанов, А.Н.Николаенко [и др.] // Клини.и эксперимент. хирургия. Журн. им. акад. Б.В.Петровского. – 2018. – Т. 6(№ 2). – С. 67–73.
10. Функциональные покрытия для имплантационных материалов / С.В.Гнеденков, Ю.П.Шаркеев, С.Л.Синебрюхов [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – №1. – С. 12–19.
11. Экспериментальное исследование эффективности применения имплантатов с покрытиями на основе сверхтвердых соединений / Ж.К.Манирамбона, Ф.В.Шакирова, И.Ф.Ахтямов, Э.Б.Гатина // Ученые записки казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – Т. 215. – С. 218–221.
12. Экспериментальное применения биокомпозитных материалов в ветеринарной травматологии / Ю.В.Пичугин, А.В.Сапожников, В.А.Ермолаев, С.Н.Золотухин // Вестн. Ульянов. гос. с.-х. академии. – 2011. – № 3. – С. 78–80.
13. Enhanced osteogenesis and angiogenesis by mesoporous hydroxyapatite microspheres-derived simvastatin sustained release system for superior bone regeneration / Yu Wei-Lin [et al] // Sci Rep. – 2017. – Vol. 7 – P. 44129.
14. Hu, C.J. Preparation of hydroxyapatite-containing coatings on pure titanium by linearly increasing the voltage in the pulsed bipolar microarc oxidation process / C.J.Hu, J.R.Lu // Int J Electrochem Sci. – 2015. – № 10. – P. 749–758.
15. Ryu, H.S. Biomimetic apatite induction of P-containing titania formed by microarc oxidation before and after hydrothermal treatment / H.S.Ryu, W.H.Song, S.H.Hong // Surface and Coating Tehnology. – 2008. – Vol. 202. – P.1853–1858.
16. Biomimetic apatite deposited on microarcanatase-based ceramic coatings / D.Wei [et al.] // Ceramic International. – 2008. – Vol. 34. – P. 1139–1144.

PATTERN OF CHANGING IMPLANT BIOACTIVE LAYER DEPENDING ON THE TECHNIQUE OF ITS APPLYING (AN EXPERIMENTAL STUDY IN VITRO)

Kononovich N.A. – Candidate of Veterinary Sciences; Popkov A.V. – Doctor of Medical Sciences, professor; Gorbach E.N. – Candidate of Biological Sciences; Stogov M.V. – Doctor of Biological Sciences; Popkov D.A. – Doctor of Medical Sciences, professor of the Russian Academy of Sciences.

FSBI Russian Ilizarov Center “Restorative Traumatology and Orthopaedics” of the RF Ministry of Health, Kurgan (e-mail: office@mcvto.ru).

The implant surface should have osteoinductive properties in order to provide the best osteointegration and, accordingly, the strength of implant-bone fixation. Calcium-phosphate compounds resemble bone tissue chemical composition best of all. There are various techniques of applying such compounds to implants. The specific characteristics of the kinetics of calcium and phosphate releasing from the bioactive layer applied to a metallic titanium-containing substrate were studied in experiments in vitro. Samples were incubated in electrolyte solution for 28 days. In Group 1 the layer was applied by microarc oxidizing method (MAO), in Group 2 – by the method of high-frequency magnetron spraying (HFMS). At the end of the experiment the calcium-phosphate layer condition was studied visually and by scanning electron microscopy technique. The higher adhesion strength of the bioactive layer to the metal substrate was determined in MAO. In Group 1 the Ca content was 3.1-fold reduced; P content – 1.13-fold reduced. In Group 2 the Ca was 6.54-fold decreased; P – 2.38-fold decreased. The study results had demonstrated that the mechanisms of osteoinductive action of the calcium-phosphate spraying might be related to the Ca diffusion from the implant surface into surrounding tissues. The degree of activity of these processes may depend on the technique of bioactive coating applying. In case of HFMS using the stimulating action is more short-term comparing with MAO method. These data should be taken into consideration when treating injuries and other pathological conditions of bones with using products coated with bioactive calcium-phosphate spraying.

KEYWORDS: experiment, bone, implant, bioactive coating, diffusion, calcium, phosphorus.

References

1. Baeva, L.S. Sovremennye tekhnologii additivnogo izgotovleniya obyektov [Modern technologies of additive manufacturing of objects] / L.S. Baeva, A.A. Marinin // Vestnik MGTU. – 2014. – Vol. 17(1). – P. 7–12.
2. Vlasov, T.D. Mexanizmy gumoralnoy regulyatsii sosudistogo tonusa [Mechanisms of humoral regulation of vascular tone] / T.D. Vlasov // Regionarnoe krovoobraschenie i mikrotsirkulyatsiya. – 2002. – Vol. 4. – P. 68–73.
3. Vozmozhnosti osteogennoy aktivnosti intramedullyarnykh implantatov v zavisimosti ot tekhnologii naneseniya kalcij-fosfatnogo pokrytiya (eksperimentalnoe issledovanie) [Features of osteogenic activity of intramedullary implants depending on technique of applying calcium-phosphate coating (experimental study)] / A.V. Popkov [et al.] // Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. – 2015. – № 5. – P. 142–145.
4. Zameshenie obshirnykh diafizarnykh defektov dlinnykh kostey [Building of extensive diaphysis defects in long bones] / A.P. Barabash, L.A. Kesov, Yu.A. Barabash, S.P. Shpinyak // Travmatologiya i ortopediya Rossii. – 2014. – Vol. 2 (72). – P. 93–99.
5. Kalcijfosfatnye pokrytiya, sozdannye metodom vch-magnetronnogo raspyleniya gidroksiapatita: osteogennyy potentsial in vitro i in vivo [Calcium phosphate coatings created by the HF magnetron sputtering method of hydroxyapatite: osteogenic potential] / M.A. Surmeneva, R.A. Surmenev, I.A. Xlусov [et al.] // Izvestiya Tomskogo politekhnicheskogo universiteta. – 2010. – Vol. 317(2). – P. 101–106.
6. Nanoporstaya struktura pokrytiy, sformirovannykh gazotermicheskim napyleniem elektrokorunda i posleduyuschim mikrodogovym oksidirovaniem na implantatakh iz titanovogo splava VT6 [Nanoporous Structure of Coatings Formed by Thermal Spraying of Aluminum Oxide with Further Microarc Oxidation on Titanium Alloy VT6 Implants] / V.A. Kashuro, M.A. Fomina, I.V. Rodionov, A.A. Fomin // Medicinskaya tekhnika. – 2016. – Vol. 1. – P. 38–41.
7. Polyanskiy R.K. Ocenka effektivnosti ispolzovaniya mezhpozvonkovykh implantatov iz uglesitalla u sobak v sheynom otdete pozvonochnogo stolba [Evaluation of the Effectiveness of the Intervertebral Uglesitall Implants Usage in the Cervical Spine in Dogs] / R.K. Polyanskiy, N.A. Kozlov // Ros. veterinar. zhurnal. Melkie domashnie i dikiye zhivotny'e. – 2013. – Vol. 4. – P. 11–13.
8. Reakciya tkaney pri ispolzovanii implantatov s bioaktivnym pokrytiem [Tissue response when using implants with bioactive coating] / Kononovich N.A., Popkov A.V., Shastov A.L., Popkov D.A. // Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova. – 2017. – Vol. 103(12). – P. 1361–1369.
9. Testirovanie additivnykh materialov na kulturakh kletok fibroblastov cheloveka [Testing of additive materials in human fibroblast cell cultures] / G.P. Kotelnikov, A.V. Kolsanov, A.N. Nikolaenko [et al.] // Klinicheskaya. i eksperimentalnaya. khirurgiya. Zhurnal. imeni akad. B.V. Petrovskogo. – 2018. – Vol. 6 (№ 2). – P. 67–73.

10. Funkcionalnye pokrytiya dlya implantacionnykh materialov [Functional coatings for implants] / S.V.Gnedenkov, Yu.P.Sharkeev, S.L.Sinebryukhov [et al.] // Tikhookeanskiy medicinskiy zhurnal. – 2012. – Vol.1. – P. 12–19.
11. Eksperimentalnoe issledovanie effektivnosti primeneniya implantatov s pokrytiyami na osnove sverkhkhtverdykh soedineniy [Experimental study of the effectiveness of the use of implant coatings based on superhard compounds] / Zh.K.Manirambona, F.V.Shakirova, I.F.Axtyamov, E .B.Gatina // Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy mediciny im. N.E.Baumana. – 2013. – Vol. 215. – P. 218–221.
12. Eksperimentalnoe primeneniye biokompozitnykh materialov v veterinarnoy travmatologii [Studying the possibility of applying biocomposite materials in veterinary traumatology] / Yu.V.Pichugin, A.V.Sapozhnikov, V.A.Ermolaev, S.N.Zolotuxin // Vestnik Ulyanovskoy gosudarstvennoy selskokhozyaystvennoy akademii. – 2011. – Vol. 3. – P. 78–80.
13. Enhanced osteogenesis and angiogenesis by mesoporous hydroxyapatite microspheres-derived simvastatin sustained release system for superior bone regeneration / Yu Wei-Lin [et al] // Sci Rep. – 2017. – Vol. 7 – P. 44129.
14. Hu, C.J. Preparation of hydroxyapatite-containing coatings on pure titanium by linearly increasing the voltage in the pulsed bipolar microarc oxidation process / C.J. Hu., JR. Lu // Int J Electrochem Sci. – 2015. – №10. – P. 749–758.
15. Ryu, H.S. Biomimetic apatite induction of P-containing titania formed by microarc oxidation before and after hydrothermal treatment / H.S.Ryu., W.H.Song, S.H.Hong // Surface and Coating Tehnology. – 2008. – Vol. 202. – P.1853–1858.
16. Biomimetic apatite deposited on microarc anatase-based ceramic coatings / D.Weil [et al.] // Ceramic International. – 2008. – Vol. 34. – P. 1139–1144.

ЖИВАЯ МАССА И СОСТАВ КРОВИ ТЕЛЯТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФОРМЫ И ДОЗЫ ПРИМЕНЕНИЯ КОРМОВЫХ ДОБАВОК НА ОСНОВЕ САПРОПЕЛЯ

¹А.М.Ежкова – доктор биологических наук, доцент, зав. отделом;

¹И.А.Яппаров – доктор биологических наук, директор; ¹В.О.Ежков – доктор ветеринарных наук, доцент, зав. отделом; ¹А.Х.Яппаров – доктор сельскохозяйственных наук, профессор;

²Р.Н.Файзрахманов – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, декан.

¹Татарский научно-исследовательский институт агрохимии и почвоведения – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», г.Казань (420059, г.Казань, Оренбургский тракт, 20 а; тел. +7 (843) 277-82-74, e-mail: niixrp2@mail.ru; egkova-am@mail.ru).

²ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана», г.Казань (420029, г. Казань, Сибирский тракт, 35; тел. +7 (843) 273-97-85, e-mail: kgavm_baumana@mail.ru).

Представлены результаты исследований по изучению эффективности разных доз наноструктурного сапропеля в виде кормовой добавки нового поколения для повышения продуктивности и улучшения гематологических показателей молодняка крупного рогатого скота. Объектами исследований стали телята холмогорской породы татарстанского типа в возрасте одного месяца, производственные испытания проводили в Атнинском районе Республики Татарстан. Телятам применяли наноструктурный сапропель в дозах 3,0; 1,8; 0,6% и кормовой сапропель в оптимальной дозе 3,0% к сухому веществу рациона. Кормовые добавки вводили в течение 60 суток. Экспериментально установлено, что применение кормового сапропеля увеличило живую массу телят на 3,3 кг, наноструктурного сапропеля – на 6,0; 7,7 и 7,1 кг, в сравнении с контрольными животными. Использование сапропелей способствовало повышению в крови телят количества эритроцитов, содержания гемоглобина, общего кальция, неорганического фосфора, общего белка и показателя резервной щелочности, которые не выходили за пределы физиологической нормы. Наноструктурный сапропель оказывал большую эффективность действия в организме животных в сравнении с кормовым сапропелем. При применении наноструктурного сапропеля в дозе 1,8% достигнуты лучшие результаты по живой массе и оптимизации показателей крови. Длительное введение в рацион телят наноструктурного сапропеля в дозе 3,0%, показало высокую эффективность среднесуточных приростов в первой половине эксперимента, далее излишнее поступление питательных веществ обусловило снижение живой массы. Применение наноструктурного сапропеля в дозе 0,6% улучшало продуктивность и показатели крови, однако не достигало потенциала возможностей большей дозы. Кормовые добавки сапропеля могут быть рекомендованы для восполнения белкового и минерального питания животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: телята, кормовая добавка, наноструктурный сапропель, среднесуточный прирост, морфологические и биохимические показатели крови.

