

Изучение антигенной активности вирусосодержащего материала, полученного при разных температурах культивирования показало, что гемагглютинирующая и комплементсвязывающая активности практически не отличались и составляли 1:32-64 и 1:16-32, соответственно. Поддержание рН в пределах 7,2-7,5 в течение 48-72 часов культивирования стационарным методом при 34°C обеспечивало максимальное накопление вируса до $6,81 \pm 0,12 \text{ lg TCD}_{50}/\text{см}^3$, или $7,5-8,7 \text{ lg MLD}_{50}/\text{см}^3$.

Культивирование вируса роллерным методом в культурах клеток ВНК-21/13, ПСГК-60 и ПС при отработанных оптимальных параметрах выращивания: скорость вращения – 12-15 об/мин, оптимальная доза заражения $0,01 \text{ MLD}_{50}/\text{кл.}$, температура – 34°C, рН 7,2-7,5 позволяло получать через 48-72 часа вирусное сырье с инфекционной активностью $8,53 \pm 0,21 \text{ lg MICLD}_{50}/\text{см}^3$ и с активностью в РПГА - 1: 64-128, в ТФ ИФА – 1:625-3125. Применение роллерной установки, разработанной во ВНИИВВиМ, для выращивания вируса ЛДР, обеспечивало одновременно получение 48 л вирусного сырья.

При проведении электронно-микроскопических исследований инфицированных культур клеток показано, что в области контакта вирусных частиц с клетками происходит утолщение клеточной мембраны и ее прогиб. Уже через 10 минут адсорбции при 37°C происходит частичное слияние клеточной мембраны с оболочкой вируса. Так же в период адсорбции обнаруживали вирусные частицы во внутриклеточных вакуолях. Установлено, что большинство чувствительных клеток инфицируются в период адсорбции вируса.

Выявление антигенов вируса в процессе его репродукции проводили непрямым методом флуоресцирующих антител, непрямым и прямым методом ИФА на монослое с использованием специфической к ЛДР и контрольной сывороток овец, моноклональных антител к нуклеопротеину (NP) вируса ЛДР.

Показано, что уже через 6-9 часов после заражения культуры клеток удается выявить антигены вируса, в частности NP, в перинуклеарной зоне цитоплазмы в виде отдельных гранул, увеличение числа которых пропорционально сроку культивирования. Через 30 часов инкубирования антиген выявляется по всей поверхности цитоплазмы практически в 50% инфицированных клеток.

Заключение. Таким образом, полученные результаты исследования показали, что вирус ЛДР штамм «1974- ВНИИВВиМ» накапливается в перевиваемых культурах клеток ПС, ПСГК-60, МДВК в высоких титрах инфекционной ($8,53 \pm 0,21 \text{ lg MICLD}_{50}/\text{см}^3$) и антигенной (в РПГА - 1: 64-128) активности и может быть использован для изготовления эффективной безопасной инактивированной вакцины против ЛДР.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 11-08-01245-а

Литература. 1. Книзе, А.В., Дмитренко Н.В., Стрижаков А.А. Эволюция эпизоотической ситуации по лихорадке долины Рифт // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропоозоозов: труды Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 45-летию института 24-26 сентября / ГНУ ВНИИВВиМ.-Покров, 2003. Часть 1.-С.93-98. 2. Meegan, J. M., Bailey C.L. (1989) Rift Valley fever: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology, vol. 4, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Rationh, Florida, USA, 52-76. 3. The Deadly Dozen: 12 Diseases Global Warming Incubates/ From Lyme Disease to Ebola Virus, The World Is Getting Sicker!/- [Электронный ресурс]. – 2008. – Режим доступа: <http://www.thedailygreen.com/environmental-news/latest/deadly-dozen-global-warming-47100803#ixzz1UdUAav4g>. 4. Балышева В.И., Кошелева А.А., Жестеев В.И. Клеточные культуры в биотехнологии производства инактивированных вакцин Актуальные проблемы ветеринарной патологии и морфологии животных: Мат. междунар. науч.-произв. конф., посвященные 100-летию Авророва. - Воронеж, 22-23 июня 2006. – С.1027-1030.

УДК 619:616.34

РОЛЬ АТИПИЧНЫХ ЭШЕРИХИЙ И ГНИЛОСТНЫХ БАЦИЛЛ ПРИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Бовкун Г.Ф.

