

**Заключение.** Исследования показали, что пробиотическая кормовая добавка «Олин» усиливает продуктивность бройлеров и способствует сокращению затрат кормов на 1 кг мяса птицы. Пробиотическая добавка «Олин», вносимая в полнорационный комбикорм цыплят-бройлеров вместо кормового антибиотика в количестве 0,05%, способствует повышению сохранности птицы на 1,3%, увеличению массы бройлеров на 59,0 г и снижению затрат корма на кг прироста - на 0,02 единицы. Кормовая добавка «Олин» может рассматриваться как альтернатива применения кормового антибиотика в кормлении при промышленной технологии выращивания цыплят-бройлеров.

**Литература.** 1. Алимов, А. М. Лечебно-профилактическое значение пробиотиков при желудочно-кишечных инфекциях поросят и цыплят / А. М. Алимов, М. Ш. Алиев // *Актуальные проблемы биологии в животноводстве : тез. докл.* – Боровск, 2000. – С. 382–383. 2. Алямкин, Ю. Пробиотики вместо антибиотиков — это реально / Ю. Алямкин // *Птицеводство.* – 2005. – № 2. – С. 17–18. 3. Бакулина, Л. Ф. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Vacillus* и их использование в ветеринарии / Л. Ф. Бакулина, И. В. Тимофеев, Н. Т. Перминова // *Биотехнология.* – 2001. – № 2. – С. 48–56. 4. Зубок, Н. М. Использование пробиотиков в кормах цыплят-бройлеров / Н. М. Зубок, В. Г. Вакуленко // *Современные технологии сельскохозяйственного производства : Материалы XIV Международной научно-практической конференции / Гродненский государственный аграрный университет.* – Гродно, 2012. – С. 365–367. 5. Крюков, О. Спорообразующий пробиотик при выращивании бройлеров / О. Крюков // *Комбикорма.* – 2006. – № 1. – С. 75–76. 6. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики / И. П. Кондрахин [и др.]. – Москва, 2004. – 213 с. 7. Маслиев, И. Т. Корма и кормление сельскохозяйственной птицы / И. Т. Маслиев. – Москва : Колос, 1968. – 202 с. 8. Михайлова, Н. М. Биологические свойства новых изолятов *Vacillus subtilis* / Н. М. Михайлова, Л. П. Блинкова, А. Г. Гатауллин // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* – 2007. – № 4. – С. 41–46. 9. Плященко, С. И. Естественная резистентность организма животных / С. И. Плященко, В. Т. Сидоров. – Москва : Колос, 1979. – 184 с. 10. Скворцова, Т. Н. Эффективность использования пробиотиков отечественного производства при выращивании цыплят-бройлеров / Т. Н. Скворцова, Д. В. Осепчук, Н. А. Пышманцева // *Ветеринария Кубани.* – 2008. – № 8. – С. 18–19. 11. Тохтмиев, А. Применение пробиотиков в птицеводстве / А. Тохтмиев // *Птицеводство.* – 2009. – № 12. – С. 25–27. 12. Bedford, M. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimize subsequent problems / M. Bedford // *Worlds Poultry Science Journal.* – 2000. – Vol. 56, № 4. – P. 347–365. 13. Carvalho, N. Poultry without AGPs: Prospects for probiotics in broilers / N. Carvalho, N. Hansen // *Feed International.* – 2005. – Vol. 26, № 10. – P. 9–12.

Статья передана в печать 09.09.2019 г.

УДК 619:616.98:578.828.11-07

#### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ЭНЗООТИЧЕСКОГО ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

\*Максимович В.В., \*\*Черных О.Ю., \*Бабахина Н.В.

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

\*\*ГБУ «Кропоткинская государственная ветеринарная лаборатория»,  
г. Кропоткин, Российская Федерация

Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота - хроническая инфекционная болезнь опухолевой природы, которая протекает бессимптомно или проявляется лимфоцитозом и злокачественными новообразованиями в кроветворных и других органах и тканях. Болезнь широко распространена во многих странах мира. Методы прижизненной диагностики лейкоза крупного рогатого скота имеют решающее значение как для выяснения степени его распространенности, так и для проведения противолейкозных мероприятий. В статье отражена суть современных методов диагностики энзоотического лейкоза крупного рогатого скота, проведен анализ их эффективности по своевременному выявлению инфицированных животных. **Ключевые слова:** полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ, реакция иммунодиффузии, сыворотка крови, энзоотический лейкоз крупного рогатого скота.