Сапропели – это современные органо-минеральные отложения пресноводных водоемов лесной зоны, начало формирования которых относится к послеледниковому периоду и активно продолжается в настоящее время [6, 11, 12]. Органическая часть сапропеля представлена продуктами распада живущих в воде растительных и животных организмов. Минеральная часть представлена глинистыми, песчаными частицами, карбонатами, кремнеземом, оксидами железа, фосфатами [1, 14].

Сапропель является источником биологически активных веществ, ферментов, витаминов, гормонов, антибиотиков, низкомолекулярных протеинов и других соединений. Применение сапропеля в качестве кормовых добавок животным способствует повышению переваримости питательных веществ корма, стимулирует процессы кроветворения и кровообращения, улучшает метаболизм с преобладанием процессов ассимиляции

и синтеза веществ, ускоряет рост и развитие молодняка, повышает прирост живой массы [2, 8, 10, 13].

Ультразвуковое воздействие на сапропель способствует разрушению в нем живых организмов, обеспечивает большую доступность питательных компонентов, что повышает эффективность действия и ценность сапропеля как кормовой добавки. Подобные исследования представлены в работах [3, 4].

Молодняк крупного рогатого скота является основой будущего продуктивного стада. Поэтому для физиологического роста и реализации генетического потенциала по продуктивности необходимо удовлетворение потребностей молодняка в полноценном питании. В связи с чем на основе природного материала разработан наноструктурный сапропель [4], обладающий комплексным ионообменным и каталитическим действием в организме, позволяющим повысить белковое и минеральное питание животных.

Цель исследования – изучить влияние наноструктурного сапропеля в разных дозах на прирост живой массы и гематологические показатели телят в производственном опыте.

Материалы и методы. Исследования выполняли на молодняке крупного рогатого скота (телята) в возрасте 1-3 месяцев в СХПК «Ташчишма» Атнинского района Республики Татарстан. Подбор подопытных телят по 9 животных в группы осуществляли по принципу аналогов по возрасту и живой массе. Телята I группы были контрольными и содержались на основном рационе (ОР) хозяйства. Молодняк II опытной группы получал к ОР кормовой сапропель в оптимальной дозе 3,0% к сухому веществу рациона [9], телята III, IV и V опытных групп получали наноструктурный сапропель в количестве 3,0; 1,8 и 0,6% к рациону. Продолжительность введения сапропелевых добавок составила 60 суток. Использовали сапропель месторождения озеро Белое Тукаевского района Республики Татарстан (РТ). Наноструктурный сапропель с размерами частиц 45,0-180,0 нм изготавливали методом ультразвукового диспергирования в УЗВ 28/200 МП РЭЛТЕК (Россия) при частоте 15,0 кГц ($\pm 20\%$), выходная мощность 100,0 Вт.

В производственном опыте учитывали изменение живой массы и гематологических показателей [7]. Содержание гемоглобина, количество эритроцитов и лейкоцитов в крови определяли на гемонализаторе Hema-Screen фирмы Hospitex diagnostic (Италия). Биохимические исследования сыворотки крови выполняли с применением анализатора Olympus AU 400 фирмы Siemens Medical Solutions Diagnostics (США).

Статистическую обработку полученных данных проводили на персональном компьютере OPTIMUM в операционной системе Windows-2007 по пакету программ Microsoft Office-2007 с вычислением ошибки средней и достоверности по Стьюденту.

Результаты исследований. Применение в рационах сельскохозяйственных животных кормовых добавок на основе природных и активированных агроминералов обусловлено их натуральным происхождением, экологичностью, низкой себестоимостью и эффективностью действия в организме. Показатели прироста живой массы телят при введении в рацион телят сапропелевых добавок представлены в таблице 1.

Таблица 1

Динамика живой массы телят при использовании в рационах разных доз наноструктурного сапропеля

| Показатель | Группа (n=9) | | | | |
|---------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | I | II | III | IV | V |
| Масса в 30 сут, кг | 55,7 \pm 3,2 | 55,1 \pm 2,4 | 56,2 \pm 2,6 | 55,8 \pm 3,1 | 56,4 \pm 3,5 |
| Среднесуточный прирост, г | 760,0 \pm 21,4 | 813,3 \pm 20,3 | 896,6 \pm 18,6 | 895,9 \pm 20,1 | 870,0 \pm 24,3 |
| Масса в 60 сут, кг | 78,5 \pm 1,8 | 79,5 \pm 2,4 | 83,1 \pm 2,6* | 82,7 \pm 3,1 | 82,5 \pm 3,5 |
| Среднесуточный прирост, г | 778,0 \pm 24,3 | 853,3 \pm 20,2 | 823,4 \pm 23,7 | 893,4 \pm 21,2 | 880,0 \pm 20,1 |
| Масса в 90 сут, кг | 101,8 \pm 4,3 | 105,1 \pm 4,2 | 107,8 \pm 3,8 | 109,5 \pm 2,8* | 108,9 \pm 2,6* |
| Абсолютный прирост, кг | 46,1 \pm 1,2 | 50,0 \pm 2,4 | 51,6 \pm 1,8 | 53,7 \pm 2,0 | 52,5 \pm 2,4 |
| % к контролю | 100,0 | 103,2 | 105,9 | 107,6 | 107,0 |

При анализе данных таблицы установлено, что у животных, получавших кормовой сапропель, живая масса к концу опыта увеличилась на 3,2% и была на 3,3 кг больше контрольных аналогов. У телят, получавших наноструктурный сапропель в дозах 3,0; 1,8 и 0,6% к сухому веществу рациона, живая масса была выше на 5,9; 7,6 ($P < 0,05$) и 7,0% ($P < 0,05$) чем у контрольных, что было больше на 6,0; 7,7 и 7,1 кг на одно животное.

У телят, получавших 3,0% наноструктурного сапропеля, живая масса имела тенденцию к увеличению в первый месяц опыта, затем интенсивность прироста снижалась. К концу научно-производственного опыта живая масса телят этой группы была ниже аналогов, получавших наноструктурный сапропель в дозах 1,8 и 0,6%, но оставалась выше, чем у контрольных те-

лят и получавших кормовой сапропель. Сравнительно меньшие показатели живой массы у телят, получавших 3,0% наноструктурного сапропеля, обоснованы излишним поступлением питательных веществ, затратой энергии на утилизацию избытков и проявлением сорбционных свойств наноструктурного сапропеля в организме животных.

Наибольшая живая масса телят к концу опытного периода достигнута при использовании наноструктурного сапропеля в дозе 1,8% к рациону. Телята этой группы характеризовались равномерным повышением среднесуточного прироста. Полученные результаты дают основание утверждать, что наноструктурный сапропель в этой дозе является наиболее оптимальным для физиологически достаточного

поступления питательных веществ в организм телят в период интенсивного роста и развития.

Несколько ниже была живая масса телят, получавших наноструктурный сапропель в дозе 0,6%. Показатели характеризуют недостигнутую возможность в потенциале увеличения прироста живой массы в сравнении с телятами, получавшими наноструктурную добавку в дозе 1,8%. I

Состав крови, как внутренней среды для всех

органов и тканей, наиболее полно отражает разнообразные физиологических и биохимических процессов, происходящих в организме, по которым можно судить о степени интенсивности обмена веществ и уровне продуктивности [5].

Длительное введение органоминеральной кормовой добавки в кормление телят обусловило изменение морфологических и биохимических показателей крови. Результаты исследований приведены в таблице 2.

Таблица 2

Морфологические показатели крови телят при использовании в рационах разных доз наноструктурного сапропеля

| Показатель | Группа (n=9) | | | | |
|---------------------------------|--------------|------------|------------|------------|-----------|
| | I | II | III | IV | V |
| возраст 30 сут | | | | | |
| Гемоглобин, г/л | 98,4±2,1 | 98,2±2,0 | 99,1±3,2 | 98,8±1,1 | 98,6±1,4 |
| Эритроциты, 10 ¹² /л | 5,9±0,1 | 5,8±0,3 | 6,0±0,1 | 5,9±0,2 | 5,9±0,2 |
| Лейкоциты, 10 ⁹ /л | 8,1±0,3 | 7,9±0,4 | 8,0±0,2 | 8,2±0,2 | 8,0±0,4 |
| возраст 60 сут | | | | | |
| Гемоглобин, г/л | 100,4±1,4 | 104,2±1,6 | 106,4±2,0* | 106,1±1,6* | 104,7±3,6 |
| Эритроциты, 10 ¹² /л | 6,2±0,1 | 6,4±0,2 | 6,6±0,4 | 6,5±0,2 | 6,5±0,3 |
| Лейкоциты, 10 ⁹ /л | 7,8±0,2 | 8,0±0,4 | 7,9±0,5 | 7,9±0,4 | 7,8±0,2 |
| возраст 90 сут | | | | | |
| Гемоглобин, г/л | 101,5±2,1 | 106,2±2,0* | 107,9±4,4 | 109,4±2,8* | 107,2±3,8 |
| Эритроциты, 10 ¹² /л | 6,3±0,2 | 6,5±0,3 | 6,7±0,2 | 6,8±0,2 | 6,6±0,4 |
| Лейкоциты, 10 ⁹ /л | 8,0±0,2 | 8,2±0,1 | 8,0±0,4 | 7,9±0,3 | 7,9±0,2 |

При анализе показателей крови телят установлено, что содержание гемоглобина было ниже средних значений физиологической нормы. На 30-е сут применения наноструктурного сапропеля (3,0; 1,8 и 0,6%) отмечали увеличение содержания гемоглобина на 6,8 (P<0,05); 5,6 (P<0,05) и 4,3%, с лучшими показателями у телят, получавших добавку в дозе 3,0% к сухому веществу рациона. К концу опыта сравнительно лучшие результаты отмечали у телят, получавших 1,8% кормовой добавки, где увеличение было на 7,8% (P<0,05). Кормовой сапропель, введенный в рацион телят, обусловил увеличение гемоглобина на 4,6% (P<0,05), в сравнении с контрольными животными.

Подобная тенденция установлена при исследовании количества эритроцитов. На 30-е сутки опытного периода наибольшее повышение количества эритроцитов наблюдали в крови телят, получавших 3,0% наноструктурного сапропеля. В основе механизма подобного увеличения лежит алиментарное поступление большого количества биогенных легкодоступных для организма химических элементов и низкомолекулярных белков в составе наноструктурной добавки, и их активное использование для роста и развития организма. К концу опыта наилучшие результаты достиг-

нуты у телят, получавших наноструктурный сапропель в дозе 1,8%, где количество эритроцитов в крови увеличилось на 8,0% (P<0,05), в сравнении с контролем. У телят, получавших кормовой сапропель, количество эритроцитов увеличилось на 3,2%.

Количество лейкоцитов у телят при применении кормового и наноструктурного сапропелей существенно не изменялось и находилось в пределах физиологической нормы.

Результаты исследования биохимических показателей приведены в таблице 3.

Длительное применение органоминеральных кормовых добавок обусловило повышение содержания общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови. У телят, получавших наноструктурный сапропель в дозах 3,0; 1,8 и 0,6% содержание общего кальция повысилось на 7,7; 15,4 (P<0,05) и 11,5%, соответственно. У телят, получавших в рационе кормовой сапропель, увеличение составило 7,7% в сравнении с контрольными.

