

Продолжение таблицы 1

Способ №5		1:8	1:200	1:100	1:200	1:200
Способ №6		1:16	1:400	1:200	1:200	1:400
Способ (контроль)	согласно НД	1:8	1:200	1:200	1:200	1:200

Из результатов, указанных в таблице 1, видно, что получение адгезинов эшерихий с высокой биологической активностью обеспечивает способ №4.

Таким образом, для повышения выхода и активности адгезинов экстракцию эшерихий проводят без отделения от культуральной среды, полученный экстракт очищают на фильтре ФПКН-3-0,5, а далее их нужно доочищать и концентрировать на мембранах УПМ-300 и УПМ-5.

Заключение. По результатам проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Получение адгезивного антигена необходимо осуществлять из баксуспензии эшерихий, отделенной от питательного раствора, путем очистки и концентрирования с помощью мембран УПМ-300 и УПМ-5.
2. Разработанные условия очистки и концентрирования адгезивных антигенов эшерихий позволяют получить очищенный препарат, удельная активность которого в 2 - 4 раза выше, чем неочищенного.

Литература: 1. Адгезивные антигены и энтеротоксины эшерихий, патогенных для молодняка сельскохозяйственных животных / Н.А. Соколова [и др.] // *Ветеринария*. – 1989. - № 5. – С. 33 – 35. 2. Волков, И.А. Вакцинопрофилактика колибактериоза свиней / И.А. Волков // *Промышленное и племенное свиноводство*. – 2008. - № 2. – С.44 – 45. 3. Головкин, А.Н. Фимбриальные адгезины энтеротоксигенных эшерихий / А.Н. Головкин // *Ветеринария*. – 1993. - № 9. – С. 31 – 32. 4. Головкин, А.Н. Средства диагностики и специфической профилактики колибактериоза нового поколения / А.Н. Головкин, В.А. Ушкалов // *Ветеринарные и зооинженерные проблемы животноводства*. – Витебск, 1996. – 92 с. 5. Гутковский, А.А. Колибактериоз телят и поросят / А.А. Гутковский, Г.Л. Дворкин // *Мн.: Ураджай*, 1989. – 160 с. 6. Зелютков, Ю.Г. Инфекционные энтериты новорожденных телят / Ю.Г. Зелютков // *монография*. – Витебск: УО ВГАВМ, 2006. – 188 с. 7. Инфекционные болезни животных / Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вашутин, Е.С. Воронин [и др.] // *М.: КолосС*, 2007. – 671 с. 8. Курашвили, Т.К. Обнаружение адгезивного антигена F41 у выделенных от поросят штаммов *E. COLI* / Т.К. Курашвили, Н.А. Соколова // *Ветеринария*. – 1991. – № 10. – С. 31 – 33. 9. Курашвили, Т.К. Адгезивный антиген / Т.К. Курашвили, Н.А. Соколова // *Ветеринария*. – 1991. - № 3. – С. 26 – 27. 10. Куриленко, А.Н. Колибактериоз молодняка / А.Н. Куриленко // *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. – 2005. - № 10. – С. 58 – 64. 11. Ломако, Ю.В. Адгезивные и энтеротоксигенные свойства штаммов кишечной палочки, выделенных у больных колибактериозом телят / Ю.В. Ломако // *Ветеринарная наука – производству: научные труды*. – Минск, 2002. вып.36. – С. 91 – 95. 12. Специфическая профилактика эшерихиоза животных / Ю.А. Малахов [и др.] // *Ветеринария*. – 1993. - № 8. – С. 5 – 7. 13. Gaastra, W. Host specific fimbrial adhesins et noninvasive enterotoxigenic *E. coli* strains / W. Gaastra, F. Graaf // *Microbiol. Rev.* – 1982. – V. 46, N 2. – P. 129 – 161. 14. Isaacson, R.E. *Escherichia coli* 987P pili: purification and partial characterization / R.E. Isaacson, P. Richter // *J. Bacteriol.* – 1981. – Vol.146. – P. 784 – 749.

Статья поступила 23.02.2010 г.

УДК 619:616.921.5:636.4

СПОСОБ СТАБИЛИЗАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ЗАДЕРЖКИ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Корочкин Р.Б., Прудников В.С., Вербицкий А.А., Прудников А.В.