#### COMPARATIVE EFFICIENCY OF DIAGNOSTIC METHODS OF ENZOOTIC LEUKEMIA OF THE CATTLE

\*Maksimovich V.V., \*\*Chernyh O.Y., \*Babakhina N.V.

\*Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

\*\*Kropotkinsk State Veterinary Laboratory, Kropotkin, Russian Federation

Leukemia in cattle is a chronic infectious disease of a tumor nature, which is asymptomatic or manifests itself as lymphocytosis and malignant neoplasms in the hematopoietic and other organs and tissues. The disease is widespread in many countries of the world. Methods for the intravital diagnosis of cattle leukemia are crucial both to determine its prevalence and to conduct anti-leukemia measures. The article reflects the essence of modern methods for the diagnosis of enzootic leukemia in cattle, an analysis of their effectiveness in the timely detection of infected animals. **Keywords:** polymerase chain reaction, ELISA, immunodiffusion reaction, blood serum, bovine enzootic leukemia.

**Введение.** На всех этапах развития нашей страны увеличение производства молока, мяса и других продуктов питания было и остается одной из главных задач работников агропромышленного комплекса Республики Беларусь. Одной из ведущих отраслей животноводства в Республике Беларусь является скотоводство. Поэтому увеличение численности здорового и высокопродуктивного скота является первостепенной задачей зооветеринарной службы нашей страны. Наиболее распространены среди инфекционных болезней крупного рогатого скота являются энзоотический лейкоз, инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, туберкулез.

Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота (ЭЛ КРС) - хроническая вирусная инфекционная болезнь, протекающая чаще бессимптомно, с развитием необратимого инфекционного процесса, проявляющегося персистентным (*persistens* - сохранившимся, оставленным) лимфоцитозом, злокачественным разрастанием кроветворных и лимфоидных клеток с нарушением их способности к морфологической дифференцировке и физиологическому созреванию, с последующей диффузной инфильтрацией органов этими клетками или образованием опухолей.

Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота регистрируется во многих странах мира. Например, 83,9% ферм США неблагоприятны по этой болезни. В Канаде ЭЛ КРС регистрируют в 89% стад при уровне инфицированности животных 20,8–37,4%, а в Японии 68,1% ферм неблагоприятны по этой болезни при уровне инфицированности животных 28,6%. Вместе с тем 12 стран Европы, успешно проводивших противолейкозные мероприятия, признаны свободными от ЭЛ КРС. Высокий уровень инфицированности животных вирусом ЭЛ КРС установлен в отдельных регионах России и других странах СНГ. В отдельных странах мира ситуация по ЭЛ КРС остается неизвестной, так как они не предоставляют соответствующую информацию в МЭБ.

Возникновение ЭЛ КРС ставит под угрозу сохранение племенных животных, ведение селекционно-племенной работы, а также продажу и обмен животными и продуктами животного происхождения. Экономический ущерб от этой болезни складывается из потерь, связанных с выбраковкой инфицированных вирусом лейкоза животных, недополучением мясной и молочной продукции, ограничениями в экспорте крупного рогатого скота и продуктов его убоя, а также затрат на утилизацию туш, проведение диагностических исследований и комплекса мероприятий по профилактике и ликвидации болезни.

В 80-е годы прошлого столетия ЭЛ КРС регистрировался в 98% хозяйств республики. Для диагностики болезни использовали гематологический метод, который базировался на выявлении у животных персистентного (сохранившегося) лимфоцитоза.

Внедрение в ветеринарную практику метода серологического исследования – реакции иммунодиффузии (РИД) – как более совершенного в то время метода диагностики ЭЛ КРС, дающего возможность выявлять инфицированных животных уже на стадии антителообразования, а в систему мероприятий по профилактике и ликвидации болезни – проведение диагностических исследований в 6, 12, 18 и 24-мес. возрасте и удаления из стада реагирующих в РИД животных, позволило относительно стабилизировать в стране ситуацию по ЭЛ КРС. На начальном этапе проведения таких мероприятий в стране ежегодно выявлялось и подвергалось убою до 50 000 инфицированного крупного рогатого скота. Инфицированность крупного рогатого скота к 2010 году снизилась с 19,6% до 0,01-0,02%.

