Срок выздоровления животных при этом по сравнению с другими препаратами и способами лечения сокращался в среднем на 6 дней.

Высокую активность испытанный препарат проявил и против клещей из рода *Notoedres*. Двукратная обработка кошек разных пород и половозрастных групп позволила полностью оздоровить от данного акароза 97,5% из 72 пролеченных животных. При трехкратной с интервалом 5-7 дней обработке кошек получена 100% эффективность препарата.

Срок выздоровления животных при применении препарата «Ивермек-гель» по сравнению с другими препаратами и способами лечения сокращался в среднем на 9 дней.

В результате исследований по изучению акарицидной активности нового препарата против клещей из рода *Demodex*, установлена высокая эффективность терапии демодекоза собак препаратом «Ивермек-гель» (табл. 4).

Таблица 4 - **Эффективность «Ивермек-геля» при демодекозе собак и кошек**

Препарат или способ лечения	Вид животного	Кол-во животных	Кратность применения	Средняя продол-жительность лечения, дни	Эффектив-ность, %
Ивермек-гель	Собаки	53	3-4 раза с интервалом 5-7 дней	21	81,2
	Кошки	6		24,5	83,3
Неостомазан (1:400) или Бутокс (1:1000)	Собаки	10	4-5 - кратно с интервалом 7 дней	26	40,0
	Кошки	6		27	33,3
Мазь аверсектиновая	Собаки	10	4-5 - кратно с интервалом 5-7 дней	24	62,5

Эффективность нового акарицидного геля была выше, чем у аверсектиновой мази и растворов пиретроидов (Неостомазан или Бутокс) на 18,7% и 41,2% соответственно. Срок выздоровления животных при применении препарата «Ивермек-гель» по сравнению с другими препаратами сокращался в среднем на 3-5 дней.

Сходные данные получены и при терапии демодекоза кошек. Причем эффективность нового акарицидного геля «Ивермек-гель» была выше, чем у растворов пиретроидов (Неостомазан или Бутокс) на 50%. Срок выздоровления животных при применении препарата «Ивермек-гель» по сравнению с другими препаратами сокращался в среднем на 2,5 дня.

Заключение. Препарат «Ивермек-гель» по степени токсичности относится к малоопасным для теплокровных животных (4 класс опасности). Ежедневное применение препарата в течение 14 дней не оказывает отрицательного влияния на гомеостаз организма собак и не обладает токсическим воздействием. Изученное лекарственное средство не обладает местнораздражающими и сенсибилизирующими свойствами. Полная гибель клещей in vitro происходит после 30 минутной экспозиции препарата. Остаточное акарицидное действие лекарственного средства на обработанных поверхностях поддерживается в течение 15 дней. Препарат «Ивермек гель» проявляет 100% эффективность против *Otodectes canis* у собак разных пород и половозрастных групп. 2-3 –кратная обработка препаратом «Ивермек-гель» против клещей из рода Sarcoptes у собак приводит к их полному выздоровлению. При нотоэдрозе трехкратная с интервалом 5-7 дней обработка кошек обладает 100% эффективностью. Установлена высокая эффективность терапии демодекоза собак и кошек препаратом «Ивермек-гель». Сроки выздоровления животных по сравнению с аналогами сокращаются при отодектозе на 7-12 дней; саркоптозе и нотоэдрозе – на 6-9 дней и при демодекозе – на 2,5-5 дней.

Литература. *1. Березкина С.В. Микрокапсулированный нафтамон при трихостронгилидозах овец.//Материалы научной конференции. Профилактика гельминтозов с/х животных в зонах отгонного животноводства и мелиорации земель. М.-1986.-С. 23-24. 2. Березкина С.В., Головкина Л.П., Дриняева В.А., Юркив В.А., Волокова Г.Н. Природные авермектины для лечения экто- и эндопаразитов животных.//Материалы конференции «Систематика, таксономия и фауна паразитов», М. Медицина, 1984.-Т. 1.-С. 138-139. 3. Березкина С.В., Головкина Л.П. Противопаразитарные препараты на основе аверсектина С.//Ветинформ, 1998,- № 1.-С. 4. 4. Бычкова Л.В., Нечаева О.Н., Шустова Ю. Комплексный метод борьбы с демодекозом собак//Материалы научно-производственной конференции, повещенной 55-летию ГУ краснодарской НИВС Краснодар -2001.–Т. № 1.-С. 199-200. 5. Волков Ф.А., Апалькин В.А. Ивермектин в ветеринарии.-1995.-Новосибирск. - С. 5-6. 6. Голубцова А.В., Золототрубов А.П. Демодекоз кошек, клинический случай//Материалы научно-производственной конференции по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии. Казань.-2001.-Ч. 1.-С. 198.*

УДК 619:576.895.773.4

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИГЕНА ИЗ ЛИЧИНОК HYPODERMA BOVIS ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГИПОДЕРМАТОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ИФА

Степанова Е.А., Якубовский М.В., Трус И.А., Мясцова Т.Я., Степанов С.Н.
РДУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,
г. Минск, Республика Беларусь

В статье приводятся данные по разработке антигена из личинок подкожного овода (Hypoderma bovis) для диагностики спонтанного гиподерматоза крупного рогатого скота методом ИФА с использованием сывороток крови или молока.