Значительное повышение неорганического фосфора на 17,6% (P<0,05) наблюдали в крови телят, получавших 1,8% наноструктурного сапропеля. При этом при применении добавок в дозах 3,0% и 0,6% к

Таблица 3

Биохимические показатели крови телят при использовании в рационах наноструктурного сапропеля

| Показатель | Группа (n=9) | | | | |
|---------------------------------------|--------------|----------|-----------|-----------|----------|
| | I | II | III | IV | V |
| возраст 30 сут | | | | | |
| Общий кальций, ммоль/л | 2,6±0,4 | 2,7±0,2 | 2,7±0,3 | 2,6±0,1 | 2,6±0,5 |
| Неорган. фосфор, ммоль/л | 1,7±0,1 | 1,7±0,2 | 1,8±0,1 | 1,6±0,3 | 1,7±0,2 |
| Резер. щелочность, об%CO ₂ | 50,2±1,2 | 51,0±1,4 | 52,0±1,0 | 50,4±1,1 | 49,0±1,3 |
| Общий белок, г/л | 80,2±2,4 | 79,8±3,1 | 80,4±1,0 | 80,0±1,4 | 80,0±1,8 |
| возраст 60 сут | | | | | |
| Общий кальций, ммоль/л | 2,7±0,3 | 2,8±0,2 | 3,0±0,2 | 2,9±0,2 | 2,8±0,3 |
| Неорган. фосфор, ммоль/л | 1,8±0,3 | 1,9±0,1 | 2,0±0,1 | 1,9±0,2 | 1,8±0,2 |
| Резер. щелочность, об%CO ₂ | 51,2±2,4 | 54,4±2,0 | 56,8±2,8 | 56,5±2,1* | 55,4±2,2 |
| Общий белок, г/л | 80,2±1,8 | 82,8±1,5 | 83,5±2,0 | 83,4±1,1 | 83,2±1,6 |
| возраст 90 сут | | | | | |
| Общий кальций, ммоль/л | 2,6±0,1 | 2,8±0,3 | 2,8±0,2 | 3,0±0,1* | 2,9±0,1 |
| Неорган. фосфор, ммоль/л | 1,7±0,1 | 1,8±0,3 | 1,9±0,3 | 2,0±0,2 | 1,9±0,2 |
| Резер. щелочность, об%CO ₂ | 51,6±3,8 | 55,1±4,8 | 57,4±2,6* | 58,8±4,8 | 57,9±4,2 |
| Общий белок, г/л | 80,4±1,6 | 83,0±2,8 | 83,7±2,0 | 84,0±1,6* | 83,5±3,1 |

рациону увеличение составило 11,8%, в сравнении контрольными. В крови телят, получавших кормовой сапропель содержание неорганического фосфора повысилось на 5,9%.

Необходимым условием для нормального обмена минеральных веществ в организме молодняка является резервная щелочность. Анализ полученных данных показывает, что этот показатель у телят был на уровне нижней границы физиологической нормы. Введение органоминерального сапропеля способствовало повышению резервной щелочности с наибольшим проявлением у телят, получавших компоненты в наноструктурной форме. Введение в состав рациона кормового сапропеля повысило резервную щелочность на 6,8%, наноструктурного сапропеля – на 14,0% 11,2 (P<0,05) и 12,2%, соответственно доз добавки – 0,3%, 1,8 и 0,6%.

Органических соединения сапропеля, в том числе и низкомолекулярные белки, обусловили увеличение концентрации общего белка в сыворотке крови телят. Наноструктурирование сапропеля повысило его усвояемость, на что указывает увеличение в крови телят общего белка на 1,4-4,5% (P<0,05). Применение кормового сапропеля обусловило повышение общего белка крови на 3,2% в сравнении с контрольными аналогами.

Литература

1. Агроминеральные ресурсы Татарстана и перспективы их использования / под ред. А.В.Якимова. – Казань: Фэн, 2002. – 272 с.
2. Адамович, К.Ф. Влияние комбикормов с сапропелем на показатели переваримости питательных веществ корма у супоросных свиноматок / К.Ф.Адамович // Зоотехническая наука Беларуси: сб. науч. тр. Т. 42. – Жодино, 2007. – С. 193–199.

Заключение. Наноструктурный сапропель в дозе 1,8% к сухому веществу рациона стал наиболее эффективной дозой, при которой достигнуто максимальное увеличение живой массы телят и улучшение качества крови по комплексу минеральных и белковых показателей. Увеличение наноструктурного сапропеля до 3,0% к рациону не способствовало дальнейшему повышению живой массы телят и улучшению гематологических показателей. Напротив, большое поступление легкодоступных биогенных соединений в составе наноструктурной добавки обусловило избыток питательных веществ в организме, что привело к снижению эффективности действия добавки. Введение в кормлении телят наноструктурного сапропеля в дозе 0,6% показало недостаточный потенциал по приросту живой массы и показателям крови, в сравнении с добавкой в дозе 1,8%. Применение в кормлении телят наноструктурного сапропеля в дозах 3,0; 1,8 и 0,6% к сухому веществу рациона было эффективнее в сравнении кормовым сапропелем.

Авторы выражают признательность д.х.н., профессору Е.С.Нефедьеву и к.х.н. И.Р.Низамееву за проведение аттестации исследованных сапропелей.

3. Банзузи, Б.А.С. Оценка эффективности РСК и ИФА при выявлении хламидийных антител в сыворотке крови крупного рогатого скота / Б.А.С.Банзузи, Р.Х.Рашилов, В.В.Герасимов // Ученые записки КГАВМ. – 2011. – Т. 206. – С. 19–22.
4. Наноструктурные минералы: получение, химический и минеральный составы, структура и физико-химические свойства / В.О.Ежков, А.Х.Яппаров, Е.С.Нефедьев [и др.] // Вестник Казанского технологического университета. – 2014. – Т. 17, № 11. – С. 41–45.
5. Закиров, Т.М. Изменение биохимических показателей сыворотки крови коров при добавлении в рацион активированного энергопротеинового концентрата «БиоГумМикс» / Т.М.Закиров // Ветеринарный врач. – 2016. – № 4. – С. 62–67.
6. Нетрадиционные виды нерудного минерального сырья [Текст] / сост. У.Г.Дистанов, Н.Н.Ведерников, А.С.Филько; под ред. У.Г.Дистанова, А.С.Филько. – М.: Недра, 1990. – 261 с.
7. Практикум по клинической диагностике внутренних незаразных болезней с.-х. животных / А.М.Смирнов, Г.Л.Дугин, В.С.Кондратьев [и др.]. – Л.: Колос, 1978. – 272 с.
8. Пестис, В.К. Сапропели в кормлении сельскохозяйственных животных: монография / В.К.Пестис. – Гродно: УО «Гродненский государственный аграрный университет», 2003. – 260 с.
9. Определение острой токсичности и изучение кумулятивных свойств сапропеля / Р.Н.Файзрахманов, Ш.К.Шакиров, М.А.Багманов, Р.Н.Файзрахманов-мл. // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2012. – Т. 208. – С. 256–261.
10. Studying the action of different doses of nanostructured sapropel on the morpho-functional state of the contact of the digestive system of white mice / V.O.Ezhkov [et al.] // Nanotechnologies in Russia. – 2016. – Vol. 11, Issue. 7-8. – P. 497–505.
11. Geochemistry of Aegean Sea sediments: implications for surface-and bottom-water conditions during sapropel deposition since MIS 5 / Isler, Ekrem Bursin [et al.] // Turkish journal of Earth Sciences. – 2016. – Vol. 25, Issue. 2. – P. 103–107.
12. Kurzo, B.V. Formation of sapropel in the lakes of Belarus / B.V.Kurzo, Yu.Yu.Navosha, V.P.Strigutskii // Solid fuel chemistry. – 2017. – Vol. 51, Issue. 5. – P. 326–335.
13. Unique properties of humic substances from sapropel / V.A.Rumyantsev, A.S.Mityukov, L.N.Kryukov, G.S.Yaroshevich // Doklady Akademii Nauk. – 2017. – Vol. 473, Issue. 2. – P. 724–727.
14. The Elemental Composition of Humic Acids of Sapropels: A Study for Lakes of the Upper and Middle Priobye, West Siberia / M.P.Sartakov, N.V.Shpynova, I.D.Komissarov, Yu.M.Deryabina // International Journal of Ecology & Development. – 2017. – Vol. 32, Issue. 4. – P. 138–144.

THE LIVING WEIGHT AND THE BLOOD COMPOSITION OF CALVES DEPENDING ON THE FORM AND THE RATE OF SUPPLEMENTARY SAPROPEL-BASED FEEDS

¹*Ezhkova A.M. – Doctor of Biological Sciences; ¹Yapparov I.A. – Doctor of Biological Sciences; ¹Ezhkov V.O. – Doctor of Veterinary Sciences; ¹Yapparov A.Kh. – Doctor of Agricultural Sciences, professor; ²Faizrahmanov R.N. – Candidate of Agricultural Sciences.*

¹*Tatar Research Institute of Agricultural Chemistry and Soil Science – Subdivision of the Federal Research Center «Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences» (Tatar Research Institute of Agricultural Chemistry and Soil Science, FRC Kazan Scientific Center of RAS) (e-mail: niiexp2@mail.ru; egkova-am@mail.ru).*

²*Bauman N.E. Kazan State Academy of Veterinary Medicine, Kazan (e-mail: kgavm_baumana@mail.ru).*

The research data on the different dosage effectiveness of new generation feed supplement nanostructured sapropel for increasing the productivity and improving the hematological parameters of young cattle are presented. The objects of study were Kholmogory breed calves of Tatarstan type at the age of one month, production tests were conducted in the Atninskiy region of the Republic of Tatarstan. The calves were affected by nanostructured sapropel in doses of 3.0; 1.8; 0.6% and fodder sapropel at the optimal dose of 3.0% to the dietary dry matter. Supplementary feeds had been injected for 60 days. Experiments proved that the use of fodder sapropel increased the living weight of calves by 3.3 kg, when using nanostructured sapropel - by 6.0; 7.7 and 7.1 kg, in comparison with control animals. The use of sapropels promoted an increase in the red blood cells number in the calves' blood, the hemoglobin content, total calcium, inorganic phosphorus, total protein and alkalinity reserve index, which did not exceed the physiological norm. The nanostructured sapropel was more effective in animals than fodder sapropel. The best results for the living weight

and optimization of blood parameters were achieved when using the nanostructured sapropel at a dose of 1.8%. The long-term nanostructured sapropel injection at a dose of 3.0% to the calves diet showed a high efficiency of average daily gain in the first half of the experiment, and then excessive nutrients supply led to a decrease in living weight. The nanostructured sapropel use at a dose of 0.6% improved productivity and hematological parameters, but did not reach the potential of larger dose. The supplementary feed based on sapropel can be recommended for replenishment of protein and mineral nutrition of animals.

KEYWORDS: calves, supplement feed, nanostructured sapropel, average daily gain, morphological and biochemical parameters of blood.