Учреждение Образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Авторами предложен способ стабилизации эритроцитов, предназначенных для постановки реакции задержки гемагглютинации путем фиксации полученных из крови эритроцитов 50%-ным раствором формалина, в результате чего они сохраняют свою способность к агглютинации вирусом гриппа в течение длительного срока. Постановка реакции задержки гемагглютинации в диагностике гриппа свиней с использованием фиксированных эритроцитов не отличается по специфичности и чувствительности от аналогичной реакции с использованием свежих эритроцитов.

The authors have developed a method for fixation of RBC intended for hemagglutination inhibition test through the use of 50% formalin. The fixed erythrocytes preserve the capability for agglutination by influenza virus for a long time. The hemagglutination inhibition test using the fixed red blood cells has the same sensitivity and specificity of the analogous test using fresh red blood cells.

Введение. Одной из проблем современного свиноводства являются острые респираторные болезни свиней, которые регистрируются практически во всех странах мира, причиняя огромный экономический ущерб. В некоторых хозяйствах заболеваемость ими свиней может составлять 30-70% с уровнем летальности 40% [5, с. 277-290].

Во многих случаях инфекционная патология дыхательной системы имеет полиэтиологическую природу, причем наиболее часто изолируемыми агентами являются *Mycoplasma* spp., вирус РРСС, микроорганизмы родов *Actinobacillus* и *Haemophilus*, а также вирус гриппа свиней (ВГС), который многими авторами признается вторым по важности возбудителем инфекционных патологий дыхательной системы [6 с. 123-129, 8 с. 36-42]. Большинство случаев клинической патологии обусловлено серовариантами Н1N1, Н1N2, Н3N2, являющимися эпидемическими серовариантами для людей [7 с. 8243-8251, 4 с. 503-506].

Диагностика гриппозной инфекции главным образом основана на обнаружении антител к вирусу в реакции задержки гемагглютинации (РЗГА) на основе способности вируса к гемагглютинации эритроцитов [3, с. 2947-2955].

При постановке реакции задержки (торможения) гемагглютинации в диагностике вирусных болезней животных и человека используют в качестве компонента 1%-ную взвесь эритроцитов, получаемых из крови животных-доноров (куры, морские свинки и др.) после дефибрирования или стабилизации химическими веществами (трилон Б, натрия цитрат, гепарин и др.) с последующим отделением от них плазмы путем многократного центрифугирования. Приготовленные таким образом эритроциты способны вступать во взаимодействие с рецепторами вируса (гемагглютинины) в результате чего наступает их агглютинация (склеивание).

Однако этот способ постановки реакции задержки (торможения) гемагглютинации требует использования только свежеприготовленных эритроцитов, сохраняемых в холодильнике (4°C) непродолжительное время, не более 3-5 дней [1, с.226-227], что обуславливает необходимость постоянного содержания животных-доноров в лаборатории.

Наша научно-исследовательская работа направлена на разработку способа стабилизации эритроцитов, предназначенных для постановки реакции задержки (торможения) гемагглютинации, позволяющего сохранять и использовать их в качестве компонента реакции в течение одного года (срок наблюдения) с сохранением чувствительности и специфичности реакции. Поставленная цель достигалась за счет стабилизации полученных эритроцитов 50%-ным раствором формалина.

Формалин (40%-ный водный раствор формальдегида) является наиболее распространенной фиксирующей жидкостью с достаточно высокой фиксирующей способностью и используется при проведении гистологических и патогистологических исследований. В основе стабилизирующего действия формальдегида лежит его способность взаимодействовать с клетками и вызывать стабилизацию белков цитоплазматической мембраны, в результате чего клетка приобретает более высокую стабильность [2].

Материалы и методы. Целью исследования являлось совершенствование методов диагностики гриппа свиней на основе разработанной схемы стабилизации эритроцитов, предназначенных для постановки реакции задержки (торможения) гемагглютинации.

Объектом исследования служили методы серологической диагностики вирусных инфекций. Предметом исследования являлись фиксированные эритроциты и их способность к специфической гемагглютинации вирусом.

Исследования проводили в условиях лаборатории кафедры микробиологии и вирусологии УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины».