В 2010 году были «унифицированы» ветеринарно-санитарные правила профилактики и ликвидации ЭЛ КРС, которые исключили исследования в неблагоприятных по этой патологии хозяйствах животных в 6-месячном возрасте. В результате ситуация по ЭЛ КРС в республике ухудшилась. В отдельных хозяйствах инфицированность крупного рогатого скота составила более 25%, а на племпредприятиях стали выявляться инфицированные вирусом лейкоза крупного рогатого скота быки-производители (один бык дает до 50 000 доз спермы в год, которая может быть контаминирована вирусом ЭЛ КРС). А с 2018 года, согласно ветеринарно-санитарным правилам, в благополучных хозяйствах исследования животных начинаются лишь в 24-месячном возрасте. Таким образом, в настоящее время ЭЛ КРС в РБ может получить распространение и нанести значительный экономический ущерб животноводству. Используемые методы диагностики ЭЛ КРС в РБ не дают возможность выявлять инфицированных животных в инкубационный период развития инфекционного процесса. Необходимость совершенствования диагностики и системы профилактики и ликвидации ЭЛ КРС объясняется и социальной значимостью болезни. В последние годы получен ряд научных доказательств об опасности вируса ЭЛ КРС для человека. Большой интерес представляют проблемы потенциальной опасности для человека продуктов питания от животных из стад, неблагоприятных по ЭЛ КРС, влияния вредных метаболитов, накапливающихся в организме больных коров, на организм человека, а также использование животных для получения биопрепаратов. Установлено, что молоко и мясо больных лейкозом животных содержат метаболиты триптофана и других циклических аминокислот, экологически опасных для человека [11]. При производстве молочных продуктов используются различные режимы пастеризации. При производстве сметаны, масла, кисломолочных напитков, йогуртов чаще всего применяют пастеризацию при 85-87°C с выдержкой 5-7 мин. или 90-95°C с выдержкой 2-3 мин. Однако при производстве сыров такие температурные режимы пастеризации не приемлемы, так как ухудшают способность молока к сычужному свертыванию. В сыроделии используется режим 72°C с выдержкой 15 с., что может быть недостаточно для инактивации ВЛКРС.

Существует мнение о том, что возможна активация «молчащих» вирусов, встроенных в геном человека и утративших участки генов gag, pol, env при поступлении этих участков с другим не дефектным вирусом [2].

Разработка эффективных способов борьбы с лейкозом крупного рогатого скота является одной из важнейших задач не только ветеринарной медицины, животноводства, но и биологии, и экологии в целом, имеющих непосредственное отношение к безопасности здоровья человека.

**Материалы и методы исследований.** Исследования проводились в условиях ГБУ «Кропоткинская государственная ветеринарная лаборатория», серологический отдел, лаборатория ПЦР-диагностики.

Материалом для исследования явилось 100 проб сыворотки крови и 100 проб стабилизированной крови от телок старше 12-месячного возраста из неблагополучного по ЭЛ КРС хозяйства.

Методы, используемые для диагностики: РИД, ИФА (конкурентный метод), ПЦР.

Заражение животных ВЛКРС сопровождается выработкой антител к структурным белкам вируса. Антитела и вирус персистируют в организме у зараженных животных на протяжении всей жизни. Это позволяет применять серологические методы для диагностики болезни, вызываемой этим вирусом.

Сущность метода РИД заключается в выявлении в сыворотке крови специфических преципитирующих антител к ВЛКРС при помощи РИД в агаровом геле. Для постановки РИД использовали набор для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота (ТУ 10-19-442-87), в состав которого входят: сухой специфический антиген вируса лейкоза крупного рогатого скота, состоящий из гликопротеидного gr-51 и полипептидного р-24 антигенов, разбавитель антигена, специфическая преципитирующая сыворотка (СПС) к вирусу лейкоза, солевая смесь агара (ССА) и разбавитель (ССА), контрольные сыворотки: отрицательная, положительная, слабopоложительная и положительная с антителами к р-24 антигену ВЛКРС [12].

Оборудование и реактивы: чашки Петри диаметром 100 мм; стандартный штамп-пробойник для просечения лунок в агаре; пипетки пастеровские или автоматические со сменными наконечниками; рН-метр; осветитель; хлорид натрия (х.ч.); дистиллированная вода.

