

При изучении эффективности ранней диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота методом ИФА сыворотки крови от исследуемых животных проверили в ИФА. В опыте использовали 76 сывороток крови от опытных групп животных, в качестве контроля использовали 5 сывороток крови здоровых коров, 3 сыворотки молодняка крупного рогатого скота гипериммунизированного гиподерматозным антигеном, и эмбриональную сыворотку крови крупного рогатого скота. ИФА (непрямой твердофазный неконкурентный). Антигены фиксировали на иммунологических панелях в дозе 1-1,5 мкг на лунку в КББ pH-9,3. Конъюгатом служили кроличьи IgG против IgG быка, меченные пероксидазой. Реакцию учитывали на спектрофотометре АИФ-340Ц при 492 нм.

Антиген разводили 1:100, сыворотки крови разводили 1:25. Установлено, что при исследовании крови животных, спонтанно инвазированных личинками подкожного овода, в ИФА было выявлено 18 сывороток крови с превышением оптической плотности в 1,49-2,53 раза по сравнению с нормальной сывороткой (больные животные). В 58 образцах превышение оптической плотности по сравнению с нормальной сывороткой составило 1,09-1,41 (здоровые животные).

Для подтверждения результатов иммуноферментного анализа и установления его диагностической эффективности (чувствительность и специфичность) в апреле-августе провели обследование животных на наличие клинических признаков заболевания гиподерматозом и сравнили их с данными, полученными при постановке иммуноферментного анализа.

У животных, отрицательно реагировавших в ИФА, клинических признаков гиподерматоза выявлено не было, тогда как у животных, положительно реагировавших в ИФА, при визуальном осмотре были обнаружены гиподерматозные желваки, с интенсивностью инвазии 1-8 личинок на животном. Специфичность и чувствительность экспериментального образца антигена для выявления спонтанно инвазированного личинками подкожного овода крупного рогатого скота в ИФА при гиподерматозе крупного рогатого скота составила около 100%.

Получено уведомление о положительном результате предварительной экспертизы на заявку на выдачу патента «Способ получения антигена для диагностики гиподерматоза и способ диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота» (авторы Якубовский М. В., Степанова Е. А., Трус И. А., Мяцова Т. Я.) от 14.03.2008 № а20080300.

Заключение. Разработан высокоэффективный антиген из личинок *Hypoderma bovis* и оптимизированы параметры диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота методом ИФА с использованием сывороток крови или проб молока. Специфичность и чувствительность экспериментального образца антигена для выявления спонтанно инвазированного личинками подкожного овода крупного рогатого скота в ИФА при гиподерматозе составила около 100%.

Литература. 1. Грунин, К.Я. Подкожный овод (*Hypodermatidae*). Фауна СССР / К.Я. Грунин – М., 1962. – 237 с. 2. Калинина, Н.Г. Динамика иммунобиологических реакций при гиподерматозе крупного рогатого скота / Н.Г. Калинина // Науч. – технический бюлл. ВНИИ ветеринарной энтомологии и арахнологии. – Тюмень, 1978. – вып. 14. – С.62-71. 3. Маврин, Н.А. Антигены из личинок *Hypoderma lineatum* для иммуноферментного анализа / Н.А. Маврин, А.А. Непоклонов, В.С. Богданова, А.Д. Забережный, Т.В. Гребенникова // Ветеринария. – 2007. – №9. – С. 11 – 14. 4. Непоклонов, А.А. Оздоровление стад крупного рогатого скота от гиподерматоза / А.А. Непоклонов // Ветеринария – 2002 – №10 – С. 3 – 6. 5. Практикум по вирусологии / Под редакцией В.М. Жавненко. – Мн.: ДизайнПРО, 1998. – С. 102. 6. Степанова, Е.А. Иммунодиагностика, эпизоотология и ранняя профилактика гиподерматоза крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 03.00.19 / Е.А. Степанова. – Минск, 2004. – 21 с. 7. Степанова, Е.А. Новые способы диагностики и профилактики гиподерматоза крупного рогатого скота / Е.А. Степанова, М.В. Якубовский, Т.Я. Мяцова // Сборник статей Международной научно-практической конференции, Воронеж, 22 – 23 июня 2006 года. – Воронеж: «Научная книга», 2006. – С. 377-380. 8. Фишалевиц, М.А. Распространение оводов, паразитирующих на крупном рогатом скоте и лошадях в Белорусской ССР / М.А. Фишалевиц // Труды ВНИИВС, 1962. – С. 44-47. 9. Ямов, В. Ранняя диагностика гиподерматоза крупного рогатого скота с помощью реакции непрямой гемагглютинации / В. Ямов, В. Потемкин, Н. Калинина // Науч.-технический бюлл. ВНИИ ветеринарной энтомологии и арахнологии. – Тюмень, 1976. – вып. 7. – С. 44 – 50.