References

1. Agromineralnye resursy Tatarstana I perspektivy ikh ispolzovaniya [Agro-mineral resources of Tatarstan and prospects of their use] / edited by A.V.Yakimov. – Kazan: Feng, 2002. – 272 p.
2. Adamovich, K.F. Vliyaniye kombikormov s sapropelom na pokazateli perevarimosti pitatelnykh veschestv korma u suporosnykh svinomatok [Influence of mixed fodders with sapropel on digestibility of feed nutrients in pregnant sows] / K.F.Adamovich // Zootehnicheskaya nauka Belarusi: sbornik nauchnykh trudov. T. 42. – Zhodino, 2007. – P. 193-199.
3. Banzuzi, B. A. Otsenka effektivnosti RSK I IFA pri vyyavlenii khlamidiynykh antitel v syvorotke krovi krupnogo rogotogo skota [Evaluation of the effectiveness of RSK and ELISA in detecting chlamydial antibodies in the blood serum of cattle] / B.A.Banzuzi, R.Kh.Ravilov, V.V.Gerasimov // Uchenye zapiski KGAVM im. N.E.Baumana. – 2011. – T. 206. – P. 19-22.
4. Nanostrukturnye mineraly: poluchenie, khimicheskii i mineralnye sostavy, struktura i fiziko-khimicheskie svoystva [Nanostructural minerals: production, chemical and mineral compositions, structure and physico-chemical properties] / V.O.Ezhkov [et al.] // Vestnik Kazanskogo Tekhnologicheskogo universiteta. – 2014. – Vol. 17, № 11. – P. 41-45.
5. Zakirov, T.M. Izmeneniye biokhimicheskikh pokazateley syvorotki krovi korov pri dobavlenii v ratsion aktivirovannogo energoproteinovogo kontsentrata "BioGumMix" [Change in biochemical indices of blood sera from cows with the addition of activated energy-protein concentrate "BioGumMix"] / T.M.Zakirov // Veterinarny vrach. – 2016. – № 4. – P. 62-67.
6. Netraditsionnye vidy nerudnogo mineralnogo syrya [Non-traditional types of non-metallic mineral raw materials] [Text] / U.G.Distanov, N.N.Vedernikov, A.S.Filko [et al.]. – M.: Nedra, 1990. – 261 p.
7. Smirnov, A.M. Praktikum po klinicheskoy diagnostike vnutrennikh nezaraznykh bolezney selskokhozyaystvennykh zhivotnykh [Workshop on the clinical diagnostics of internal non-contagious diseases of farm animals] / A.M.Smirnov, G.L.Dugin, V.S.Kondratiev. – L.: Kolos, 1978. – 272 p.
8. Pestis, V.K. Sapropeli v kormlenii selskokhozyaystvennykh zhivotnykh: monografiya [Sapropels in feeding of farm animals] / V.K.Pestis. – Grodno, 2003. – 260 p.
9. Opredeleniye ostroy toksichnosti I izucheniye kumulyativnykh svoystv sapropelya [Determination of acute toxicity and study of cumulative properties of sapropel] / R.N.Fayzrakhmanov, Sh.K.Shakirov, M.A.Bagmanov, R.N.Fayzrakhmanov-jun. // Uchenye zapiski KGAVM im. N.E.Baumana. – 2012. – T. 208. – P. 256-261.
10. Studying the action of different doses of nanostructured sapropel on the morpho-functional state of the contact of the digestive system of white mice / V.O.Ezhkov [et al.] // Nanotechnologies in Russia. – 2016. – Vol. 11, Issue 7-8. – P. 497-505.
11. Geochemistry of Aegean Sea sediments: implications for surface-and bottom-water conditions during sapropel deposition since MIS 5 / Isler, Ekrem Bursin [et al.] // Turkish journal of Earth Sciences. – 2016. – Vol. 25, Issue 2. – P. 103-107.
12. Kurzo, B.V. Formation of sapropel in the lakes of Belarus / B.V.Kurzo, Yu.Yu.Navosha, V.P.Strigtuskii // Solid fuel chemistry. – 2017. – Vol. 51, Issue 5. – P. 326-335.
13. Unique properties of humic substances from sapropel / V.A.Rumyantsev, A.S.Mityukov, L.N.Kryukov, G.S.Yaroshevich // Doklady Akademii Nauk. – 2017. – Vol. 473, Issue 2. – P. 724-727.
14. The Elemental Composition of Humic Acids of Sapropels: A Study for Lakes of the Upper and Middle Priobye, West Siberia / M.P.Sartakov, N.V.Shpynova, I.D.Komissarov, Yu.M.Deryabina // International Journal of Ecology & Development. – 2017. – Vol. 32, Issue 4. – P. 138-144.

РУБЦОВОЕ ПИЩЕВАРЕНИЕ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ В ПРИСУТСТВИИ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРАСТВОРИМОГО ПОЛИМЕРА

Н.В.Грудина – доктор биологических наук, вед.н.с.; В.В.Быданова – кандидат химических наук, ст.н.с.; Н.С.Грудин – кандидат ветеринарных наук, ст.н.с.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии» (ФГБНУ ВНИИРАЭ), г.Обнинск (249034, Калужская область, Обнинск, Киевское шоссе, 109 км; тел.:+7(484) 396-48-02; e-mail: n.grudina2014@yandex.ru).

Одним из способов решения проблемы повышения мясной и молочной продуктивности сельскохозяйственных животных является применение различных методов и средств, снижающих степень распада протеина высококонцентрированных белковых кормов в рубце. Каждый из существующих способов торможения распада белка в рубце по-своему эффективен. Но у этих средств «защиты» белка есть существенные недостатки, которые ограничивают их применение. Поэтому актуальной и перспективной задачей является разработка новых препаратов для эффективной «защиты» кормовых белков от микробного распада в рубце жвачных животных. В данной статье приведены результаты исследования, указывающие на возможность применения высокомолекулярных водорастворимых полимеров (ВВП) для торможения распада белка в рубце. ВВП имел линейную структуру молекулы и молекулярную массу 1×10^7 Да. Полимер вводили в рацион с концентрированным кормом. В эксперименте показано также, что влияние ВВП сопровождается оптимизацией среды обитания бактериальной флоры рубца, что способствует нормализации обменных процессов у жвачных животных, особенно, при концентратном типе кормления крупного рогатого скота.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: жвачные животные, рубец, протеин, «защита» белка, высокомолекулярные водорастворимые полимеры.

Интенсификация животноводства заставляет ученых искать все новые пути повышения мясной и молочной продуктивности сельскохозяйственных животных. Из всех факторов окружающей среды самое большое влияние на здоровье и продуктивность животных оказывает кормление. Для животноводства важно не только количество, но, главным образом, качество кормов, их ценность, определяется содержанием питательных веществ. Особенно важным компонентом корма является белок. Поэтому для обеспечения высокой продуктивности коров в рационах увеличивают долю концентрированных кормов. Однако, в целях повышения продуктивности животных невозможно неограниченно увеличивать содержание протеинов в рационе, т.к. для нормального функционирования желудочно-кишечного тракта жвачных животных питательные вещества необходимы в определенном соотношении. При избытке протеина (особенно, при недостатке углеводов) в преджелудках жвачных животных понижается всасывание аммиака, происходит образование большого количества масляной и уксусной кислот, которые не утилизируются, а превращаются в ацетоуксусную и бета-оксимасляные кислоты. Избыточное введение в рацион концентрированных кормов приводит к тому, что в преджелудках уменьшается бактериальный синтез аминокислот и витаминов группы В, а поступающий с кормами белок недостаточно перерабатывается микрофлорой, что ведёт к накоплению в организме недоокисленных токсичных продуктов. В результате развивается тяжёлая интоксикация организма с развитием кетоза, что

влечет общее расстройство всех систем организма животных, снижение продуктивности и нарушение репродуктивной функции. Следовательно, избыточное содержание белка может приводить к нарушению не только процессов пищеварения, но и к нарушению функциональной активности организма в целом. Особенно это касается высокопродуктивных животных.

Для снижения указанных выше последствий и для достижения высокой продуктивности лактирующих коров необходимо создать наиболее благоприятные условия для микрофлоры рубца, а также нормировать в различных кормах количества расщепляемого (РП) и нерасщепляемого (НРП) протеина в рубце [1-4] при условии его «защиты» от распада в преджелудках [5].

На протяжении многих лет в России и за рубежом активно ведутся работы по поиску способов и препаратов, снижающих степень распада протеина высококонцентрированных белковых кормов. Существующие подходы к решению этой задачи можно условно разделить на четыре группы.

1. Денатурирование протеинов в щелочных средах (рН=9-10) с последующим нагреванием от 30 до 80°C, либо термообработкой водных растворов и суспензий кормов при повышенных температурах с доведением массы до полужидкого или жидкого состояния и затем с последующим впрыскиванием массы в холодную форму.

2. Обработка белков и белоксодержащих кормов дубящими веществами, в частности, таннином.

3. Обработка белоксодержащих кормов альдегидами, спиртами, кислотами и др.

4. Гранулирование кормовых добавок и белоксо-держающих кормов с последующим капсулированием оболочками на основе солей жирных кислот, пленкообразующих полимеров и т. д. нерастворимыми в рубце (в нейтральной среде), но растворимыми в нижележащих отделах желудочно-кишечного тракта в кислой среде.

Каждый из перечисленных выше способов торможения распада белка в рубце по-своему эффективен. Это подтверждается заметным увеличением приростов живой массы или увеличением надоев молока. Но у этих средств «защиты» есть и недостатки, прежде всего связанные со сложностью технологических приемов, большой дозировкой препаратов, токсичностью некоторых из них, высокими затратами при их производстве и применении. Все это делает дорогостоящим и нерентабельным применение подобных препаратов, а в случае их токсичности – приводит к снижению качества молока и мяса. Представляется весьма актуальной и перспективной задачей разработка новых препаратов для эффективной «защиты» полноценных кормовых белков от микробного распада в преджелудках жвачных животных.

Наши исследования физико-химических свойств одного из представителей класса высокомолекулярных водорастворимых полимеров (ВВП), проведенные в условиях *in vitro*, показали перспективность применения ВВП в качестве «защитающего» агента. При этом такой агент, по нашим предположениям, не должен иметь перечисленные выше недостатки известных агентов «защиты».

Цель работы – изучить влияние высокомолекулярных водорастворимых полимеров на рубцовое пищеварение жвачных животных.

Материалы и методы. Экспериментальная работа была выполнена на 6 коровах, черно-пестрой породы, с суточным удоем на момент опыта 25 л. Были сформированы две группы – контрольная и опытная. В каждой группе было 3 головы. Исследования по физиологии пищеварения были выполнены в условиях вивария института. Во всех физиологических экспериментах, в которых изучали влияние полимера на рубцовое пищеварение жвачных животных, использовали оперированных коров, которые имели фистулу рубца [6]. В рубцовой жидкости определяли общую концентрацию летучих жирных кислот (ЛЖК) методом паровой дистилляции на аппарате Маркгама (Хром-42); концентрацию аммиака – микродиффузионным методом в чашках Конвея; рН – на рН-метре; количество бактерий и инфузорий; эффективность микробного синтеза; распадаемость сырого протеина (СП) кормов рациона – по методам, изложенным в руководствах [7-9].

В качестве полимерной добавки в корм использовали высокомолекулярный анионный водорастворимый полимер (ВВП), с линейной структурой молекулы и молекулярной массой $\approx 1 \times 10^6$ Дальтон. ВВП вносили в комбикорм в виде водного раствора из расчета 0,001% от веса корма.

Результаты исследований. В виду того, что в процессах пищеварения главная роль принадлежит рубцу, были изучены процессы, происходящие в нем при применении полимерной добавки высокомолекулярного анионного полиэлектролита, с использованием некоторых основных критериев.

Важным критерием интенсивности ферментативных процессов в рубце служит уровень образования аммиака и ЛЖК. В экспериментах выявлено, что введение в рацион коров малых количества ВВП в смеси с комбикормом вначале незначительно ускоряло процесс образования аммиака и ЛЖК, а затем снижало, что указывает на наличие эффекта частичной «защиты» белка в рубце. Кроме того, следует отметить выраженную тенденцию ($P < 0,2$) к увеличению значений рН рубцовой жидкости у опытных животных ($6,19 \pm 0,07$), по сравнению с контролем ($5,9 \pm 0,05$), особенно в период интенсивной ферментации (через 3 ч после кормления). Для деятельности рубцовой микрофлоры оптимальные значения рН – 6,2. По-видимому, в рубце происходит частичная сорбция ионов водорода полимером, благодаря чему поддерживается более благоприятный уровень рН для рубцовой микрофлоры. Мы полагаем, что другое объяснение может заключаться в том, что полимер способствует снижению образования аммиака и других продуктов диссимилиации кормовых белков за счет эффекта «защиты» белка в рубцовом содержимом.

Изучение микробиологических процессов в присутствии испытуемого полимера выявило повышение количества бактерий и инфузорий в рубце у животных опытной группы по сравнению с контролем (табл. 1). Известно, что существует прямая зависимость между численностью микроорганизмов рубца и продуктивностью жвачных животных. Чем больше количество микроорганизмов в рубце, тем выше уровень продуктивности животных. За счёт ферментов микрофлоры рубца удовлетворяется до 80% потребности жвачных в энергии, 30-50% – в белке, в значительной мере в макро- и микроэлементах и витаминах, переваривается от 50 до 70% сырой клетчатки рациона. В преджелудках жвачных развиваются в основном анаэробные микроорганизмы: простейшие (инфузории) и бактерии. Следует отметить особую биологическую роль инфузорий в рубцовом пищеварении. Они подвергаются корм механической обработке, используют для своего питания трудно перевариваемую клетчатку и благодаря активному движению создают своеобразную микроциркуляцию среды. Инфузории разрыхляют, измельчают корм, в результате чего увеличивается его поверхность, он становится более доступным для действия бактериальных ферментов. Белок тела инфузорий, как и белок бактерий, имеет высокую биологическую ценность.

В таблице 1 показано, что число бактерий в рубце животных опытной группы составляло $8,5 \pm 0,16$ млрд/мл, а в контроле – $178,0 \pm 21,2$ млрд/мл; количество инфузорий в рубце

было равно в опыте и контроле 178,0±21,2 тыс/мл и 141,6±26,3 тыс/мл, соответственно. Полученные нами данные свидетельствуют о благоприятном влиянии полимера на среду обитания микроорганизмов рубца, т.к. происходит существенное уве-

личение их численности, следовательно, можно предполагать, что введение полимера в концентрированный корм будет положительно влиять на молочную продуктивность коров.