In article, the data on development of cattle grubs (Hypoderma bovis) antigen and results of ELISA-test with use of serum and milk samples at spontaneous cattle hypodermotosis are submitted.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Введение. Гиподерматоз крупного рогатого скота является повсеместно распространенной инвазией. На территории Республики Беларусь инвазированность животных личинками подкожного овода в среднем в 1997 – 1998 гг. регистрировалась на уровне 17,7%, а в отдельных хозяйствах – до 65,0 – 85,0%. В последние годы (2001 – 2008 гг.) она составляет 0,9 – 4,9% [6, 7].

На крупном рогатом скоте паразитируют два вида Hypoderma bovis: De Geer – строка, или обыкновенный подкожник и Hypoderma lineatum De Villers – пищеводник, или южный подкожник [1, 4]. Ранее на территории Республики Беларусь регистрировались оба вида, однако пищеводник встречался достаточно редко [8].

В результате проведенных нами исследований (2001 – 2008 гг.) на территории республики обнаружен только один вид подкожного овода – hypoderma bovis de geer – строка [6, 7].

Для выявления животных на начальных стадиях развития личинок подкожного овода предложен ряд серологических способов с помощью антигена содержащего белок личинок.

Первыми методами, которые пытались применить для ранней диагностики гиподерматоза, были РИД (Boulard, Weintraub, 1973; Yamov, 1977), иммуноэлектрофорез (Boulard, Petithory, 1977) и РНГА (Boulard, и др.1970; Senet и др., 1982). Baldelli и др. (1981) впервые описали использование ИФА для выявления антител к антигенам личинок подкожного овода у крупного рогатого скота. В последующем в этом же направлении работали ряд ученых, исследуя чувствительность ИФА для выявления антител в сыворотке крови и в молоке (Sinclair, Wassall, 1983; Boulard, 1985; Schwinghammer и др. 1988; Pruett и Temeyer, 1989; Boulard и Villejoubert, 1991; Colwell,1991; Webster, 1995; Pruett и Stromberg, 1995). В настоящее время ИФА для постановки диагноза на гиподерматоз используется в ряде странах (Бельгия, Франция, Италия, Марокко, Польша, Испания, Швейцария и Великобритания) [2, 3, 6, 7, 9].

Следует отметить, что многие из предложенных способов ранней диагностики имеют ряд недостатков.

Разработан способ диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота с помощью реакции непрямой гемагглютинации [2, 9], основанный на том, что эритроциты, на которых предварительно адсорбированы антигены или антитела, способны агглютинироваться в присутствии гомологичных антител или антигенов [5].

Для диагностики гиподерматоза с помощью реакции непрямой гемагглютинации получают суспензию эритроцитов барана, отмывают физ.раствором, стабилизируют их 3% раствором формалина, тонизируют раствором танина для повышения сорбционной способности и осаждаемости, сенсибилизируют раствором антигена 1:5 [2, 5, 9].

Исследуемые сыворотки разводят (начиная с разведения 1:200) нормальной кроличьей сывороткой, разведенной фосфатно-солевым буфером, и вносят по 0,5 мл каждого разведения в луночки пластин, добавляют 1 – 2 капли диагностикума. Реакцию учитывают спустя 18 – 20 часов по характеру осадка на дне лунок [2, 5, 9].

Однако описанный способ подготовки сенсибилизированных эритроцитов и других компонентов для реакции непрямой гемагглютинации представляет собой трудоемкий процесс, несмотря на его достаточно высокую эффективность (98,5 – 100,0%).

В последнее время в литературе все чаще предлагается использовать для диагностики гиподерматоза антиген, содержащий белок личинок подкожного овода, применяемый в иммуноферментном анализе (ИФА) [3].

Но недостатком всех описанных антигенов для ИФА является то, что для его получения используются личинки Hypoderma lineatum, которые не обитают на территории Республики Беларусь. Также при получении этого антигена не используется хитин личинок, который содержит большое количество специфичных водорастворимых белков, а отделение его также усложняет процесс получения антигена. При очистке антигена используются аффинная и ионообменная хроматография, которые являются технологически трудоемкими и дорогостоящими процессами, требующими высокоточного оборудования.