УДК 636.7:612.336.3:612:616.995.1

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ ЭНТЕРОБИОЦЕНОЗА ПЛОТОЯДНЫХ ПРИ МОНО- И МИКСТИНВАЗИЯХ

Субботин А.М., Сандул А.В., Субботина И.А., Корсаков В.В.

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

Изменения в составе микрофлоры желудочно-кишечного тракта собак, больных моноинвазиями и ассоциативными паразитозами, по сравнению с показателями здоровых животных характерны для дисбактериоза и происходят в сторону уменьшения количества нормальной микрофлоры кишечника (бифидобактерий и лактобактерий) и увеличения содержания транзиторных микроорганизмов: аэробных бацилл, микромицет, протей, клостридий, стрептококков и стафилококков.

Variations in intestinal microflora of dogs with mono- and mixed infestations, its comparative evaluations with healthy conditions are indicative of reduction of microflora (bifidobacteria and lactobacteria) and increase of aerobic bacilli, micromicetes, proteus spp, staphylococci, streptococci.

Введение. Организм животного в процессе эволюции превратился в экологическую среду как для полезных, так и для патогенных видов бактерий, вирусов, микромицет, простейших, гельминтов и членистоногих на разных стадиях их развития. Поселение многих паразитических организмов меняет создавшийся статус, то есть влияет

на течение и исход процесса. Крупные формы сильно травмируют ткани и органы, делая их доступными для проникновения патогенных микроорганизмов и в то же время препятствуют нормальному заселению органа полезными представителями микрофлоры. При этом смешанные паразитозы протекают тяжелее, с меньшей успешностью лечения, чем болезни, обусловленные одним возбудителем. Это происходит по той причине, что совместное действие паразитов оказывает сильнейшее влияние на обменные процессы в организме, состав крови, снижает иммунную реактивность. на фоне этого происходят серьезные нарушения в функционировании различных органов и систем организма [7].

Одним из показателей таких нарушений является дисбактериоз кишечника, который регистрируется при многих заболеваниях, в том числе и паразитарной этиологии. Дисбактериоз характеризуется изменением соотношения различных видов бактерий, нарушением усвояемости продуктов пищеварения, изменением ферментативных процессов, расщеплением физиологических секретов [3, 4].

В свете современных данных при понижении колонизационной резистентности слизистой оболочки кишечника и уменьшении нормальной облигатной микрофлоры освобождаемая экологическая ниша занимает факультативно-анаэробными бактериями (эшерихиями и другими). В этой связи при изыскании средств борьбы с болезнями органов пищеварения актуальным является проведение всесторонних исследований, позволяющих обоснованно оценить функциональное состояние желудочно-кишечного тракта и устранить факторы, вызвавшие патологический процесс.

В таком случае в качестве высокочувствительной индикаторной системы выступает микрофлора пищеварительного тракта, которая реагирует на изменения состояния организма (нормы и патологии) количественными и качественными показателями [2, 5, 6, 7].

Значительное преобладание какого-либо вида микроорганизмов в ассоциации свидетельствует о его этиологической значимости. Следовательно, при оценке этиологической роли микроорганизмов необходимо проводить сравнительную количественную оценку различных видов в ассоциациях, выделяемых из проб содержимого кишечника [1].

Цель исследований: оценить влияние моноинвазий и смешанных паразитозов на количественный и качественный состав микробиоценоза кишечника плотоядных.