ФГОУ ВПО «Брянская государственная сельскохозяйственная академия», г. Брянск

Высокий уровень высеваемости атипичных эшерихий (24,6%), гнилостных бацилл (16,09%) от больных с поражением органов пищеварения свидетельствовал об их диареегенном действии условно патогенного характера, усугубляющем воспалительный ответ.

The high level of sowing ability of hemolytic putrefactive bacilli 16,09%, atypical Escherichia coli -24,6% from sick calves with affection of various parts of alimentary canal testifies to their diarreagenic action of conditionally pathogenic nature redoubling the inflammatory response.

Введение. Роль фекальной микрофлоры как ведущего этиологического фактора неонатальных диарей у телят установлена многими исследователями [1,4]. Если этиологическое участие таких условно патогенных энтеробактерий как цитробактеры, протеи, клебсиеллы при диарейных заболеваниях у телят считают общепризнанными [3], то роль атипичных эшерихий (лактозонегативных, гемолитических), гнилостных бацилл подлежит изучению [2].

Цель работы: изучение спектра микрофлоры фекалий телят при диарейных заболеваниях, мониторинговые исследования по выделению атипичных эшерихий, гнилостных бацилл.

Материалы и методы. Диарейные заболевания у 311 больных телят диагностировали по топике поражения желудочно-кишечного тракта, используя общепринятые клинические методы. После установления клинического диагноза было проведено бактериологическое исследование 140 проб фекалий больных в течение 2-х часов с момента забора материала. Разведения фекалий 1:10 сеяли на среду Эндо, сывороточный, кровяной, сывороточно-теллуритовый, питательный агар. Возбудителей кишечных инфекций идентифицировали согласно действующих методических указаний по лабораторной диагностике колибактериоза, сальмонеллеза, стафилококкоза и смешанной кишечной инфекции. Остальные микроорганизмы идентифицировали по культуральным, морфологическим, ферментативным свойствам. При необходимости определяли

гемолитическую активность, вирулентность подтверждали биопробой. Пробы фекалий с примесями крови обследовали на наличие криптоспоридий микроскопией мазков. Антигены ротавирусов обнаруживали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) согласно наставлению по применению набора компонентов.

Результаты. Клиническое обследование 311 больных (таблица 1) свидетельствовало о доминировании гастроэнтероколитной диареи – 41,16%. Тяжелую форму энтероколитной диареи с токсикозом, дегидратацией организма, почечной недостаточностью разной степени выраженности регистрировали в экологически неблагополучном хозяйстве, почвы и пастбища которого сильно загрязнены радиоцезием с плотностью 49,4 – 43,9 Ки/км².

Таблица 1 – Нозологические формы диарейных заболеваний

№ п.п.	Клинический диагноз	Кол-во больных	Возраст, дни	% выявлен
1.	Гастроэнтероколит	128	1-10	41,16
2.	Токсическая диспепсия	100	3-5	32,16
3.	Простая диспепсия	50	1-5	16
4.	Энтероколит	15	30	4,56
5.	Катаральный гастроэнтероколит	10	48-90	3,2
6.	Геморрагический гастроэнтероколит	8	30-90	2,58

В нозологической структуре диарейных заболеваний телят токсическая диспепсия с топикой поражения сычуга, тонкого, толстого отделов кишечника, умеренной диареей, токсикозом, эксикозом гипоосмотического типа, занимала второе место и выявлялась у 32,16% больных. Удельный вес простой диспепсии с клиникой функциональных расстройств в сычуге и тонком кишечнике составлял 16%.

Процент выявления энтероколита с топикой поражения тонкого, толстого отделов, прямой кишки и выделением примесей слизи, крови – 4,56. Катаральным гастроэнтероколитом средней степени тяжести болели телята в возрасте 48-90 дней, заболевание было выявлено у 3,2% больных. Доля геморрагического энтероколита с локализацией воспаления в сычуге, тонком, толстом отделах и прямой кишке, диареей с примесью крови - 2,58%.

Микробная этиология диареи была расшифрована у 48,57% обследованных телят (рис.1).

Доминирующим видом являлся возбудитель эшерихиоза, ассоциированный с ротавирусами, частота выделения 34,48%. Выделенные возбудители были специфичны тяжелой форме гастроэнтероколитной диареи с дегидратацией организма гипоосмотического типа разной степени с последующей олигурией, токсикозом, гемодинамическими расстройствами по признаку гипотермии.

Удельный вес атипичных эшерихий, характеризующихся пониженной ферментативной активностью лактозы или лактозонегативных, выделенных как в чистой культуре при простой диспепсии, так и в ассоциации с другими микроорганизмами, при токсической диспепсии, катаральном гастроэнтероколите, энтероколите составлял 26,4%.