Таблица 1

Среднесуточные показатели микробиологических процессов в рубце коров контрольной и опытной групп

| Группа | Число бактерий, млрд/мл | Число инфузорий, тыс/мл |
|----------|-------------------------|-------------------------|
| Контроль | 8,1±0,16 | 141,6±26,3 |
| Опыт | 8,5±0,16 | 178,0±21,2 |

Результаты исследования микробного синтеза в рубце коров приведены в таблице 2. Очевидно, что этот показатель был ниже у животных из опытной группы по сравнению с контрольной и составлял 23,2±1,3 г

микр. азота/кг ПОВ и 25,9±1,6 г микр. азота/кг ПОВ, соответственно. Распадаемость СП кормов рациона также была ниже в опытной группе, чем в контрольной и была равна 51,3±2,9% и 56,1±2,6%, соответственно.

Таблица 2

Эффективность микробного синтеза в рубце коров и распадаемость сырого протеина кормов рациона

| Группа | Эффективность микробного синтеза, г микр. азота/кг ПОВ | Распадаемость СП кормов рациона, % |
|----------|--|------------------------------------|
| Контроль | 25,9±1,6 | 56,1±2,6 |
| Опыт | 23,2±1,3 | 51,3±2,9 |

Таким образом, введение полимера в корм животным снижало на 10% эффективность микробного синтеза при одновременном снижении распадаемости СП кормов рациона на 8,5% (табл. 2), что свидетельствует о наличии эффекта «защиты» кормового белка от распада микрофлорой рубца и позволяет предположить, что этот эффект «защиты» будет способствовать повышению молочной продуктивности коров.

Заключение. Полученные экспериментальные данные дают определенные основания в пользу представления о том, что влияние высокомолекулярного водорастворимого полимера на процессы пищеварения у жвачных животных может сопровождаться оптимизацией среды обитания бактериальной фло-

ры рубца и «защитой» кормового белка от распада в рубце, что, очевидно, будет способствовать нормализации обменных процессов у жвачных животных, особенно, при концентратном типе кормления крупного рогатого скота. Абсолютная безвредность для здоровья животных и человека; низкая стоимость; незначительные концентрации полимера, дающие положительный эффект; простота процесса внесения в корм дают основание считать водорастворимые высокомолекулярные полимеры перспективными для разработки на их основе принципиально новых экологически чистых добавок в корм и высоко рентабельной технологии повышения продуктивности сельскохозяйственных животных.

Литература

1. Mohammed, O.E. Measurement of protein degradation in the rumen / O.E.Mohammed, R.M.Smith // Proc. Nut 4r. Soc. – 1977. – Vol. 36, № 1. – P. 152 A.
2. Mehret A.Z. Processing factors affecting the degradability of fish meal in the rumen / A.Z.Mehret, E.R.Orskow // J. Anim. Sci. – 1979. – Vol. 50, № 3. – P. 737–744.
3. McAllan A.B. Factors influencing the digestion of dietary carbohydrates between the month and abomasums of steers / A.B. McAllan, R.H. Smith // Brit. J. Nutr. – 1983. – Vol. 50. – № 2. – P. 445–454.
4. Michaleten–Doreau B. Aliments concentres pour ruminantes: degradability in situ dans le rumen / B. Michaleten–Doreau // INRA Prod. Anim. – 1992. – Vol. 5, № 5. – P. 371 – 377.
5. Егерсков Э.П. Протеиновое питание жвачных животных / Э.П.Егерсков. – М.: Агропромиздат, 1985. – 80 с.
6. Алиев А.А. Новейшие оперативные методы исследований жвачных животных / А.А.Алиев. – М: Агропромиздат, 1985. – 127 с.
7. Изучение микрофлоры преджелудков у жвачных: методические указания. – Боровск: ВНИИФБиП, 1977.
8. Методы исследования пищеварения жвачных. – Боровск: ВНИИФБиП, 1987.
9. Протеиновое питание молочных коров (Рекомендации по нормированию). – Боровск: ВНИИФБиП, 1998.

DIGESTION IN THE RUMEN OF RUMINANT ANIMALS IN THE PRESENCE OF HIGH MOLECULAR WATER-SOLUBLE POLYMER

Grudina N.V. – Doctor of Biological Sciences; Bydanova V.V. – Candidate of Chemical Sciences; Grudin N.S. – Candidate of Veterinary Sciences.

**All-Russian Research Institute of Agricultural Radiology and Agroecology, Obninsk
(e-mail: n.grudina2014@yandex.ru).**

One of the ways of solving the problem of improving meat and milk productivity of farm animals is the use of different methods and means reducing the degree of decomposition of the protein in high concentrated protein feeds of the rumen. Each of the existing methods for reducing the protein disintegration in the rumen is effective in its own way. But these means of "protecting" the protein have significant drawbacks, which limit their application. Therefore, an important and promising task is development of new drugs for the effective "protection" concentrated protein feeds from microbial decay in the rumen of ruminant animals. This article presents the results of the study, indicating the possibility of using high molecular weight water-soluble polymers (HWP) to reduce decay of protein in the rumen. HWP had a linear molecular structure and a molecular mass of 1×10^7 Da. The polymer was introduced into the diet with concentrated food. The experiment also shows that the effect of HWP is accompanied by an optimization of the habitat of the bacterial flora of the rumen, which contributes to the normalization of metabolic processes in ruminant animals, especially in case of the concentrating type of feeding cattle.

KEYWORDS: ruminant animals, rumen, protein, "protecting" the protein, high molecular weight water-soluble polymers.

References

1. Mohammed O.E. Measurement of protein degradation in the rumen / O.E.Mohammed, R.M.Smith // Proc. Nut 4r. Soc. – 1977. – Vol. 36, № 1. – P. 152 A.
2. Mehret A.Z. Processing factors affecting the degradability of fish meal in the rumen / A.Z.Mehret, E.R.Orskow // J.Anim. Sci. – 1979. – Vol. 50, № 3. – P. 737-744.
3. McAllan A.B. Factors influencing the digestion of dietary carbohydrates between the mouth and abomasums of steers / A.B.McAllan, R.H.Smith // Brit. J. Nutr. - 1983. – Vol. 50. – № 2. – P. 445–454.
4. Michaleten-Doreau B. Aliments concentres pour ruminantes: degradability in situ dans le rumen / B.Michaleten-Doreau // INRA Prod. Anim. – 1992. – Vol. – 5, № .5. – P. 371–377.
5. Yegerskov E.P. Proteinovoe pitanie zhvachnykh zhivotnykh [Protein feeding of ruminants] / E.P.Yegerskov. – M.: Agropromizdat, 1985. – 80 p.
6. Aliev A.A. Noveyshiye operativnye metody issledovaniy zhvachnykh zhivotnykh [The newest operational methods of ruminant animals research] / A.A.Aliev. – M: Agropromizdat, 1985. – 127 p.
7. Izuchenie mikroflory predzheludkov u zhvachnykh: metodicheskie ukazaniya [Study of the proventriculi microflora in ruminants: guidelines]. – Borovsk: Izd-vo BiFiP, 1977.
8. Metody issledovaniya pishchevareniya zhvachnykh [Methods for studying the digestion of ruminants]. – Borovsk: Izd-vo BiFiP, 1987.
9. Proteinovoe pitanie molochnykh korov (Rekomendatsii po normirovaniyu) [Protein nutrition of dairy cows (Recommendations on rationing)]. – Borovsk: Izd-vo BiFiP, 1998.

ДИНАМИКА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ У СТЕЛЬНЫХ СУХОСТОЙНЫХ И НОВОТЕЛЬНЫХ КОРОВ

Е.О. Крупин – кандидат ветеринарных наук, вед.н.с., зав. отделом;

Ш.К. Шакиров – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, гл.н.с.;

М.Ш. Тагиров – доктор сельскохозяйственных наук, академик АН РТ, руководитель.

Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», г. Казань (420059, г. Казань, Оренбургский тракт, 48, тел. (843) 277-81-17, e-mail: tatniva@mail.ru).

Приведены результаты гематологического исследования цельной крови, а также результаты биохимического анализа сыворотки крови (показатели белкового обмена) у стельных сухостойных и новотельных коров. В исследованиях дана оценка влияния использования в рационах кормления животных различных витаминно-минеральных премиксов (П60-3/2 и П60-3/П) в комплексе с 1,2-пропандиолом и без такового. Статья подготовлена в рамках государственного задания АААА-А18-118031390148-1. В работе использованы методы морфологического исследования цельной крови, методы биохимического исследования показателей белкового обмена сыворотки крови, математические и статистические методы. Исследованиями установили, что применение в составе рационов кормления животных различных кормовых средств и в различные по продолжительности сроки оказывает влияние на морфологический и биохимический состав цельной крови и сыворотки соответственно. Изменения установлены за две недели до отела и на третий день после отела. Использование в кормлении животных третьей группы премикса П60-3/П на протяжении всего сухостойного периода в комплексе с 1,2-пропандиолом сопровождается наиболее выраженным достоверным увеличением содержания эритроцитов у данных особей на третий день после отела (на 21,3%, $P < 0,05$). За две недели до отела у стельных сухостойных коров достоверно увеличивается содержание в сыворотке крови общего белка (25,2-30,1%, $P < 0,01$) и альбуминов (21,7% ($P < 0,05$) – 52,2% ($P < 0,01$)). Использование в кормлении животных третьей группы премикса П60-3/П с первого дня сухостойного периода сопровождается наиболее выраженным достоверным увеличением содержания общего белка у данных особей за две недели до отела (30,1%, $P < 0,01$).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: коровы, корм, кровь, показатель, обмен веществ.

При создании здорового стада продуктивных животных целесообразно направленно регулировать обмен веществ в их организме, особенно в сухостойный период – ключевой в новом физиологическом цикле коров: именно в этот период происходит восстановление организма после напряженной лактации, и, одновременно, осуществляется подготовка к следующей [1].

Не вызывает сомнения, чтобы выращивание животных стало эффективным, необходимо применять прогрессивные технологии их содержания, кормления, а также своевременно проводить ветеринарно-профилактические мероприятия. Одним из главных технологических процессов в животноводстве, от которого зависит, рентабельность отрасли в целом является кормление животных, причем кормами хорошего качества. Неполноценность кормления животных, по сути, является основным фактором, сдерживающим достижение высоких экономических показателей производства молока, да и не только молока [2, 3, 4].

Неблагоприятные условия кормления стельных сухостойных коров приводят к рождению слабых телят. Как осложнение – трудные отелы, задержание помета, послеродовые осложнения и др. [5].

После отела дойные коровы испытывают высокую потребность в энергии, которая не покрывается за счет питательных веществ, поступающих с кормами основного рациона. То количество энергии, которого не хватает животному, заимствуется из резервов самого организма, что может привести к значительному нарушению гомеостаза [6, 7].

На практике, животным, для восполнения потребности в энергии, а также биологически активных веществах, применяют различные регуляторы метаболизма [8, 9]. Оценка их эффективности с точки зрения влияния на процессы обмена веществ лежит в основе разработки научно-обоснованных схем применения тех или иных кормовых средств.

Материалы и методы. Исследования выполнены в ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН и на популяции клинически здоровых стельных сухостойных коров голштинской породы СХПК ПЗ им. Ленина Атнинского района Республики Татарстан. В период исследования особи первой (контрольной) группы в составе рациона кормления получали полнорационный комбикорм, обогащенный 1% премиксом П60-3/2 с первого дня сухостойного периода. Животным второй группы в заключительные 15 дней сухостойного периода

указанный выше премикс заменили на 1% премикс П60-3/П, а также задавали 1,2-пропандиол по 300 мл через день, начиная за 7 дней до предполагаемой даты отела. Животные третьей группы на протяжении всего сухостойного периода получали рекомендованный рацион, обогащенный 1% премиксом П60-3/П, а также 1,2-пропандиол в указанной выше дозе и в аналогичные сроки. Состав премиксов, технология их производства разработаны, а необходимое количество произведено в ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН.