Материал и методы. Для решения поставленной цели мы изучали количественные и качественные показатели микробиологического статуса кишечника плотоядных при моноинвазиях и смешанных инвазиях в зависимости от количества возбудителей и их вида.

После предварительных копрологических исследований были подобраны группы неинвазированных собак (контроль), а также естественно и экспериментально зараженных собак с различными моно- и микстинвазиями, вызванными *T. canis*, *Tox. leonina*, *D. caninum*, *U. stenocephala*, *Taenia sp.*, *I. ohioensis*, *I. canis* и *E. canis*.

Для микробиологического исследования при неполном гельминтологическом вскрытии тонкого и толстого кишечника собак отбирали пробы содержимого в стерильную посуду. Также отбирали пробы фекалий из прямой кишки у живых животных.

Количество жизнеспособных клеток бактерий в 1 г содержимого кишечника (число колониеобразующих единиц - КОЕ) устанавливали методом предельных разведений при высеве на соответствующие агаризованные питательные среды. Культивирование анаэробной микрофлоры проводили в микроанаэроостате при +37°C в течение 48-72 часов; остальной - при +37°C в течение 18-24-48 часов. Количество бактерий в 1 г фекалий определяли по числу выросших колоний с пересчетом на количество посеянного материала и степень его разведения. Ориентировочную идентификацию бифидо- и лактобактерий проводили микроскопическим методом (окраска мазка по Граму), который позволяет оценить морфологию клеток. Изучение морфолого-культуральных и биохимических свойств остальных выделенных бактерий проводили общепринятыми методами бактериологического исследования.

Результаты исследований. Показатели количественного и качественного состава микрофлоры тонкого кишечника павших животных при моно- и смешанных инвазиях указаны в таблицах 1 и 2. Как видно из данных таблиц 1 и 2, у павших животных, инвазированных как моноинвазиями, так и ассоциациями паразитов, понижается количество *E. coli*, обладающих типичной антагонистической активностью и ферментативной активностью, но увеличивается количество лактозоотрицательных кишечных палочек (Л- КП).

Таблица 1 – Количественный состав микрофлоры тонкого кишечника собак при моноинвазиях, КОЕ/г

Представители микробиоценоза	Виды возбудителей паразитозов			
	<i>Toxosara canis</i>	<i>Dipylidium caninum</i>	<i>Coccidia sp.</i>	Контроль
Кишечные палочки	6±2x10 ⁷ Л+	6±2x10 ⁷ Л-	6±2x10 ⁷ Л-	6±2x10 ⁵ Л+
Бифидобактерии	5,5±2,5x10 ⁵ -2-8x 10 ⁶	5±2x10 ⁶	7,5±3,5x10 ⁵ -3-5x10 ⁶	9,5±2,5x10 ⁸
Лактобациллы	4±1x10 ⁵	5,5±3,5x10 ⁵	2±1x10 ⁵	9±2x10 ⁷
Аэробные бациллы	6±3x10 ⁴	8±4x10 ⁴	6±1x10 ⁴ -4,5±1,5x10 ⁵	5±2x10 ³
Микромицеты	6±2x10 ⁴	8±2x 10 ⁴	10±2x10 ⁴	3,5±1,5x10 ²

Бифидобактерий и лактобацилл становится меньше, чем у контрольных животных (P<0,001). Увеличивается содержание стафилококков, энтеробактерий (род *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*). В значительной степени увеличивается количество клостридий и энтерококков; микромицеты (род *Mucor*, *Aspergillus*, *Candida*) находятся в большем количестве, чем у неинвазированных животных. Следует также отметить, что у выделенных энтеробактерий повышены патогенные свойства и выявляется гемолитическая активность.