Частота обнаружения гемолитических гнилостных бацилл на фоне криптоспоридий, в ассоциации с энтеробактериями – 16,09%.

Не менее важное значение при энтероколите у молодняка крупного рогатого скота имели криптоспоридии, частота их обнаружения на фоне гемолитических гнилостных бацилл, лактозонегативных эшерихий – 14,7%.

Определенное значение в этиологии диарей имела пролиферация в кишечнике таких микроорганизмов как *Ps. aeruginosa* (9,2%), *Proteus vulgaris* (6,89%), *Klebsiella pneumonia* (3,44%), *Citrobacter freundii* (3,44%). Спектр ассоциаций условно патогенных энтеробактерий, соответствующий смешанной кишечной инфекции [2], был установлен только у одного больного теленка (1,47%).

Следствием проявления активной пролиферации *Ps.aeruginosa* можно считать геморрагический гастроэнтероколит у телят старшего возраста. По нашим данным *Ps.aeruginosa* обладала только диареегенным действием.

Протеи высевали в ассоциации с атипичными эшерихиями, энтеробактериями, гемолитическими гнилостными бациллами.

Удельный вес в этиологии токсической диспепсии, катарального гастроэнтероколита таких видов энтеробактерий как *Klebsiella pneumonia* и *Citrobacter freundii* составлял 3,44%. Диареегенное действие эти микроорганизмы проявляли только в ассоциации с гнилостными гемолитическими бациллами, атипичными эшерихиями, *Proteus vulgaris*.

Первичным скринингом 23 культур атипичных эшерихий, проведенным на основе усваивания лактозы, выявлены 12 культур слабо ферментирующих лактозу и 11 культур лактозонегативных.

Как показали наши исследования, эшерихии с пониженной ферментативной активностью лактозы, на агаре Эндо, образовывали розовые или бесцветные, но с окрашенным центром, средних размеров, колонии S – формы. Бактерии, формирующие такие колонии, по морфологическим и ферментативным свойствам соответствовали виду *E.coli* и были авирулентными для белых мышей.

Пролиферацию эшерихий с пониженной ферментативной активностью лактозы отмечали у 100% больных простой диспепсией, а при катаральном гастроэнтероколите в ассоциации с такими условно патогенными энтеробактериями, как *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris* и гемолитическими гнилостными бациллами.

Лактозонегативные эшерихии на агаре Эндо формировали бесцветные, средних размеров, колонии S – формы, не имели морфологических отличий от вида *E.coli*, были авирулентными для белых мышей, слабо продуцировали индол, замедленно, в течение 4-5 суток, ферментировали маннит. Отсутствие способности к ферментации мочевины, молоната, цитрата Симмонса, образованию сероводорода также подтверждало принадлежность лактозонегативных культур к виду *E.coli*.

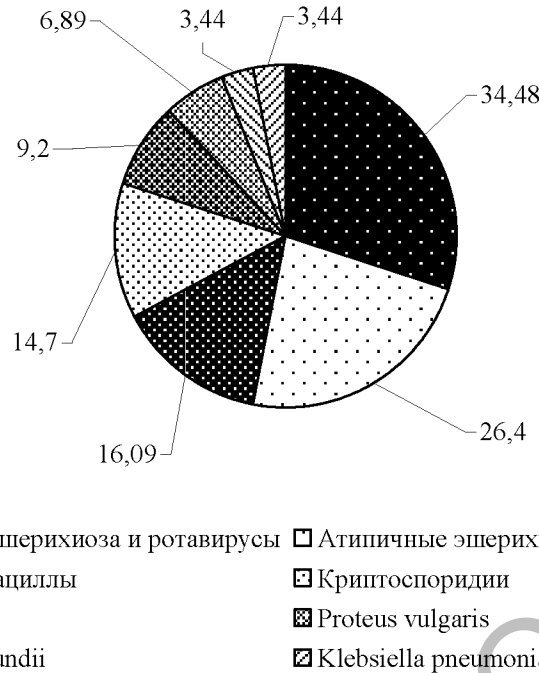


Рисунок 2 – Спектр выделенной микрофлоры у больных телят (%).

Лактозонегативные эшерихии высевали от 45,4% больных энтероколитом при паразитировании криптоспоридий, от 37,5% больных токсической диспепсией но в ассоциации с *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, гемолитическими гнилостными бациллами.