В цельной крови животных определяли содержание общего количества эритроцитов и лейкоцитов, концентрацию гемоглобина и скорость оседания эритроцитов по общепринятым в гематологии методикам [10]. В сыворотке крови животных определяли содержание общего белка (колориметрическим фотометрическим (биуретовым) методом), альбуминов (BCG-методом по реакции с бромкрезоловым зеленым), мочевины (УФ кинетическим методом) [11]. Формирование групп животных и методические приемы постановки научно-хозяйственного опыта выполнены по А.И. Овсянникову [12]. Полученные в ходе исследований результаты обрабатывали с применением математической статистики [13].

Работа выполнена в рамках государственного задания: Мобилизация генетических ресурсов растений и животных, создание новаций, обеспечивающих производство биологически ценных продуктов питания с максимальной безопасностью для здоровья человека и окружающей среды. Номер регистрации: АААА-А18-118031390148-1.

Результаты исследований. Данные, представленные в таблице 1, свидетельствуют об увеличении за две недели до отела содержания эритроцитов и гемоглобина в крови у животных всех групп. Наиболее выраженным увеличением содержания эритроцитов было у животных второй и третьей группы – 30,9 (P<0,05) и 20,3% (P<0,05) соответственно; гемоглобина – у животных первой и второй групп – 16,3 (P<0,05) и 21,1% (P<0,05) соответственно. Содержание лейкоцитов имело тенденцию к увеличению у животных первой и второй групп, причем в большей степени выраженную у животных первой группы (28,5%), при снижении содержания лейкоцитов на 8,9% у особой третьей группы, у которых отмечено также и максимальное увеличение СОЭ – на 42,9%.

Таблица 1

Динамика морфологических показателей крови подопытных животных

| Показатель | Ед. изм. | Группа | | |
|-------------------------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | первая | вторая | третья |
| Подготовительный период (n=5) | | | | |
| Эритроциты | 10 ¹² /л | 5,66±1,35 | 5,65±0,52 | 5,86±0,40 |
| Лейкоциты | 10 ⁹ /л | 8,59±1,33 | 9,80±4,04 | 11,16±2,77 |
| Гемоглобин | г/л | 95,60±3,39 | 98,8±7,20 | 98,6±7,55 |
| СОЭ | мм/час | 1,00±0,42 | 0,70±0,27 | 0,70±0,21 |
| Две недели до отела (n=5) | | | | |
| Эритроциты | 10 ¹² /л | 6,07±0,19 | 7,40±0,54 | 7,05±0,31 |
| Лейкоциты | 10 ⁹ /л | 11,04±1,73 | 10,40±2,57 | 10,16±4,27 |
| Гемоглобин | г/л | 111,20±5,35 | 119,60±5,30 | 109,20±5,10 |
| СОЭ | мм/час | 1,00±0,55 | 0,90±0,65 | 1,00±0,61 |
| На 3 день после отела (n=5) | | | | |
| Эритроциты | 10 ¹² /л | 7,02±0,35 | 8,50±0,53 | 8,55±0,44 |
| Лейкоциты | 10 ⁹ /л | 10,46±1,04 | 8,05±2,20 | 9,09±1,69 |
| Гемоглобин | г/л | 112,8±3,30 | 113,6±5,00 | 117,65±3,31 |
| СОЭ | мм/час | 0,90±0,22 | 0,67±0,12 | 0,57±0,19 |

На третий день после отела достоверный (P<0,05) тренд на повышение содержания в крови эритроцитов сохранился и оно было наиболее выраженным у животных третьей группы – 21,3%, при этом, у данных особей отмечали, наряду с этим, и наиболее выраженное увеличение содержания гемоглобина (7,7%). Содержание

лейкоцитов имело тенденцию к снижению, выраженную в разной степени у животных различных групп и составившую 5,2-22,6%. Кроме того, у животных всех без исключения групп выявлена тенденция к значительному уменьшению СОЭ – от 10,0% у животных первой группы до 43,0% у животных второй группы.

Анализ динамики биохимических показателей белкового обмена в сыворотке крови коров, представленный в таблице 2, показал увеличение содержания как общего белка, так и альбуминов, и мочевины у особой опытных групп за две недели до отела. Увеличение содержания общего белка у животных всех групп составило 25,2-30,1% и было достоверным ($P<0,01$). Увеличение содержания

альбуминов у животных второй и третьей групп составило 21,7-27,7% и также было достоверным ($P<0,05$), а то время как максимальным и более достоверным ($P<0,01$) оно оказалось у животных первой группы (52,2%). Тенденция на увеличение содержания мочевины в большей степени была выражена у животных первой и третьей групп и составила 48,3 и 34,3%, соответственно.

Таблица 2

Динамика биохимических показателей белкового обмена в сыворотке крови

| Показатель | Ед. изм. | Группа | | |
|----------------------------------|----------|------------|------------|------------|
| | | первая | вторая | третья |
| Подготовительный период (n=5) | | | | |
| Общий белок | г/л | 61,20±2,12 | 62,00±1,67 | 67,20±1,50 |
| Альбумины | г/л | 27,20±2,59 | 31,80±1,30 | 31,40±1,52 |
| Мочевина | ммоль/л | 3,19±1,05 | 4,41±0,48 | 3,67±0,44 |
| Две недели до отела (n=5) | | | | |
| Общий белок | г/л | 78,60±3,36 | 77,60±4,10 | 87,40±5,41 |
| Альбумины | г/л | 41,40±2,07 | 40,60±2,88 | 38,20±2,45 |
| Мочевина | ммоль/л | 4,73±0,30 | 4,80±1,44 | 4,93±1,61 |
| На третий день после отела (n=5) | | | | |
| Общий белок | г/л | 66,33±4,09 | 68,00±7,81 | 69,25±4,11 |
| Альбумины | г/л | 35,67±2,45 | 38,67±2,10 | 36,00±1,14 |
| Мочевина | ммоль/л | 4,75±1,92 | 4,21±1,47 | 4,33±0,86 |

На третий день после отела все из перечисленных ранее показателей белкового обмена в сыворотке крови снижались. Так снижение содержания общего белка в сыворотке крови животных первой и третьей групп составило 15,6 и 20,8% соответственно и было достоверным ($P<0,05$). Наиболее выраженным снижением содержания альбуминов было у животных первой группы и составило 13,9%, а мочевины – у животных второй и третьей групп – 12,3 и 12,2% соответственно.

Заключение. Использование в кормлении животных третьей группы премикса П60-3/П на протяжении

всего сухостойного периода в комплексе с 1,2-пропандиолом сопровождается наиболее выраженным достоверным увеличением содержания эритроцитов у данных особей на 3 день после отела. За две недели до отела у стельных сухостойных коров достоверно увеличивается содержание в сыворотке крови общего белка и альбуминов. Использование в кормлении животных третьей группы премикса П60-3/П на с первого дня сухостойного периода сопровождается наиболее выраженным достоверным увеличением содержания общего белка у данных особей за две недели до отела.

Литература

1. Нежданов, А. Тип кормления и профилактика бесплодия крупного рогатого скота / А.Нежданов, Л.Сергеева // Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. – 2007. – № 7. – С. 27 – 29.
2. Головань, В.Т. Эффективные элементы технологии выращивания телят-молочников / В.Т.Головань, Д.А.Юрин, Ю.Г.Дахужев // Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ. – 2007. – № 31 (7). – С. 162–167.
3. Зарипова, Л.П. Корма Республики Татарстан: состав, питательность и использование / Л.П.Зарипова. – Казань: «Фэн», 2006. – 208 с.
4. Стрекозов, Н.И. Научные основы повышения эффективности молочного скотоводства / Н.И.Стрекозов // Зоотехния. – 2011. – № 11. – С. 12 – 14.
5. Головань, В.Т. Разработка производственно-экономических нормативов в молочном скотоводстве / В.Т.Головань, Ю.Г.Дахужев, М.С.Галичева // Новые технологии. – 2009. – № 1. – С. 16 – 20.
6. Бекасова, Т. Больше энергии – больше молока / Т. Бекасова // Молоко и корма. – 2003. – № 2. – С. 21–22.

7. Herdt, T.H. Fatty liver in dairy cows / T. H. Herdt // Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract. – 1998. – № 4. – P. 269–287.
8. Жиры в кормлении высокопродуктивных коров / Е.О. Крупин [и др.]. – Казань, 2013. – 108 с.
9. Крупин, Е.О. Влияние корректоров энергетического обмена в комплексе с витаминно-минеральными премиксами на показатели воспроизводства и состояние молочной железы у высокопродуктивных коров / Е.О.Крупин // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. Казань. – 2010. – Т. 203. – С. 140–144.
10. Гильмутдинов, Р.Я. Исследование крови животных: методические аспекты / Р.Я.Гильмутдинов, Р.З.Курбанов. – Казань: Изд-во ТГПИ, 2000. – 240 с.
11. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник / И.П.Кондрахин [и др.]. – М.: Колос. – 2004. – 520 с.
12. Овсянников, А.И. Основы опытного дела в животноводстве / А.И.Овсянников. – М.: Колос, 1976. – 304 с.
13. Усович, А.Т. Применение математической статистики при обработке экспериментальных данных в ветеринарии: научное издание / А.Т. Усович, П.Т. Лебедев; Сибирский научно-исследовательский ветеринарный институт. – Омск: Западно-Сибирское книжное издательство, 1970. – 43 с.

DYNAMICS OF HEMATOLOGICAL AND SOME BIOCHEMICAL INDICATORS OF BLOOD SERUM IN DRY AND FRESH COWS

Krupin E.O. – Candidate of Veterinary Sciences; Shakirov Sh.K. – Doctor of Agricultural Sciences, professor; Tagirov M.Sh. – Doctor of Agricultural Sciences.

Tatar Research Institute of Agriculture – Subdivision of the Federal Research Center «Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences», Kazan (e-mail: tatniva@mail.ru).

The results of a hematological study of blood, as well as the results of biochemical analysis of blood serum (protein metabolism parameters) in dry and fresh cows are presented. In studies, the effect of the use of various vitamin-mineral premixes (P60-3/2 and P60-3/P) in the diets of animal feeding in the complex with 1.2-propanediol and without it evaluated. The article is prepared within the framework of the state task of FASO Russia project AAAA-A18-118031390148-1. The methods of morphological investigation of blood, methods of biochemical study of protein metabolism parameters of blood serum, mathematical and statistical methods were used in the work. Studies have established that the use of various feeds in the rations of feeding animals and in different periods of time has an effect on the morphological and biochemical composition of blood and serum, respectively. Changes are established two weeks before calving and on the third day after calving. Using in the feeding of animals the third group of premix P60-3/P throughout the entire dry period in combination with 1.2-propanediol is accompanied by the most pronounced reliable increase in the content of erythrocytes in these individuals on the third day after calving (by 21.3%, $P<0.05$). Two weeks before calving, the content of the total protein in the blood serum increases significantly (25.2-30.1%, $P<0.01$) and also albumins (21.7% ($P<0.05$) – 52.2% ($P<0.01$)). The use of the third group of premix P60-3/P in the feeding of animals from the first day of the dry period is accompanied by the most pronounced reliable increase in the total protein content of these individuals two weeks before calving (30.1% $P<0.01$).

KEYWORDS: cows, feed, blood, indicator, metabolism.

References

1. Nezhdanov, A. Tip kormleniya i profilaktika besplodiya krupnogo ro-gatogo skota [Type of feeding and prevention of infertility of cattle] / A.Nezhdanov, L.Sergeeva // Kormlenie selskoxozyaystvennykh zhivotnykh i kormoproizvodstvo. – 2007. – № 7. – P. 27–29.
2. Golovan, B.T. Effektivnyye elementy tehnologii vyirashchivaniya telyat-molochnikov [Effective elements of the technology of growing calves] / B.T.Golovan, D.A.Yurin, Yu.G.Dahuzhev // Politematcheskij setevoy elektronny nauchny zhurnal KubGAU. – 2007. – № 31 (7). – P. 162–167.
3. Zaripova, L.P. Korma Respubliki Tatarstan: sostav, pitatelnost i ispolzovanie [Feeds of the Republic of Tatarstan: composition, nutritional value and use] / L.P.Zaripova. – Kazan: «Fen», 2006. – 208 p.
4. Strekozov, N.I. Nauchnye osnovy povysheniya effektivnosti molochnogo skotovodstva [Scientific basics for increasing the efficiency of dairy cattle breeding] / N.I.Strekozov // Zootekhniya, 2011. – №11. – P. 12 – 14.
5. Golovan, V.T. Razrabotka proizvodstvenno-ekonomicheskikh normativov v molochnom skotovodstve [Development of production and economic standards in dairy cattle breeding] / V.T.Golovan, Yu.G.Dahuzhev, M.S.Galicheva // Novyye tehnologii. – 2009. – № 1. – P. 16–20.