Таблица 2 - Количественный состав микрофлоры тонкого кишечника собак при ассоциативных паразитозах, КОЕ/г

Представители микробиоценоза	Виды возбудителей паразитозов				Контроль
	<i>Toxocara canis</i> + <i>Dipylidium caninum</i>	<i>Toxocara canis</i> + <i>Toxascaris leonina</i>	<i>Toxocara canis</i> + <i>Dipylidium caninum</i> + <i>Uncinaria stenocephala</i>	<i>Toxocara canis</i> + <i>Dipylidium caninum</i> + <i>Coccidia</i> sp.	
Кишечные палочки	21,5±2,5 x10 ⁵ Л-	10,5±5,5 x10 ⁵ Л-	13±2 x10 ⁵ Л-	11±3 x10 ⁵ Л-	5±1 x10 ⁶ Л+
Бифидобактерии	5,5±1,5 x10 ⁵ -6±1x10 ⁶	13,5±5,5 x10 ⁵ -4,5±1,5-x10 ⁶	9,5±1,5x10 ⁵	14,5±6,5 x10 ⁵	12,5±3,5 x10 ⁸
Лактобациллы	4±2 x10 ⁵ -4,5±1,5 x10 ⁶	10,5±3,5 x10 ⁵ -7,5±2,5 x10 ⁶	19±7x10 ⁵ -9,5±6,5x10 ⁶	28±5x10 ⁴ -37±5x10 ⁵	11,5±2,5 x10 ⁸
Аэробные бациллы	16±5x10 ⁴	13,5±4,5 x10 ⁴	7,5±1,5x10 ⁵	4,5±2,5x10 ⁵	3±1x10 ³
Микромицеты	9±2x10 ⁴	12±3x10 ⁴	6,5±1,5x10 ⁵	4,5±2,5x10 ⁵	3,5±1,5 x10 ³

При смешанной инвазии, представленной *T. canis*, *T. leonina*, *D. caninum*, *U. stenocephala*, *Taenia* sp., *I. ohioensis*, *I. canis* и эймериями *E. canis* изменения в составе микрофлоры тонкого кишечника значительно, чем при моноинвазии. Это связано с тем, что эймерии и изоспоры повреждают слизистую оболочку кишечника, тем самым вызывая сильное воспаление и понижение колонизационной резистентности слизистой кишечника, что, в свою очередь, влияет на состав микрофлоры, а унцинарии и дипилидиумы, цепляясь за кишечную стенку, повреждают ее целостность и также вызывают сильное воспаление. Помимо этого унцинарии являются гематофагами, и, паразитируя в большом количестве, способны вызывать анемию, а также снижать сопротивляемость организма в целом. *T. canis* и *Tox. leonina*, в свою очередь, оказывают компрессорное действие на стенки кишечника, тем самым нарушая его функции и вызывая воспаление слизистой оболочки, а также оказывают токсическое и иммунодепрессивное действие на организм в целом.

Количественная характеристика резидентных и транзитных представителей микрофлоры тонкого кишечника неинвазированных собак (табл. 1, 2) соответствовала таковой у животных в норме [5].

Толстый кишечник. Показатели количественного и качественного состава микрофлоры толстого кишечника больных животных указаны в таблицах 3 и 4.

Количественная характеристика резидентных и транзитных представителей микрофлоры толстого кишечника неинвазированных собак (табл. 3, 4) соответствовала таковой у животных в норме [5]. Полученные результаты показывают, что основу нормальной микрофлоры кишечника у неинвазированных собак составляют неспорообразующие облигатные анаэробные микроорганизмы. Соотношение представителей анаэробной-аэробной флоры кишечника составило примерно 1000:1, что соответствует норме.

Следует сказать, что микробиоценоз индигенной флоры толстого отдела кишечника в сравнении с тонким значительно преобладает в количественном отношении.

Таблица 3 - Количественный состав микрофлоры толстого кишечника собак при моноинвазиях, КОЕ/г

Представители микробиоценоза	Виды возбудителей паразитозов			КОНТРОЛЬ
	<i>Toxocara canis</i>	<i>Dipylidium caninum</i>	<i>Coccidia</i> sp.	
Кишечные палочки	9,5±4,5x10 ⁷ Л-	27±4x10 ⁵ Л-	15,5±1,5x10 ⁷ Л-	5±3x10 ⁶ Л+
Бифидобактерии	9,5±5,5x10 ⁶	16,5±4,5x10 ⁶	4±2x10 ⁶	6,5±2,5x10 ⁹
Лактобациллы	10±5x10 ⁵	20±8x10 ⁵	10±4x10 ⁶	11,5±2,5x10 ⁸ -20,5±8,5x10 ⁹
Аэробные бациллы	13,5±5,5x10 ⁵	22,5±4,5x10 ⁴	14,5±2,5x10 ⁴	10±4x10 ³ - 5±3x10 ⁴
Микромицеты	4±1x10 ⁵	2,5±1,5x10 ⁴	11,5±1,5x10 ⁴	4,5±1,5x10 ³