Постановка РИД. Подготовку компонентов реакции к работе осуществляли в соответствии с «Наставлением по применению набора для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота». Антиген растворяют в 5 см разбавителя. Разбавитель ССА и солевую смесь агара перенесли в колбу и долили дистиллированную воду до объема 200 см, затем колбу поместили в водяную баню и выдержали до полного расплавления гранул агара. Расплавленный агаровый гель, имеющий температуру 50-70°C, разлили слоем 2-3 мм (12-15 мл) в обезжиренные чашки Петри и оставили их приоткрытыми при комнатной температуре в течение 1 ч. После застывания агара специальным штамп-пробойником сделали лунки в геле, не допуская образования трещин между ними и отслоения агара от дна чашки. В каждой чашке делали по четыре фигуры, каждая из которых состоит из семи лунок: одна в центре, остальные по периферии. Диаметр каждой лунки составляет 7 мм, расстояние между центральной и периферическими лунками - 3 мм. Образовавшиеся диски геля удаляли из лунок канюлей, соединенных с вакуумным насосом. Антиген, контрольные и испытуемые сыворотки внесли в лунки каждой фигуры автоматическими пипетками со сменными наконечниками. Антиген (А) внесли в центральную лунку, а две диаметрально противоположные лунки заполняют контрольной сывороткой (КС). Оставшиеся в фигуре 4 периферические лунки (1, 2, 3, 4) заполнили испытуемыми сыворотками. Лунки заполняются доверху, не допуская переливания жидкости через край. После заполнения всех лунок чашки Петри закрывают крышками и инкубируют во влажной камере при температуре 22-27°C.

Учет и оценка результатов реакции. Реакцию учитывают не ранее чем через 48 ч и не позднее чем через 96 ч. Чашки просматривали на темном фоне, направляя сфокусированный луч осветителя на дно чашки под углом 30-45°. Специфичность реакции оценивают по контрольной линии преципитата. Специфическая линия преципитации, формируемая преципитирующей контрольной сывороткой и антигеном, должна быть четкой, иметь форму прямой, располагаться на одинаковом расстоянии от лунок с антигеном и контрольной сывороткой. Неспецифической считают линию преципитации, которая образуется между лунками с испытуемой сывороткой и антигеном, но не сливается с контрольной линией преципитации, а пересекает ее или упирается в нее, образуя угол.

Оценка результатов. В зависимости от наличия специфических антител против антигенов ВЛКРС в испытуемой сыворотке реакцию оценивают как положительную или отрицательную. Положительной считают реакцию, если между лунками с антигеном и испытуемой сывороткой образуется полоса преципитации, которая соединяется с полосой преципитации контрольной сыворотки, образуя непрерывную линию, то есть идентична ей. Если линия преципитации между лунками с испытуемой сывороткой и антигеном отсутствует, но контрольная линия преципитирующей сыворотки образует вблизи лунки с испытуемой линией изгиб, направленный в сторону лунки с антигеном, - слабopоложительная сыворотка.

**Иммуноферментный анализ (ИФА)** основан на иммунохимической реакции взаимодействия антиген-антитело и использовании в качестве индикатора этой реакции маркированных ферментами антител или антигенов. Для исследований мы использовали набор «ID – Vet». В состав диагностического набора входят: антитела к ВЛКРС, адсорбированные в лунках МТП; антиген вируса лейкоза; конъюгат антител к ВЛКРС с пероксидазой или другим ферментом; сыворотки контрольные - положительная, слабоположительная и отрицательная; разбавитель для сывороток и промывающий раствор, содержащий детергент и инертный белок, предотвращающий неспецифическое связывание; субстрат ферментативной реакции; микротитровальные полистироловые планшеты с 96 лунками [12].

Проведение исследования. Имобилизация антител к ВЛКРС. Содержимое флакона с антителами растворяли в разбавителе для антител и внесли по 0,2 мл в лунки МТП, закрыли планшет крышкой и инкубировали в течение 18 часов при температуре 4°C. В состав некоторых коммерческих наборов для выявления антител к ВЛКРС могут входить планшеты, готовые к употреблению. Планшет трижды промывают промывающим раствором, полностью заполняя лунки и оставляя в них раствор на 1,5-2 мин., тщательно удалили раствор из лунок. Сыворотки крови внесли по 0,05 мл в лунки МТП. Контрольные образцы внесли в двух повторностях. Затем во все лунки внесли по 0,15 мл растворенного в разбавителе антигена, перемешали содержимое лунок, слегка постукивая по краю МТП, закрыли МТП крышками и инкубировали во влажной камере 1,5-2 часа при температуре от 18°C до 37°C. Планшет трижды промывали промывающим раствором. В лунки внесли по 0,2 мл конъюгата, закрыли крышками и инкубировали при температуре 18-37°C в течение 1,5-2 часов во влажной камере. Планшет трижды промыли промывающим раствором. В каждую лунку внесли по 0,2 мл раствора субстрата ферментативной реакции, инкубировали 0,5-1 час при комнатной температуре. Допускается в случае необходимости останавливать реакцию добавлением специального раствора и измерять оптическую плотность в каждой лунке на фотометре при длине волны, характерной для данного субстрата. Оценка результатов реакции. Визуальная оценка результатов включает: оценку соответствия цвета продуктов ферментативной реакции характеристике, приведенной в наставлении по применению данного диагностического набора, и оценку окрашивания контрольных проб, на основании которого определяется специфичность и активность диагностического набора. Интенсивность окрашивания положительного контроля должна быть минимальной или полностью отсутствовать; окрашивание отрицательного контроля должно быть интенсивным; окрашивание слабоположительного контроля должно быть значительно менее интенсивным, чем окрашивание отрицательного контроля.