Частота обнаружения гемолитических гнилостных бацилл, идентифицированных как сенная (*Bac.subtilis*) и картофельная (*Bac.megaterium*) палочки составляла 16,09%.

Bac.subtilis образовывала складчатые колонии с роением из грамположительных крупных палочек, расположенных цепочками, образующих эндоспоры овальной формы, расщепляющих глюкозу без газа, а на кровяном агаре - истинный гемолиз. *Bac.megaterium* - грамположительная короткая овоидная, образующая овальные эндоспоры, расщепляющая глюкозу без газа, росла в виде крупных плоских колоний, на кровяном агаре с зоной β-гемолиза.

Выделенные культуры гемолитических гнилостных бацилл вызывали гибель белых мышей на 5-7 сутки, что было обусловлено их метаболической (образование аминов, аммиака) и гемолизирующей активностью.

Высокий уровень высеваемости гнилостных бацилл (54,55%) отмечали при энтероколите на фоне паразитирования криптоспоридий. При катаральном гастроэнтероколите они содержались в составе 50% выделенных смешанных культур. При токсической диспепсии процент выделения в ассоциации с энтеробактериями составлял 12,5.

Метаболическая активность гнилостных бацилл, обусловленная образованием в анаэробных условиях таких ядовитых соединений как амины, аммиак, могла способствовать развитию воспаления слизистой сычуга, кишечника, а гемолизирующая активность – усилить воспаление и диареегенный эффект. Механизм диарей под действием гемолизина, изученный А.В. Патон, J. C. Патон, S.J. Elliot [5], заключается в формировании каналов в мембране эритроцитов, нарушающих вход – выход ионов через плазматическую мембрану, что приводит к образованию метаболитов арахидоновой кислоты, нарушающих секрецию ионов и возникновению инфекционно-воспалительного типа диарей.

Заключение. Выполненный комплекс клинико-микробиологических исследований при диарейных заболеваниях у телят позволил установить:

- приоретное значение гастроэнтероколитной диареи вирусно-бактериальной этиологии;
- диареегенный эффект функционального характера на фоне колонизации кишечника эшерихиями с пониженной ферментативной активностью;
- гастроэнтеральную патологию, обусловленную ассоциациями атипичных эшерихий, в том числе лактозонегативных, условно-патогенных энтеробактерий, гнилостных бацилл, криптоспоридий.

Полиморфизм клинической картины диарейных заболеваний у молодняка крупного рогатого скота на фоне ассоциаций представителей факультативной кишечной микрофлоры, в составе которой были эшерихии, слабо ферментирующие лактозу и лактозонегативные, гемолитические гнилостные бациллы, свидетельствовал об условно патогенном характере их действия, усугубляющим воспалительный ответ.

Литература. 1. Ковальчук Н.М. Эколого-микробиологический мониторинг эшерихиоза новорожденных телят в современных условиях Восточной Сибири: автореф. дис.: канд.вет.наук/ Н.М. Ковальчук; МГАВМ.-М.,2004. - 39 с. 2. Крылов В.П. Проблемы классификации дисбиоза кишечника/ В.П. Крылов, В.Г. Орлов//Пробиотические микробы: сб.матер.конфер.-М., 2002. - С.30. 3. Методические указания по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемые патогенными энтеробактериями / Л.С. Каврук [и др.] // М., 1999.- 16с. 4. Шахов А.Г. Этиология и

профилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят, поросят/ А.Г. Шахов// Ветеринарная патология.- 2003.- N2(6). – С. 25-28. 5. Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea/ S.J Elliot, A.W. Paton, J.C.Paton// Jbid.-2001.-V.69.- P. 6651 -6659.

УДК 619:615.361:611.018.46:636.028

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ОЦЕНКЕ АКТИВНОСТИ ВАКЦИН ПРОТИВ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Бусол В.А., Костенко С.А., Тонская Т.Г., Драгулян М.В.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев, Украина

Проведено изучение влияния иммуногенов вируса лейкоза крупного рогатого скота на цитогенетические показатели костного мозга в динамике иммуногенеза. Метод цитогенетических исследований клеток костного мозга белых мышей целесообразно использовать для оценки безопасности, а также иммуногенных свойств специфических препаратов ретровирусного происхождения.

In this article presents results on the effect of immunogens leukemia virus in cattle on cytogenetic indices of bone marrow in immunogenesis. The method of cytogenetic studies of bone marrow cells of white mice should be used to assess the safety, as well as immunogenic properties of specific drugs retroviral origin.