6. Bekasova, T. Bolshe energii – bolshe moloka [More energy – more milk] / T. Bekasova // Moloko i korma. – 2003. – № 2. – P. 21–22.
7. Herdt, T.H. Fatty liver in dairy cows / T. H. Herdt // Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract. – 1998. – № 4. – P. 269 – 287.
8. Zhiry v kormlenii vysokoproduktivnykh korov [Fats in the feeding of high-yielding cows] / E.O.Krupin [et al.]. – Kazan, 2013. – 108 p.
9. Krupin, E.O. Vliyaniye korrektorov energeticheskogo obmena v komplekse s vitaminno-mineralnyimi premiksami na pokazately vosproizvodstva i sostoyaniye molochnoy zhelezy u vysokoproduktivnykh korov [Effect of energy metabolism correctors in combination with vitamin-mineral premixes on reproduction rates and breast status in highly productive cows] // Uchenyie zapiski Kazanskooy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny imeni N.E.Baumana. Kazan. – 2010. – T. 203. – P. 140–144.
10. Gilmutdinov, R.Ya. Issledovaniye krovi zhivotnykh: metodicheskie aspekty [Animal blood test: methodological aspects] / R.Ya. Gilmutdinov, R.Z. Kurbanov. – Kazan: Izd-vo TGGI, 2000. – 240 p.
11. Metody veterinarnoy klinicheskoy laboratornoy diagnostiki: spravochnik [Methods of veterinary clinical laboratory diagnosis: a handbook] / I.P.Kondrahin [et al.]. – M.: Kolos, 2004. – 520 s.
12. Ovsyannikov, A.I. Osnovy opyitnogo dela v zhivotnovodstve [The basics of experimentation in cattle breeding] / A.I.Ovsyannikov. – M.: Kolos, 1976. – 304 p.
13. Usovich, A.T. Primeneniye matematicheskoy statistiki pri obrabotke eksperimentalnykh dannykh v veterinarii: nauchnoe izdaniye [The application of mathematical statistics in the processing of experimental data in veterinary science: a scientific publication] / A.T.Usovich, P.T.Lebedev; Sibirskiy nauchno-issledovatel'skiy veterinarnyy in-stitut. – Omsk: Zapadno-Sibirskoye knizhnoye izdatel'stvo, 1970. – 43 p.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ В ПТИЦЕВОДСТВЕ И СВИНОВОДСТВЕ ПУТЕМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ СЕЛЕКЦИИ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДНК

¹В.Н.Афонюшкин – кандидат биологических наук, зав. сектором молекулярной биологии;
¹Н.А.Донченко – доктор ветеринарных наук, директор; ¹П.В.Бушмелева – кандидат ветеринарных наук; ст.н.с.; ²М.А.Барсукова – кандидат биологических наук, доцент;
³О.А.Фролова – мл.н.с.

¹Сибирский Федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, р.п.Краснообск (630501, Новосибирская область, р.п. Краснообск, e-mail: lisocim@mail.ru).

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет», г.Новосибирск (630039, г.Новосибирск, Добролюбова, 160, e-mail: rector@nsau.edu.ru).

³Красноярский научно-исследовательский институт животноводства – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра Красноярского научного центра Сибирского отделения РАН (660049, г. Красноярск, пр. Мира, 66, а/я 25524, e-mail: kristal_o@bk.ru).

Высокая интенсивность производства, большая концентрация животных и птицы на единицу площади, большие размеры сельскохозяйственных предприятий в Российской Федерации оказывают значительное влияние не только на рост инфицированности животных, но и создают предпосылки для появления новых инфекций, в т.ч. потенциально опасных для человека. Необходимы ассоциативные генетические исследования по поиску маркеров устойчивости к заражению вертикально-передающимися инфекционными агентами или более тщательный отбор племенных животных, не зараженных актуальными инфекционными агентами (возбудителями микоплазмозов и сальмонеллезов у птиц, возбудителями репродуктивно-респираторного синдрома, КЧС у свиней). Современные методы оценки генетического разнообразия следует шире использовать, в том числе при осуществлении контроля перемещения животноводческой продукции из эпизоотически неблагополучных хозяйств и вакцинных препаратов (на предмет источника происхождения соответствующей партии вакцины). Важное значение имеет молекулярно-генетический контроль, поставляемых из-за рубежа и отечественных племенных центров птиц и свиней. Выявление генетической неоднородности партии родительских форм заставляет усомниться в том, что эти животные действительно поступили из соответствующего племенного центра, а не являются выбракованными особями из эпизоотически не благополучного предприятия. Молекулярно-генетические методы оценки генетического разнообразия сельскохозяйственных животных представляют также интерес более утилитарный. Например, выявление контрафактных вакцин путем идентификации линий культур клеток или партий, развивающихся куриных эмбрионов, на которых производили культивирование вакцинных штаммов вирусов, играет важную роль в обеспечении инфекционной безопасности страны. Представляется перспективным адаптация анализа SNP к минимальному парку оборудования, доступного в ветеринарных и генетических лабораториях и учреждениях, а также разработка тестирования в формате point-of-care для наиболее востребованных тестов. Последнее направление развивается сегодня особенно быстро и тесно связано с информатизацией и применением различного рода бытовых мобильных устройств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: селекция, цыплята-бройлеры, свиньи, продуктивность, устойчивость к болезням, ПЦР, ДНК.

Современная селекционная работа подразумевает отбор животных и птиц, характеризующихся не только высокой продуктивностью [1], но и низким потреблением корма в расчете на единицу продукции [2]. Сочетание высокой продуктивности и высокоэффективной конверсии корма неизбежно сказывается либо на качестве продукции, либо на здоровье животных и птицы [3]. Высокая интенсивность производства, большая концентрация животных и птицы на единицу площади, большие размеры сельскохозяйственных предприятий – отличительные черты сельскохозяйственных предприятий РФ. Перечисленные

факторы оказывают значительное влияние не только на рост инфицированности животных, но и создают предпосылки для появления новых инфекций, в т.ч. потенциально опасных для человека [4]. Глобализация сельского хозяйства привела к снижению количества селекционных центров, сужению генетического разнообразия сельскохозяйственных животных и птицы, поэтому требования к селекционерам только возросли. Так, например, в ситуации, когда 1 петух из селекционного центра, в конечном итоге, влияет на свойства потомства численностью в 48 млн. бройлеров, следует признать, что выведение линии кур, устойчивой к за-

4. Косвенный отбор в направлении повышения уровня бессимптомного носительства инфекционных агентов, поражающих репродуктивную систему, и/или повышенную смертность потомства.

Рассмотрим четвертую причину снижения устойчивости к вертикально передающимся инфекциям.

Повышение устойчивости к инфекционному агенту, снижающему репродуктивную активность самок (например, у кур это ИБК, микоплазмозы, сальмонеллез, а у свиней репродуктивно-респираторный синдром, лептоспироз и т.д.), вовсе не обязательно будет сопровождаться снижением риска инфицирования. В таком случае самка, устойчивая к заболеванию, будет размножаться эффективнее, но останется источником заражения. Такая положительная мутация будет способствовать заражению восприимчивого поголовья и снижению репродуктивной активности этих особей. Таким образом, удельная доля генов носителей такой положительной мутации будет расти. В результате такой признак становится эволюционно-выгодным и закрепляется в популяции. Отсутствие контрселекции в этом направлении чревато накоплением вертикально передающихся инфекций в свиноводстве и птицеводстве, увеличением вклада племенных репродукторов в усиление эпизоотического неблагополучия на отечественных птицефабриках и свинокомплексах. Например, ассоциируемость сальмонеллезом с репродукторами наблюдается чаще, чем с кормами. Аналогичная ситуация наблюдается в птицеводстве с хламидиозом, микоплазмозом, везикулярным энтеритом, астровирусным нефритом, парвовирусным энтеритом и некоторыми другими инфекциями.

Анализируя существующие проблемы, очевидно, что необходимы ассоциативные генетические исследования по поиску маркеров устойчивости к заражению вертикально-передающимися инфекционными агентами или более тщательный отбор племенных животных, не зараженных актуальными инфекционными агентами (возбудителями микоплазмозов и сальмонеллезом у птиц, возбудителями репродуктивно-респираторного синдрома, КЧС у свиней).

Снижение гетерозиготности сельскохозяйственных животных и птицы (финальных гибридов), чревато, помимо уменьшения эффекта гетерозиса, уменьшением репертуара антиген-распознающих клеток и, соответственно, снижением устойчивости животных к инфекциям. Следовательно, необходимы методы, позволяющие прогнозировать эффективность скрещивания родительских форм, для получения потомства с высоким уровнем гетерозиготности, генов главного комплекса гистосовместимости и прогнозируемо высоким эффектом гетерозиса.

Важное значение имеет молекулярно-генетический контроль, поставляемых из-за рубежа и отечественных племенных центров птиц и свиней. Выявление генетической неоднородности партии родительских форм заставляет усомниться в том, что эти животные дей-

ствительно поступили из соответствующего племенного центра, а не являются выбракованными особями из эпизоотически не благополучного предприятия.

Молекулярно-генетические методы оценки генетического разнообразия сельскохозяйственных животных представляют также интерес более утилитарный. Например, выявление контрафактных вакцин путем идентификации линий культур клеток или партий, развивающихся куриных эмбрионов, на которых производили культивирование вакцинных штаммов вирусов, играет важную роль в обеспечении инфекционной безопасности страны. Например, нам уже доводилось выявлять наличие микоплазм в живых вакцинах и, в одном из таких случаев, партия вакцины оказалась контрафактной.

Случаи продажи продуктов животного происхождения и птицеводства из эпизоотически неблагополучных территорий, теоретически могли бы верифицироваться по выявлению генетической идентичности ДНК в продуктах питания с ДНК сельскохозяйственных животных из соответствующего хозяйства. Например, это актуально при африканской чуме свиней, когда очень часто с карантинруемых территорий вывозятся свиньи в соседние регионы, для последующей перепродажи. Собственно, именно этот фактор является основной причиной длительного эпизоотического неблагополучия РФ по АЧС.

В настоящий момент времени анализ копийности микросателлитных последовательностей в геномах млекопитающих является «золотым стандартом» для идентификации, паспортизации и генетического картирования [6,7]. Целый ряд коммерческих организаций предлагают уже готовые, валидированные тест-системы (например, StockMarks™ for Cattle Genotyping Kit, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4307480>), результаты которых принимаются основными мировыми регламентирующими агентствами (например, Международное Общество Генетики Животных, <http://www.isag.us>). Однако данный тип анализа имеет и свои слабые стороны. Он требует наличия дорогостоящего, как для покупки, так и для обслуживания, прибора для капиллярного электрофореза, высококвалифицированного персонала. Появление аллелей с нестандартными нуклеотидными последовательностями ведет к сложности их интерпретации и ошибкам.

Анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) на основе ПЦП в режиме реального времени в последнее время представляется привлекательной альтернативой [8]. Анализ SNP более прост по чтению вариаций, его легче стандартизовать. В тоже время, сегодня он осуществляется в основном с применением дорогостоящих микрочипов и сложных сканеров для их анализа. Например, это панели производства американской компании Illumina (BovineHD DNA Analysis Kit 777,000 SNPs; PorcineSNP60 DNA Analysis Kit v2 64,000 SNPs). В тоже время, представляется перспективным адаптация анализа SNP к минимальному парку оборудования, доступного в ветеринарных и генетических

лабораториях и учреждениях, а также разработка тестирования в формате point-of-care для наиболее востребованных тестов. Последнее направление развивается сегодня особенно быстро и тесно связано с информатизацией и применением различного рода бытовых мобильных устройств.

Разработка панели тестов для анализа SNP в качестве альтернативы анализу микросателлитной ДНК, при оценке чистопородности, контроле разведения представляет интерес и для прогнозирования эффекта гетерозиса как для подбора линий при создании кроссов кур, так и при индивидуальных скрещиваниях. По данным Amuzu-Aweh et al [9], анализ частот аллелей позволяет прогнозировать эффект гетерозиса с приемлемой точностью.