Положительной считают испытуемую пробу, если интенсивность ее окрашивания не превышает интенсивности окрашивания слабоположительного контроля.

Инструментальную оценку результатов анализа проводят после предварительной визуальной оценки цвета продуктов ферментативной реакции и правильности реагирования контрольных проб.

Измеряли оптическую плотность продуктов реакции на фотометре при длине волны, указанной в наставлении по применению данного диагностического набора. Результат оценивали по величине процента конкуренции, которую рассчитывают по формуле 1:

$$K = \frac{ОП_{к-} - ОП_{исп}}{ОП_{к-} - ОП_{к+}} \times 100,$$

где

K - конкуренция испытуемого материала (%);

ОП<sub>к+</sub> - оптическая плотность положительного контроля;

ОП<sub>к-</sub> - оптическая плотность отрицательного контроля;

ОП<sub>исп</sub> - оптическая плотность испытуемой пробы.

Результат считают положительным при K не ниже 50%.

**Метод полимеразной цепной реакции.** Сущность метода: ВЛКРС присутствует в организме в виде ДНК-копий (провируса), встраиваясь в геном клетки-хозяина. Это делает возможным выявление ВЛКРС с помощью современных молекулярно-биологических методов, в частности методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для обнаружения провируса с помощью ПЦР используется геномная ДНК, выделенная из крови животных. В результате ПЦР определенный вирусоспецифический фрагмент выделенной ДНК амплифицируется (умножается) до количества, достаточного для его визуального определения.

ПЦР представляет собой серию циклов, в течение которых происходит ферментативный синтез специфического участка нуклеиновой кислоты. Каждый цикл включает три этапа: при нагревании до 94-95°C происходит разделение молекулы геномной ДНК на две комплементарные цепи (денатурация); при охлаждении до 48-65°C с цепями ДНК соединяются специфические олигонуклеотидные праймеры (отжиг); при нагревании до 72°C термостабильная ДНК-полимераза достраивает цепи ДНК, ограниченные парой праймеров (синтез и элонгация). В результате реакции за один цикл количество специфического фрагмента ДНК увеличивается вдвое, и, в зависимости от количества циклов, можно получить более миллиона его копий.

Метод ПЦР может использоваться для диагностики лейкоза крупного рогатого скота наряду с

серологическими. С помощью ПЦР удается обнаруживать даже деградированную нуклеиновую кислоту, присутствующую в следовых количествах. Для проведения ПЦР-анализа достаточно 50 мкл крови.

**Оборудование, расходные материалы и реактивы.** Оборудование: ДНК-амплификатор; УФ-трансиллюминатор; комплект приборов для горизонтального гель-электрофореза; микроцентрифуга (12000 *q*); термостат; холодильник; автоматические варипипетки (на 20, 200 и 1000 мкл). Расходные материалы и посуда: пластиковые пробирки (0,5 мл и 1,5 мл); наконечники для пипеток; пенициллиновые флаконы или стеклянные пробирки. Вся стеклянная посуда для ПЦР должна быть стерильна, а пластиковая - одноразового применения. Реактивы и ферменты: фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (24:24:1, по объему); хлороформ:изоамиловый спирт (24:1, по объему); агароза; Taq-ДНК-полимераза; специфические праймеры; этанол перегнанный 96% и 70%; минеральное масло; дистиллированная деионизированная автоклавированная вода. Растворы и буферные смеси: цитратный буфер: 0,48% лимонная кислота; 1,32% цитрат натрия; 1,47% глюкоза; лизирующий буфер: 10 мМ трис-HCl, pH 8,0; 10 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), pH 8,0; 50 мМ NaCl; 2% додецилсульфат натрия (SDS); протеиназа К в концентрации 300 мкг/мл; буфер для ПЦР (10<sup>×</sup>): 50 мМ KCl; 100 мМ Tris-HCl; pH 9,0; 1% Triton X-100; буфер для электрофореза (10<sup>×</sup>): 121,1 г трис; 51,35 г борная кислота; 3,72 г ЭДТА - довести водой до 1 л; буфер для нанесения проб (6<sup>×</sup>): 0,25% бромфеноловый синий; 0,25% ксиленианол; 40% сахарозы в воде; 10 мМ dNTP (смесь всех четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов по 10 мМ каждого); бромистый этидий, 10 мкг/мл; 25 мМ MgCl<sub>2</sub>; 2,5 ацетат натрия, pH 5,2.