Стабилизацию эритроцитов осуществляли следующим образом. Получение эритроцитов из крови животных-доноров проводили по общепринятой методике. Затем из полученного осадка эритроцитов готовили 10%-ную взвесь путем добавления девяти объемов стерильного изотонического раствора (0,85%-ный раствор натрия хлорида). К полученной 10%-ной взвеси эритроцитов при постоянном перемешивании постепенно добавляли равный объем 50%-ного раствора формалина, который предварительно готовили путем смешивания равных объемов продажного формалина и изотонического раствора (0,85%-ный раствор натрия хлорида). После тщательного перемешивания смесь оставляли на 48 часов при комнатной температуре. После осаждения эритроцитов на дно раствор формалина удаляли и к осадку эритроцитов добавляли 10 объемов стерильного изотонического раствора, затем смесь встряхивали и дополнительно оставляли в холодильнике при 4°C на 8 часов до полного оседания эритроцитов. Образовавшуюся надосадочную жидкость повторно удаляли и вновь добавляли стерильный изотонический раствор в том же объеме. Полученную суспензию центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 минут, надосадочную жидкость отсасывали и к осадку эритроцитов добавляли стерильный изотонический раствор в объеме, равном удаленному. Отмывание эритроцитов от формалина таким образом повторяли 6 раз, после чего к осадку эритроцитов добавляли девять объемов стерильного изотонического раствора, тщательно перемешивали до получения равномерной смеси и взвесь эритроцитов разливали в стерильную стеклянную посуду. Полученную таким образом 10%-ную взвесь формализированных эритроцитов хранили в холодильнике при 4°C в течение одного года.

В день постановки реакции из исходной 10%-ной взвеси фиксированных эритроцитов готовили 1%-ную взвесь на изотоническом растворе и использовали в реакции. Реакцию задержки гемагглютинации осуществляли двумя способами: с использованием свежих эритроцитов, полученных от 6-мес. петуха, а также фиксированных нашим способом эритроцитов.

Для постановки реакции задержки гемагглютинации был использован диагностикум сухой гриппозный типа А производства НИИ гриппа РАМН (серия №57, контроль №417). Исследуемые сыворотки крови для удаления неспецифических ингибиторов гемагглютинации и сывороточных агглютининов предварительно инактивировали при температуре 56°C в течение 30 минут с последующей обработкой 10%-ной взвесью эритроцитов кур в течение 12 часов при 4°C. В реакции задержки гемагглютинации исследовали двукратные разведения сыворотки крови от 1:10 до 1:320 в объеме 0,1 мл. В качестве растворителя компонентов реакции использовали стерильный изотонический раствор натрия хлорида. Активность вирусного гемагглютинина ВГ определяли в реакции гемагглютинации с разведениями от 1:5 до 1:640. Титром вирусного гемагглютинина ВГ считали максимальное его разведение, агглютинирующее 1%-ную взвесь эритроцитов на ++ (принимали за одну гемагглютинирующую единицу - 1 ГАЕ). В реакции задержки гемагглютинации использовали 0,1 мл вирусного антигена в разведении, имеющем активность 4 гемагглютинирующие единицы (ГАЕ).

Контроль реакции задержки гемагглютинации определяли по тестам на самоагглютинацию 1%-ной взвеси эритроцитов, а также на агглютинацию взвеси эритроцитов каждой пробой сыворотки крови. При этом во всех контролируемых лунках отмечали отсутствие самоагглютинации 1%-ной взвеси эритроцитов и агглютинации эритроцитов сыворотками крови.

Постановку реакции проводили при комнатной температуре в стандартных 96-луночных панелях для постановки серологических реакций с объемом лунки 0,3 мл. Учет реакции проводили через 45-60 минут после добавления к смеси исследуемой сыворотки и стандартного вирусного антигена 1%-ной взвеси эритроцитов.

Всего было происследовано 58 проб сывороток крови поросят послеотъемного возраста на наличие антител к сероварианту H1N1.

Совпадение результатов исследования с использованием фиксированных и свежих эритроцитов оценивали статистически по соотношению логарифмических показателей титров антител в положительных пробах.

Результаты исследований. Использование в реакции задержки (торможения) гемагглютинации стабилизированных формалином эритроцитов, сохраняемых при 4°C в течение одного года, не оказывает влияния на качество реакции. При этом стабилизированные эритроциты полностью сохраняют способность взаимодействовать с гемагглютинами вируса.

При сравнении результатов определения специфических антител к вирусу гриппа в реакции задержки гемагглютинации с использованием свежих и стабилизированных эритроцитов установлено сохранение чувствительности и специфичности реакции, так как были получены аналогичные результаты исследования сыворотки крови (см. табл. 1).