Таблица 4 - Количественный состав микрофлоры толстого кишечника собак при ассоциативных паразитозах, КОЕ/г

Представители микробиоценоза	Виды возбудителей паразитозов				Контроль
	<i>Toxocara canis</i> + <i>Dipylidium caninum</i>	<i>Toxocara canis</i> + <i>Toxascaris leonina</i>	<i>Toxocara canis</i> + <i>Dipylidium caninum</i> + <i>Uncinaria stenocephala</i>	<i>Toxocara canis</i> + <i>Dipylidium caninum</i> + <i>Eimeria canis</i>	
Кишечные палочки	7,5±2,5x10 ⁵ Л-	8±3x10 ⁶ Л-	9,5±4,5x10 ⁷ Л-	19,5±7,5x10 ⁷ Л-	7±2x10 ⁶ Л+
Бифидобактерии	13,5±6,5x10 ⁶	10±4x10 ⁵	12,5±6,5x10 ⁵	10,5±5,5x10 ⁵	6,5±2,5x10 ⁹
Лактобациллы	11,5±3,5x10 ⁶	6,5±2,5x10 ⁵	10,5±2,5x10 ⁵	4,5±2,5x10 ⁵	9,5±1,5x10 ⁸
Аэробные бациллы	8,5±3,5x10 ⁴	11±5x10 ⁵	9,5±3,5x10 ⁵	7,5±4,5x10 ⁴	5±2x10 ³
Микромицеты	7,5±2,5x10 ⁴	8,5±2,5x10 ⁴	5,5±1,5x10 ⁵	6,5±1,5x10 ⁵	5±2x10 ³

Из результатов опытов видно, что по сравнению с контрольной группой микрофлора кишечника собак, инвазированных как моноинвазиями, так и ассоциативными паразитозами, претерпела значительные изменения

в сторону уменьшения нормальной микрофлоры (особенно со стороны бифидобактерий, лактобацилл и кишечных палочек). Вместе с тем, увеличилось содержание аэробных грамотрицательных палочек (род *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*), появляются лактозонегативные штаммы *E. coli*, повышается содержание стафилококков и стрептококков. Микромицеты (род *Candida*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*) также регистрируются в большем количестве.

Следует отметить, что при паразитировании *Dipylidium caninum* наблюдается максимальное (по сравнению с другими паразитами) количество клостридий, при паразитировании эймерий (как в моноинвазии, так и в ассоциации с другими паразитами) - максимальное количество стафилококков и стрептококков, а также грибов рода *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

Заключение. Вышеизложенные результаты и их анализ позволяют сформулировать следующие выводы:

1. При моноинвазиях и ассоциативных паразитозах собак, вызванных *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*, *Dipylidium caninum*, *Uncinaria stenocephala*, *Isospora ohioensis*, *Isospora canis* и *Eimeria canis* в кишечнике больных животных резко меняется количественный и качественный состав микрофлоры, интенсивность изменения которой находится в прямой зависимости от интенсивности инвазии и наличия сопутствующих инвазий. При смешанных паразитозах состав микрофлоры кишечника нарушается в большей степени, чем при моноинвазии.

2. Изменение количественного и качественного состава микрофлоры тонкого и толстого кишечника у инвазированных собак по сравнению с показателями здоровых животных происходит в сторону уменьшения на 2-4 порядка нормальной микрофлоры кишечника (бифидобактерий - до 10^5 - 10^6 КОЕ/г, лактобактерий - до 10^4 - 10^5 КОЕ/г), тогда как увеличивается содержание транзитных микроорганизмов: аэробных бацилл, микромицет (дрожжевых и плесневых грибов) - до 10^4 - 10^5 КОЕ/г, а также выделяются: протей в количестве до 10^4 КОЕ/г, клостридии - до 10^5 - 10^7 КОЕ/г, стрептококки - до 10^5 КОЕ/г, стафилококки - до 10^4 - 10^5 КОЕ/г.