**Этапы работы. Выделение геномной ДНК.** В микроцентрифужную пробирку поместили 50 мкл крови и 250 мкл лизирующего буфера. Смесь инкубировали 1 час при 56°C. Дважды экстрагировали равным объемом смеси фенол:хлороформ, третью экстракцию провели равным объемом хлороформа. Центрифугировали 10 мин. при 12000 *q*. Отобрали супернатант, добавили к нему 2,5 М ацетат натрия, pH 5,2, до концентрации 0,25 М и два объема охлажденного 96% этанола. Раствор выдерживали 30-40 мин. при -20°C. Центрифугировали 10 мин. при комнатной температуре. Осадок промывают 600 мкл 70% этанола, центрифугируют 10 мин. при 12000 *q*, подсушивают 10-15 мин. и растворяют в стерильной деионизированной воде в объеме, равном половине первоначального объема крови.

Выделение геномной ДНК можно проводить любым другим методом, позволяющим получить нуклеиновую кислоту, пригодную для амплификации в ПЦР.

Выделенную ДНК амплифицируют в 25 мкл реакционной смеси следующего состава:

- р-р ДНК	2-4 мкл
- 10 <sup>×</sup> буфер ПЦР	2,5 мкл
- 2,5 мМ MgCl <sub>2</sub>	5 мкл
- 10 мМ dNTP	0,75 мкл
- праймеры	по 1 мкл каждого
- вода	до 25 мкл
- Taq-полимераза	1 ед. акт.

Смесь набирают непосредственно перед амплификацией, прогревают 5 мин. при 95°C, добавляют Taq-полимеразу и наслаивают 20 мкл минерального масла для предотвращения испарения.

Проводят 25-30 циклов амплификации в режиме:

- денатурация 30 с. при 94°C;
- отжиг - 30 с. при 48-65°C (температура подбирается опытным путем для каждой пары праймеров);
- синтез 90 с. при 72°C.

Если после 25-30 циклов реакции в пробе не обнаруживается специфический фрагмент (анализ электрофорезом в агаровом геле), то отбирают аликвоту 2-4 мкл и переносят в новую пробирку, содержащую реакционную смесь с внутренними праймерами (так называемая «Nested»-ПЦР), и проводят еще 25-30 циклов амплификации в том же режиме. Такая реамплификация позволяет увеличить как чувствительность, так и специфичность реакции.

**Электрофорез в геле агарозы.** Анализ продуктов реакции проводят методом электрофореза в 2% агарозном геле. Рассчитанное количество порошка агарозы и отмеренный объем 50 мМ буфера для электрофореза нагревают до полного растворения агарозы, остужают до 50-55°C, добавляют бромистый этидий до концентрации 0,5 мкг/мл и заливают гель, в который немедленно вставляют гребенку для получения в геле лунок для нанесения проб. Через 20-30 мин. после того, как застыла агароза, гель помещают в камеру для электрофореза, наливают 50 мМ буфер для электрофореза, наносят аликвоты реакционной смеси продуктов ПЦР, смешанные с буфером для нанесения проб, и проводят электрофорез при напряжении 100 В, пока бромфеноловый синий не пройдет 1,5-2 см от старта.

Учет результатов реакции.

Для идентификации специфического фрагмента использовали стандартные маркеры - наборы фрагментов ДНК известной длины. При просмотре геля в ультрафиолете присутствие фрагмента определенного размера свидетельствует о наличии в пробе вирусной ДНК.

**Результаты исследований.** Первый этап.

Провели исследование 100 проб сыворотки крови (для ПЦР - кровь стабилизировали).