Таблица 1 - Результаты исследования проб сывороток крови свиней на наличие антител к сероварианту H1N1

РТГА с использованием	Количество исследованных проб	Количество положительных проб	Титры антител (абсолютный / логарифмический)				
			1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
Фиксированных эритроцитов	58	14	-	2	9	3	-
Свежих эритроцитов	58	14	-	2	8	4	-

Также получены аналогичные контрольные результаты на самоагглютинацию стабилизированных эритроцитов и агглютинацию в присутствии сыворотки крови при традиционной методике постановки реакции и с использованием стабилизированных эритроцитов.

При сравнении чувствительности реакции с использованием фиксированных и свежих эритроцитов в положительных пробах совпадаемость результатов определена по соотношению логарифмических показателей титров антител в положительных пробах (см. табл. 2).

Таблица 2 - Сравнение чувствительности реакции торможения гемагглютинации в положительных пробах

№ пробы	Титры антител		Соотношение	Совпадаемость результатов, (%)
	РТГА с фиксированными эритроцитами (- log2)	РТГА со свежими эритроцитами (- log2)		
1	4,33	5,33	0,81	81,3
2	4,33	4,33	1	100
3	3,33	3,33	1	100
4	5,33	5,33	1	100
5	4,33	4,33	1	100
6	3,33	3,33	1	100
7	4,33	4,33	1	100
8	4,33	4,33	1	100
9	5,33	5,33	1	100
10	4,33	4,33	1	100
11	4,33	4,33	1	100
12	4,33	4,33	1	100
13	4,33	4,33	1	100
14	5,33	5,33	1	100
ВСЕГО	61,62	62,62	0,98	98

Результаты исследований сыворотки крови свиней для обнаружения специфических антител к вирусам гриппа подтверждают возможность использования в реакции задержки (торможения) гемагглютинации стабилизированных формалином эритроцитов в течение одного года после их получения, в результате чего отпадает необходимость постоянного приготовления свежих эритроцитов для постановки реакции.

При этом в течение указанного периода они оказались полностью пригодны для постановки реакции задержки (торможения) гемагглютинации, так как совпадаемость результатов составила 98%.

Заключение. Способ стабилизации эритроцитов, предназначенных для постановки реакции задержки (торможения) гемагглютинации, основан на фиксации полученных из крови эритроцитов равным объемом 50%-ного раствора формалина (к 40%-ному раствору формальдегида добавляют одинаковый объем изотонического раствора натрия хлорида). Фиксация эритроцитов проводится при комнатной температуре в течение 48 часов с последующим шестикратным отмыванием их стерильным изотоническим раствором натрия хлорида путем центрифугирования. Стабилизированные таким образом эритроциты хранят при 4°C до одного года (срок наблюдения), в течение которого они полностью пригодны в качестве компонента реакции с сохранением ее чувствительности и специфичности.

Таким образом, в результате исследований нами сделаны следующие выводы:

1. Для фиксации эритроцитов, предназначенных для постановки реакции задержки (торможения) гемагглютинации возможно использование раствора формальдегида.

2. Фиксированные таким образом эритроциты сохраняют способность к гемагглютинации вирусом гриппа в реакции задержки гемагглютинации в течение одного года.

3. Постановка реакции задержки гемагглютинации с использованием фиксированных эритроцитов дает возможность достоверной серологической диагностики гриппа свиней.

Литература. 1. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных. Справочник. Москва, Агропромиздат, 1986, с.226-227. 2. Препарат для фиксации материала для микроскопического исследования : пат. 5417 Респ. Беларусь С1 G01N1/36 / И.М. Грошев [и др.]; заявитель ОАО «Витебскдрев» - №19990188 ; заявл. 26.02.99; опубл. 30.09.03 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці - 2003. 3. Brown, I.H. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of the H1N2 virus of novel genotype / I.H. Brown, P.A. Harris, J.M. McCaulery, D.J. Alexander // Journal of General of Virology. - 1998. - N. 79. - P. 2947-2955. 4. Castrucci, M.R. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs / M.R. Castrucci [et al.]. // Virology - 1993. - N. 193. - P. 503-506. 5. Easterday, B.C. & Van Reeth K. (1999). Swine influenza / B.C. Easterday [et al.] // Diseases of Swine / B.E. Straw, S. D'Allaire, W.L. Mengeling, D.J. Taylor, - Iowa State University Press, Iowa. - 1999. - P. 277-290. 6. Loeffen, W.L. Survey of infectious agents involved in acute respiratory disease in finishing pigs / W.L. Loeffen E.M. Kamp, N. Stockhofe-Zurwieden, A.P. van Nieuwstadt // Veterinary Recommendations. - 1999. - N45. - P. 123-129. 7. Noble, S. Antigenic and genetic conservation of the haemagglutinin in H1N1 swine influenza viruses / S. Noble, M.S. McGreggor, D.E. Wentworth, V.S. Hinshaw // Journal of General of Virology. - 1999. - N. 74. - P. 8243-8251. 8. Swenson, S.L. A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs / S.L. Swenson K.E. Lechtenberg, J.G. Landgraf, B.J. Schmitt // Journal of Veterinary Diagnosis and Investments. 2001. - N. 13. - P. 36-42.