3. Отмеченные изменения в составе микрофлоры желудочно-кишечного тракта собак, больных моноинвазиями и ассоциативными паразитозами, характерны для дисбактериоза.

Литература. 1. Горковенко Н.Е. Количественная оценка кишечного микробиоценоза телят / Н.Е. Горковенко, Ю.А. Макаров, А.М. Кузьменко // Труды ВИЭВ/ - Том 75. - С. 176-177. 2. Красноголовец, В.Н. Дисбактериоз кишечника / В.Н. Красноголовец. - М.: Медицина, 1989. - 208 с. 3. Нормобиоценоз и дисбактериоз молодняка / Г.Ф. Бовкун [и др.] // Ветеринария сельскохозяйственных животных. - 2008. - №3. - С. 12-17. 4. Пинегин, В.В. Дисбактериозы кишечника / Пинегин, В.В., Мальцев В.Н., Коршунов В.М. - Москва, 1984.- 211 с. 5. Субботин, В.В. Микрофлора кишечника собак: физиологическое значение, возрастная динамика, дисбактериозы, коррекция / В.В.Субботин, Н.В.Даншлевская // Ветеринар. - №1.- 2002.- С. 12-23. 6. Тимошко, М.А. Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных / М.А. Тимошко. - Кишинев, Штиинца, 1990. - 190 с. 7. Luckey T.D. Overview of gastrointestinal microecology.// Die Nahrung. - Vol. 31. - № 5-6. - 1987.

УДК: 619:616.995.122.21-074

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ АНТИГЕНОВ, ИСПОЛЗУЕМЫХ ДЛЯ ИММУНОДИАГНОСТИКИ ФАСЦИОЛЕЗА

Трус И.А., Якубовский М.В.

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

Полученные нами антигены обладают высокой специфичностью и пригодны для использования в иммунодиагностике фасциолеза. Результаты позволяют утверждать, что использование ИФА и РИД при постановке диагноза на фасциолез у крупного рогатого скота исключает ложноположительные реакции, вызванные туберкулезом или гиподерматозом ($p < 0,001$).

Received antigens possess highly specificity and suitably for use in fascioliasis immunodiagnostics. It is shown that use of ELISA and GDPT at fascioliasis immunodiagnostics in cattle excludes false positive results caused by tuberculosis and hypodermatosis ($p < 0,001$).

Введение. Иммунологическая перестройка в патогенезе инвазированного организма имеет первостепенное значение [13]. Гельминты и выделяемые ими продукты жизнедеятельности несут антигенные свойства. Под воздействием этих антигенов в организме происходит ряд ответных иммунных процессов и мобилизация защитных механизмов при регулирующей роли нервной системы: воспаление, аллергические реакции быстрого и замедленного типа, изменение функционирования Т- и В-лимфоцитарных систем, активация макрофагов, эозинофилия, фагоцитоз. Происходит сенсибилизация организма и образуются антитела – иммуноглобулины G, A, M и E. Срок и количество их в крови животного зависит от напряженности иммунитета, интенсивности инвазии, стадии развития паразита, условий кормления и содержания животного, пола, возраста, физиологического состояния, наличия других болезней и т.д. [9, 13].

Методы иммунодиагностики базируются на установлении изменений, развившихся в организме хозяина при его контакте с паразитом. В связи с тем, что существующие прижизненные, посмертные и другие методы не всегда позволяют точно выявить наличие в организме инвазионного заболевания, во многих странах мира ведутся работы по разработке высокоэффективных иммунологических методов их диагностики [2].

В последнее время наибольшее внимание уделяется другим методам, обладающим возможностью более высокого уровня диагностики болезней. К ним относятся РИА, ИФА, РИФ, ПЦР. Многократное усиление реакций является ценным качеством при диагностике паразитарных болезней, так как они не отличаются высоким уровнем специфических антител [2, 3].