Исследовали: 100 проб сыворотки крови в РИД, 10 объединенных проб сыворотки крови (пул 1:10) в ИФА, 100 проб сыворотки крови в ИФА (индивидуально), 100 проб крови методом ПЦР.

**Таблица 1 - Результаты исследования крови крупного рогатого скота различными методами**

Количество исследуемых животных (гол.)	РИД		ИФА (объединенные пробы)		ИФА (индивидуально)		ПЦР	
	+	-	+	-	+	-	+	-
100	14	86	3	7	17	83	19	81

По результатам исследования (таблица 1) было установлено, что ИФА и ПЦР-методы диагностики обладают большей чувствительностью к выявлению инфицированных животных и выявляют животных, которые при исследовании методом РИД были отрицательны.

Второй этап. Исследовали объединенные (10 голов) пробы крови в ИФА с добавлением 9 проб (заведомо отрицательных) и 1 пробы (заведомо положительной).

Таких испытуемых лунок было 10 с добавлением в каждую 1 пробы заведомо положительной пробы крови только с различной оптической плотностью от животных на разной стадии инфицирования:

- в 1-7 лунки в качестве 10-й положительной пробы была добавлена сыворотка крови от животных, реагирующих в РИД в ИФА и в ПЦР;
- в 8 лунку была добавлена кровь от животного, не реагирующего в РИД, реагирующего в ИФА, но с оптической плотностью пробы, приближающейся к значению 50, реагирующей в ПЦР;
- в 9-10 лунки была добавлена кровь от животного, не реагирующего в РИД и в ИФА, но давшего положительную ПЦР, с оптической плотностью незначительно ниже 50 и незначительно выше 50 (соответственно).

**Таблица 2 - Результаты исследования сыворотки крови КРС в ИФА с добавлением заведомо положительной 1 пробы в каждую лунку**

№ лунки	Оптическая плотность отрицательной пробы (9 голов)	Оптическая плотность положительной пробы (1 гол.)	Результат реакции
1	81,023	3,79	положительно
2	106,22	15,496	положительно
3	103,95	7,31	положительно
4	100,91	2,67	положительно
5	94,819	4,58	положительно
6	100,52	14,98	положительно
7	98,21	25,31	положительно
8	102,66	45,25	отрицательно
9	106,412	32,58	отрицательно
10	108,36	66,215	отрицательно

**Заключение.** По результатам проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. ПЦР-диагностика обладает большей чувствительностью, по сравнению с ИФА и РИД.
2. Чувствительность метода не позволяет выявить всех инфицированных животных исследуемого стада. Инфицированное животное остается в стаде до следующего исследования, которое, согласно Ветеринарно-санитарным правилам, в благополучном стаде будет через 2 года, а в неблагополучном - через 4 месяца, перезаражая здоровое поголовье, что ведет к распространению ЭЛ КРС (таблица 2).

**Литература.** 1. Белов, А. Д. О патогенезе лейкозов крупного рогатого скота / А. Д. Белов, Л. В. Рогожина, Г. В. Сноз // Ветеринария. – 1997. – Т. 2. – С. 16–20. 2. Вирусные болезни животных / В. Н. Сюрин [и др.]. – Москва : ВНИТИБП, 1998. – 928 с. 3. Возможности и ограничения использования ПЦР в диагностике и генотипировании вируса лейкоза крупного рогатого скота / В. А. Беляевская [и др.] // Актуальные вопросы зоотехнической науки и практики как основа улучшения продуктивных качеств и здоровья сельскохозяйственных животных: сборник трудов. – Ставрополь, 2003. – С. 275–278. 4. Галеев, Р. Ф. Диагностика и профилактика лейкоза КРС / Р. Ф. Галеев, А. А. Руденко, Ф. Р. Валиев // Практик. – 2003. – № 5/6. – С. 44–48. 5. Глазко, В. И. Современные направления использования ДНК-технологий / В. И. Глазко, Н. Н. Доманский, А. А. Созинов // Цитология и генетика. – 1998. – Т. 32, № 5. – С. 80–93. 6. Опыт ускоренного оздоровления племенного хозяйства от лейкоза / А. Г. Берзяз [и др.] // Ветеринария. – №12. – 1990. – С. 13–15. 7. Применение серологических методов и ПЦР для обнаружения вируса лейкоза крупного рогатого скота в образцах крови, молока и носовых истечений / Н. Т. Джапаралиев [и др.] // Достижения молодых ученых - в ветеринарную практику : материалы конференции молодых ученых / Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных. – Владимир : ОКНИИиМС, 2000. – С. 127–131. 8. Русиневич, А. А. Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота,