Статья поступила 24.02.2010 г.

УДК 619 : 616. 155.194 : 663.4

ОЦЕНКА ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ФЕРРОВИТАЛ В УСЛОВИЯХ КЛИНИКИ И ПРОИЗВОДСТВА

Курдеко А.П.* , Зайцев В.В.** , Дремач Г.Э.***, Зайцева А.В.***

*УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия», г. Горки, Республика Беларусь

**УП «Витебская биофабрика», г. Витебск, Республика Беларусь

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

По результатам проведенной работы авторами статьи установлено, что препарат Ферровитал обладает выраженной профилактической и терапевтической эффективностью как в условиях клиники, так и в условиях производства.

The authors of the article state that Ferrovital has a distinctive preventive and therapeutical effect on field and experimental trials.

Введение. В решении важнейшей проблемы обеспечения человечества продуктами питания ведущее место принадлежит свиноводству – наиболее рентабельной отрасли животноводства. Основной путь развития мирового свиноводства состоит в освоении интенсивных технологий производства, базирующихся на полноценном кормлении, создании оптимальных условий содержания применительно к различным половозрастным группам животных, использовании высокопродуктивных пород и типов свиней (Е.П. Шувалова, 2001).

Интенсивность производства обуславливает резкое усиление физиологических процессов у новорожденных животных, что требует поступления в растущий организм повышенного количества питательных и биологически активных веществ. В результате возникают различные негативные состояния. Особенно широко в свиноводстве распространены нарушения обмена железа и других микроэлементов, связанные с избытком, дефицитом или дисбалансом их в организме (Г.А. Войт, 2005).

Одной из наиболее распространенных болезней незаразной патологии, особенно у поросят, является алиментарная анемия, которая приводит к значительным экономическим потерям в свиноводстве, обусловленным в основном задержкой роста, снижением прироста и продуктивности, гибели животных (В.Г. Герасименко и др., 2001). Поэтому поросята в обязательном порядке должны обрабатываться против алиментарной анемии. Для профилактики и лечения железодефицитной анемии у поросят предложен ряд препаратов на основе комплекса железа с низкомолекулярным декстраном. Поскольку нарушение гемопоза имеет полиэтиологический характер, обусловленный недостатком не только железа, но и ряда других биологически активных веществ, железодекстрановые препараты не всегда дают желаемый эффект, так как восполняют только дефицит железа (А. Алимов и др., 2008). Поэтому особую актуальность приобретает изыскание средств комплексной профилактики алиментарной анемии и вторичных иммунодефицитов (И.М. Карпуть; М.Г. Николадзе, 2001, 2003, 2005).

В связи с этим сотрудниками УО ВГАВМ и специалистами УП «Витебская биофабрика» был разработан новый отечественный железодекстрановый препарат «Ферровитал».

Цель настоящих исследований – определить профилактическую и терапевтическую эффективность применения препарата в условиях клиники и производства.

Материал и методы исследований. Работа по изучению профилактической и терапевтической эффективности выполнялась в НИИПВМиБ, в клинике кафедры внутренних незаразных болезней УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины».

Для проведения исследований по изучению профилактической эффективности препарата было сформировано 3 группы поросят первых 2-3 дней жизни. Группы животных были сформированы по принципу условных аналогов.

Животным первой группы (n=35) вводили препарат «Ферровитал», изготовленный УП «Витебская биофабрика» в мае 2008 г., серия №01, контроль №01. Препарат вводили внутримышечно в дозе 2-3 см³, с повторным введением данной дозы через 10 суток.

Поросятам второй группы (n=34) инъекцировали препарат «Урсоферран» 100 для инъекций. Препарат вводили внутримышечно в дозе 1,5 см³.