Введение. В последнее время исследователи уделяют особое внимание изучению кариопатического действия вакцинных препаратов, которые вызывают в организме увеличение количества клеток с цитогенетическими сдвигами [0,0,0,0]. Согласно концепции Ф.Бернета, такого рода изменения в иммунокомпетентных клетках играют важную роль в процессе формирования клонов иммуноцитов в костном мозге, которые составляют основную массу В-лимфоцитов и их предшественников [0]. В процессе иммуностимуляции перестраивается по-особому В-система иммунитета организма [0]. В основном органе формирования клеток крови – костном мозге, при условии активного действия антигена и составных вакцинных препаратов могут возникать кратковременные или продолжительные структурные изменения генома иммунокомпетентных клеток на ранних этапах их развития [0]. При действии определенных вакцин на культуры клеток (in vitro) увеличивается частота митозов и клеток с округлыми и патологическими ядрами, а также с наличием других изменений [0,0].

Анализ данных литературы свидетельствует об отсутствии использования метода оценки цитогенетических изменений лимфоидных клеток костного мозга, первичного органа кроветворения, под действием иммуногенов ретровирусного происхождения.

Целью наших исследований было изучить влияние иммуногенов вируса лейкоза крупного рогатого скота, как представителя ретровирусов, на цитогенетические показатели костного мозга мышей в динамике развития иммуногенеза и оценить целесообразность использования этого метода в вакцинологии ретровирусной инфекции.

Материалы и методы. Для определения цитогенетических изменений в иммунокомпетентных клетках костного мозга под воздействием инактивированных вакцин против лейкоза крупного рогатого скота использованные сконструированные нами иммуногены – «Профилейк 3» и «Профилейк 4», которые отличаются методологическим подходом конструирования. Опыт проводили на трех группах белых мышей (по 15 гол. в каждой). Каждому животному опытных групп вводили соответствующие вакцины в дозе 0,1 см³ двукратно с интервалов 7 дней. Животные контрольной группы оставались интактными. Цитогенетические исследования клеток костного мозга бедренной кости проводили по методике [0] на 7-ой, 14-ый, 30-ый и 60-ый день после первого введения иммуногена. При оценке цитогенетических изменений учитывали видовой набор хромосом (2n), наличие клеток с микроядрами (МЯ), двумя ядрами (ДЯ) и с признаками апоптоза (АП), а также определяли митотический индекс (МИ). Оценку изменений проводили на 3000 клетках. Расчет частоты метафаз (%) с хромосомными aberrациями (ХА) определяли в соответствии с общим количеством метафазных пластинок.

Результаты. В период опыта (60 дней) экспериментальные животные оставались клинически здоровыми и не отличались по физиологическому состоянию и поведению от мышей контрольной группы. У мышей на месте введения иммуногенов и изотонического раствора натрия хлорида изменений не обнаружено.

При оценке цитогенетических характеристик клеток установлено, что под действием обеих инактивированных вакцин против лейкоза крупного рогатого скота у большинства иммуноцитов красного костного мозга мышей опытных и контрольных групп сохранялся нормальный видовой набор хромосом (2n=40) в течение всего периода эксперимента.

Как видно по данным таблицы, у мышей, иммунизированных вакциной «Профилейк 3» на 7 день в костном мозге, по сравнению с животными контрольной группы, увеличивалось количество клеток с МЯ в 1,8 раза, метафаз с ХА – в 47,2, а МИ – 1,4 раза. В то же время уменьшалось количество ДЯ клеток в 1,6 раза и АП – в 2,2 раза. Функция костного мозга мышей второй группы изменялась в другом направлении. На 7 день после инокуляции вакцины «Профилейк 4» увеличилось количество клеток с МЯ в 3,3 раза и метафаз с ХА – в 34,9, а МИ в 1,5 раза. В отличие от мышей, привитых первым иммуногеном при введении второго, - количество ДЯ клеток в костном мозге не уменьшалось, а увеличивалось в 2,2 раза и оставалось почти на одинаковом уровне до конца эксперимента. Такие различия могут быть обусловлены структурой иммуногена.

В конструировании препарата «Профилейк 4» носитель антигена был меньших размеров, что влияло на функцию костного мозга по количественным показателям клеток апоптозной группы. В полях зрения исследуемых препаратов из костного мозга мышей второй группы на начальном этапе опыта не обнаруживали клетки в состоянии апоптоза.

Первое исследование клеток костного мозга показало, что у большинства мышей обеих опытных групп в делящихся клетках костного мозга состояние слипания хромосом развивалось у 0,83±0,4% от МИ, что