меры борьбы и профилактики в Республике Беларусь : монография / А. А. Русинович. – Витебск : ВГАВМ, 2016. – 264 с. 9. Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота : социально-экономическая значимость, диагностика, профилактика и ликвидация болезни / В. Максимович, И. Субботина, Н. Бабахина, Л. Кашпар // Ветеринарное дело. – 2019. – № 2. – С. 5–11. 10. Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота : социально-экономическая значимость, диагностика, профилактика и ликвидация болезни / В. Максимович, И. Субботина, Н. Бабахина, Л. Кашпар // Ветеринарное дело. – 2019. – № 3. – С. 4–9. – Окончание. 11. Эпизоотологическая оценка методов прижизненной диагностики лейкоза КРС / М. И. Гулюкин [и др.] // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2000. – № 3. – С. 60–62. 12. Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://lawru.info/dok/2000/08/23/n392082.htm>. – Дата доступа: 02.09.2019.

Статья передана в печать 10.10.2019 г.

УДК 619:613.636.083(075.8)

### МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ И БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КРОВИ ИНДЮШАТ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ В ПОДСТИЛКЕ СРЕДСТВА «УЛЬТРА-СОРБ»

Медведева Д.В.

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

Установлено, что использование средства для санации пола «Ультра-Сорб» способствует повышению содержания эритроцитов в крови на 21,8%, гемоглобина – на 11,4%, общего белка крови – на 5,4%. Полученный эффект связан с улучшением среды обитания птицы. **Ключевые слова:** морфология крови, биохимия крови, индюшата, средство для санации пола.

### MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF BLOOD IN TURKEY POULTS WITH THE USE OF «ULTRASORB» IN THEIR LITTER

Medvedeva D.V.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

It was found that the use of «Ultra-Sorb» for sanitation of floors promotes the increase of erythrocytes in the blood by 21,8%, hemoglobin – by 11,4%, total blood protein – by 5,4%. The resulting effect is associated with the improvement of the environment of birds. **Keywords:** blood morphology, blood biochemistry, turkey poults, floors sanitizer.

**Введение.** В современном мире обеспечение населения продуктами питания является важной экономической и социальной проблемой. Птицеводство на сегодняшний день остается наиболее реальным источником пополнения продовольственных ресурсов для человечества [1, 4, 5].

Индейководство широко развито во всех странах мира. Убойный выход тушек индеек достигает 87-90%, выход съедобных частей – 69-72%, мышечной ткани – 60-65%, в т.ч. грудных мышц – 28-35% от живой массы. Мясо индеек имеет особый привкус, свойственный мясу боровой дичи (рябчика, фазана и др.), и пользуется широким спросом населения как мясо праздничного стола [2, 8]. Из-за высоких диетических свойств индюшатина в развитых по птицеводству странах широко используется в лечебных, санаторно-курортных и оздоровительных учреждениях [3, 6, 7].

Цель работы – изучить морфологический и биохимический состав крови индюшат при использовании для обработки подстилки в помещениях для выращивания птицы разработанного автором статьи средства для санации пола «Ультра-Сорб».

**Материалы и методы исследований.** Работа выполнялась в 2018-2019 годах в условиях отделения «Хайсы» ОАО «Птицефабрика Городок» Витебской области и лаборатории кафедры гигиены животных. Отдельные исследования проводились в НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии УО ВГАВМ.

Объектом исследований служил молодняк индейки (кросса Big 6), мясо индеек, средство для санации, помещения для индейки.

Для проведения опытов по принципу аналогов подбирались птица одного кросса, пола, возраста, живой массы и продуктивности. Различия по живой массе и продуктивности между группами не превышали 3%. Условия содержания у индейки были одинаковыми во всех группах. Соблюдались плотность посадки, фронт кормления и поения. Кормление птицы соответствовало установленным нормам.

В опыте формировалось 3 группы молодняка индейки, по 100 голов в каждой. Первая группа была контрольной и в качестве подстилки на пол подсыпали опилки в расчете 8 кг/м<sup>2</sup>, вторая и третья группы были опытными, и к опилкам добавляли разработанное средство «Ультра-Сорб» в расчете 100 и 150 г/м<sup>2</sup>. Продолжительность опыта – 84 дня (второй период выращивания – 42-126 дней).

Во время проведения опыта поддерживались оптимальные параметры микроклимата, рекомендуемые температурный, световой режимы и ультрафиолетовое облучение. Все производственные