Таким образом, разработка низкобюджетных, мультиплексных методов выявления SNP для генетической паспортизации и определения хозяйственно ценных признаков сельскохозяйственных животных с возможностью адаптации к стандартным приборам для проведения real-time PCR представляет собой важную, практически ориентированную, задачу.

Важным преимуществом тестов на основе ПЦР в режиме реального времени является их количественность. С одной стороны, это позволяет использовать количественные критерии для выявления неспецифических реакций. С другой стороны – количественность аллельспецифических ПЦР позволяет изучать представленность изучаемых аллелей в пулированных образцах. Таким образом, становится возможным снижение себестоимости ассоциативных исследований в десятки и сотни раз, что позволит снизить и существенно расши-

рить поиск и верификацию молекулярно-генетических маркеров, ассоциируемых с устойчивостью к болезням, продуктивности, качеством продукции в условиях РФ.

Заключение. Развитие устойчивости к заболеванию вертикально-передающимися инфекциями (поражающими репродуктивную систему и/или вызывающую повышенную смертность молодняка) является эволюционно-выгодным, т.к. способствует увеличению удельной доли генов племенного животного – носителя инфекционного агента и должно сопровождаться закреплением данного признака в популяции.

Проведение селекции кур и свиней в направлении устойчивости к заражению санитарно- и эпизоотически значимыми инфекционными агентами следует считать обязательным элементом селекции хозяйственно-полезных признаков, и элементы этой селекции должны дополняться тщательной выбраковкой зараженных племенных животных и птицы.

Особенности эпизоотических процессов в условиях крупных птицеводческих и свиноводческих предприятий требуют поиска маркеров устойчивости к заражению соответствующими инфекционными агентами именно в условиях данных хозяйств, с последующей организацией маркерной селекции, выбраковкой племенных животных с неблагоприятными аллельными вариантами.

Современные методы оценки генетического разнообразия следует шире использовать, в том числе при осуществлении контроля перемещения животноводческой продукции из эпизоотически неблагополучных хозяйств и вакцинных препаратов (на предмет источника происхождения соответствующей партии вакцины).

Литература

1. Красота, В.Ф. Разведение сельскохозяйственных животных Текст / В.Ф.Красота, Т.Г.Джапаридзе, Н.М.Костомахин. – 5-е изд., перераб. и доп. - М.: КолосС, 2005. – 424 с.
2. Stender, David R. "Swine Feed Efficiency: Influence of Market Weight" / David R. Stender – 2012. Iowa Pork Industry Center Fact, 2012. – 9 Sheets .https://lib.dr.iastate.edu/ipic_factsheets/9.
3. Ресурсосберегающие технологии в молочном животноводстве и кормопроизводстве / В.М.Тараторкин, Е.Б.Петров. – М.: Колос, 2009. – 211 с.
4. Современные методы контроля сальмонеллеза / В.Н.Афонюшкин, Е.В.Дударева, Л.И.Малахеева [и др.] // Птицеводство. – 2008. – № 9. – С. 43–44.
5. Биологические проблемы животноводства в XXI веке / Л.К.Эрнст, Н.А.Зиновьева. – М.: РАСХН, 2008. – 81 р.
6. Association between multiple sclerosis risk-associated SNPs and relapse and disability a prospective cohort study / R. Lin [et al.] // Mult. Scler. – 2014. – Vol. 20, № 3. – P. 313-321.
7. Efficiency of microsatellite markers of the international standard panel for parentage control in German horse population / K.Wimmers [et al.] // Zuchtungskunde. – 1998. – Vol. 70, № 4. – P. 233-241.
8. Detection and characterization of SNP useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds / F.A.O. Werner [et al.] // Anim. Genet. – 2004. – № 35. – P. 44-49.
- Assessing SNP markers for assigning individuals to cattle population / R.Negrini [et al.] // Animal Genetics. – 2008. – № 40(1). – P. 18-26.
9. Prediction of heterosis using genome-wide SNP-marker data: application to egg production traits in white Leghorn crosses / E.N.Amuzu-Aweh [et al.] // Heredity. – 2013. – № 111. – P. 530–538, doi:10.1038/hdy.2013.77.

THE THEORETICAL ASPECTS OF ENSURING INFECTIOUS WELL-BEING IN POULTRY FARMING AND SWINE BREEDING BY USING BREEDING METHODS AND MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF DNA

¹Afonyushkin V.N. – Candidate of Biological Sciences; ¹Donchenko N.A. – Doctor of Veterinary Sciences; ¹Bushmeleva P.V. – Candidate of Veterinary Sciences; ²Barsukova M.A. – Candidate of Biological Sciences; ³Frolova O.A. – Research Assistant.

¹Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk (e-mail: lisocim@mail.ru).

²Federal State Budget Educational Institution of Higher Education Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk (e-mail: rector@nsau.edu.ru).

³Krasnoyarsk Research Institute of Animal Husbandry – Separate Division of the Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center” of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (e-mail: kristal_o@bk.ru).

The high intensity of production, the high concentration of animals and poultry per unit area, the large size of agricultural enterprises in the Russian Federation – all have a significant impact not only on the growth of animal infection but also create the prerequisites for the emergence of new infections, including potentially dangerous for humans. Associative genetic studies are needed to find markers of resistance to infection by vertically transmitted infectious agents or to more carefully select breeding animals that are not infected with actual infectious agents (pathogens of mycoplasmosis and salmonellosis in birds, pathogens of the reproductive and respiratory syndrome, swine fever in pigs). Modern methods for assessing genetic diversity should be used more widely, including when controlling the movement of livestock products from epizootic unsuccessful farms and vaccine preparations (for the source of origin of the appropriate batch of vaccine). The molecular genetics control of the breeding centers of birds and pigs both domestic and supplied from abroad is of great importance. Identifying the genetic heterogeneity of the party of parental forms makes us doubt that these animals really came from the corresponding tribal center, and are not rejected individuals from an epizootically unsuccessful enterprise. Molecular genetics methods for estimating the genetic diversity of agricultural animals are of more utilitarian interest. For example, the identification of counterfeit vaccines by identifying cell culture lines or lots of developing chick embryos on which vaccine strains of viruses were cultivated plays an important role in ensuring the country's infectious safety. It seems promising to adapt the SNP analysis to the minimum park of equipment available in veterinary and genetic laboratories and institutions, as well as the development of point-of-care testing for the most popular tests. The latter direction is developing especially quickly and is closely connected with informatization and application of various kinds of household mobile devices.

KEYWORDS: selection, broiler chicken, swine, productivity, resistance to disease, PCR, DNA.

References

1. Krasota, V.F. Razvedenie sel'skokozyajstvennykh zhivotnykh [Farm animals breeding]. / V.F.Krasota, T.G.Dzhaparidze, N.M.Kostomahin. – 5-e izd., pererab. i dop. - M.: KolosS, 2005. – 424 p.
2. Stender, David R. "Swine Feed Efficiency: Influence of Market Weight" / David R. Stender. – Iowa Pork Industry Center, 2012 Fact Sheets. 9. https://lib.dr.iastate.edu/ipic_factsheets/9.
3. Resursosberegajushhie tehnologii v molochnom zhivotnovodstve i kormoproizvodstve [Resource-saving technologies in dairy cattle breeding and fodder production] / V.M.Taratorkin, E.B.Petrov. – M.: Kolos, 2009. – 211 p.
4. Sovremennye metody kontrolja salmonelleza [Modern methods of controlling salmonellosis] / V.N. Afonjushkin, E.V. Dudareva, L.I. Malaheeva [et al.] // Pticevodstvo. – 2008. – №. 9. – P. 43–44.
5. Biologicheskie problemy zhivotnovodstva v XXI veke [Biological problems of animal husbandry in the 21st century] / L.K.Jernst, H.A.Zinoveva. – M.: RASHN, 2008. – 81 p.
6. Association between multiple sclerosis risk-associated SNPs and relapse and disability a prospective cohort study / R. Lin [et al.] // Mult. Scler. – 2014. – Vol. 20, № 3. – P. 313-321.
7. Efficiency of microsatellite markers of the international standard panel for parentage control in German horse population / K. Wimmers [et al.] // Zuchtungskunde. – 1998. – Vol.70, № 4. – P. 233-241.
8. Detection and characterization of SNP useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds / F.A.O.Werner [et al.] // Anim. Genet. – 2004. – № 35. – P. 44-49.
- Assessing SNP markers for assigning individuals to cattle population / R.Negrini [et al.] // Animal Genetics. – 2008. – №. 40(1). – P. 18-26.
9. Prediction of heterosis using genome-wide SNP-marker data: application to egg production traits in white Leghorn crosses / E.N.Amuzu-Aweh [et al.] // Heredity. – 2013. – № 111. – P. 530–538, doi:10.1038/hdy.2013.77.

УЧРЕДИТЕЛЬ И ИЗДАТЕЛЬ:

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ - ВНИВИ»).

РЕДАКЦИОННО-ЭКСПЕРТНЫЙ СОВЕТ

Председатель редакционно-экспертного совета –
К.Х. Папуниди – доктор ветеринарных наук, профессор.

Н.М. Василевский – доктор ветеринарных наук, профессор.

В.В. Евстифеев – доктор биологических наук.

Г.В. Коныхов – доктор биологических наук, профессор.

Х.Н. Махаев – доктор ветеринарных наук, профессор.

Э.И. Семенов – кандидат биологических наук.

В.И. Степанов – кандидат ветеринарных наук.

А.Н. Чернов – доктор биологических наук.

Журнал включен в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

Ответственный секретарь – Т.Ю. Скурко

Переводчик – Ю.Л. Бикмухаметова

Корректор – Ю.Л. Бикмухаметова

Верстка – Р.З. Бухмина

С предложениями о размещении РЕКЛАМЫ звоните по телефону (843) 239-53-26

Подписной индекс: в Российской Федерации

«Объединенный каталог. Пресса России.

Газеты и журналы» – 43596

Печатается с макетов, представленных авторами.

Адрес редакции: 420075, г. Казань, Научный городок-2, ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Тел./факс: (843) 239-53-26 (редакция),
239-53-20 (приемная),

e-mail: vetvrach-vnivi@mail.ru, www.vetvrach-vnivi.ru

Подписано к печати 22.08.2018. Тираж 1350 экз.

Зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. (Роскомнадзор).

Свидетельство ПИ № ФС 77-47773 от 16 декабря 2011 г.

Отпечатано в типографии «КОНВЕРС», г. Казань, ул. Сары Садыковой, 61.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор **Андрей Иванович Никитин** – кандидат ветеринарных наук, директор ФГБНУ "ФЦТРБ-ВНИВИ".

Ф.И. Василевич – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, ректор МГАВМиБ им. К.И.Скрябина (Москва, Россия).

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

А.С. Донченко – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, председатель ГНУ «Сибирское региональное отделение РАН» (Краснообск, Россия).

И.М. Донник – доктор биологических наук, профессор, академик РАН, вице-президент РАН (Екатеринбург, Россия).

А.Н. Панин – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия).

Р.Х. Равилов – доктор ветеринарных наук, профессор, ректор КГАВМ им. Н.Э.Баумана (Казань, Россия).

М.В. Розовенко – доктор ветеринарных наук, профессор, главный советник Аппарата Комитета Совета Федерации по аграрно-продовольственной политике и природопользованию (Москва, Россия).

А.Я. Самуйленко – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН (пос. Биокомбинат, Московская область, Россия).

Ф.С. Сибатуллин – доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент АН РТ, депутат Государственной думы РФ (Казань, Россия).

А.М. Смирнов – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН (Москва, Россия).

В.В. Сочнев – доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой, Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия (Нижний Новгород, Россия).

А.А. Стекольников – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, ректор Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины (Санкт-Петербург, Россия).

Б.В. Уша – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой МГУПП (Москва, Россия).

С.В. Шабунин – доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, директор ВНИВИПФит (Воронеж, Россия).

Gormley E.P. – PhD (Genetics) (Дублин, Ирландия).

Harkiss G. – BSc, PhD (Эдинбург, Соединенное Королевство).

Kasem Soyong – BSc, PhD, Associate professor, президент ассоциации сельскохозяйственных технологий Юго-Восточной Азии (Бангкок, Таиланд).