В настоящее время для диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота в Республике Беларусь применяется метод, основанный на проявлении клинических признаков. Однако данный метод не позволяет диагностировать болезнь на первых этапах заражения, что приводит к длительному (7 – 9 месяцев) существованию паразита в организме животного. Кроме того, этот метод нельзя использовать для постановки диагноза на гиподерматоз всему стаду одновременно, так как заболевание не проявляется у всех животных в одно и то же время. В связи с тем, что невозможно выявить больных животных на ранних стадиях заболевания, приходится применять лечебно-профилактические обработки всех животных, что увеличивает себестоимость сельскохозяйственной продукции.

Сотрудниками отдела паразитологии в 2000 – 2005 гг. был разработан аллерген из личинок подкожного овода для ранней аллергической диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота (ТУ 600049853.086–2006), который обладает эффективностью 95 – 98%. Получено уведомление о положительном результате предварительной экспертизы на заявку на выдачу патента «Аллерген для диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота, способ его получения и способ использования» (авторы Якубовский М.В., Степанова Е.А., Лысенко А.П.) от 01.03.2007 № а20070220 [6, 7].

Способ аллергической диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота основан на возникновении у животных, инвазированных личинками подкожного овода, реакции гиперчувствительности замедленного типа на гиподерматозный антиген. Однако недостатком данного способа является то, что для проведения диагностики требуется большое количество времени, учет реакции проводится спустя 24 – 48 часов, при повторном обследовании животных, что требует их повторной идентификации и фиксации. При проведении диагностики расходуется большое количество антигена на одно исследование, а наработка его из-за малого веса личинки и трудоемкости их сбора является проблематичной.

Целью наших исследований было создание дешевого, эффективного способа получения антигена для диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота и способа диагностики, позволяющего выявлять заболевание на начальных этапах его развития.

Для изготовления антигена в качестве сырья использовали личинок подкожного овода вида Hypoderma bovis, единственного обитающего на территории Республики Беларусь. Личинки подкожного овода являются промежуточной стадией метаморфоза имаго подкожного овода рода Hypoderma, отряда Diptera (двукрылые), подотряда Brachycera (короткоусые), вид Hypoderma bovis [1].

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Материалы и методы исследований. Исходный материал (личинки Hypoderma bovis II и III стадий) собирали при убое больных гиподерматозом животных на мясокомбинате. Полученные личинки 5 – 6 раз отмывали в физиологическом растворе.

1. Для получения экскреторных антигенов отмытые личинки H. bovis сразу после сбора на мясокомбинате поместили в физиологический раствор (37°С) и инкубировали в течение 24 часов при 37°С. Полученный раствор профильтровали и центрифугировали при 5000 g в течение 40 мин.

2. Для получения 1 серии соматических антигенов личинки измельчили, используя мельницу «Retsch Grindomix GM200», с последующей гомогенизацией на гомогенизаторе «IKA Ultra-Turrax Tube Drive» (пробирки BMT-20). Гомогенат центрифугировали при 5000g в течение 20 мин. для удаления детрита. Далее полученный раствор подвергли ультразвуковой дезинтеграции на УЗДН – 1 при 35 кГц. Надосадочную жидкость подвергли очистке фракционированием сульфатом аммония (45-55% насыщения).

3. Для получения 2 серии соматических антигенов личинки измельчили, используя мельницу «Retsch Grindomix GM200», с последующей гомогенизацией на гомогенизаторе «IKA Ultra-Turrax Tube Drive» (пробирки BMT-20). Гомогенат центрифугировали при 5000g в течение 20 мин. для удаления детрита. Далее полученный раствор подвергли ультразвуковой дезинтеграции на УЗДН – 1 при 35 кГц. Надосадочную жидкость подвергли очистке фракционированием сульфатом аммония (20 – 25% насыщения).

4. Для получения 3 серии соматических антигенов личинки измельчили, используя мельницу «Retsch Grindomix GM200», с последующей гомогенизацией на гомогенизаторе «IKA Ultra-Turrax Tube Drive» (пробирки BMT-20). Гомогенат центрифугировали при 5000g в течение 20 мин. для удаления детрита. Далее полученный раствор подвергли ультразвуковой дезинтеграции на УЗДН – 1 при 35 кГц. После ультразвуковой дезинтеграции осуществили концентрирование на мембране с порогом разделения 100 ± 10 кДа.

Содержание белка в полученных образцах определили методом осаждения ТХУ и спектрофотометрии при 540 нм.

Диагностическую эффективность приготовленных серий антигенов определили в иммуноферментном анализе (непрямая гетерогенная твердофазная модификация ИФА) с сыворотками крови и молока крупного рогатого скота, спонтанно инвазированного гиподерматозом.

Эффективность ранней диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота методом ИФА с использованием экспериментального образца антигена определяли в хозяйствах Минского района, где подобрали 2 группы животных в количестве 24 и 52 головы предварительно не обработанных с профилактической целью противооводовыми препаратами. Формирование животных в группы провели на основании результатов аллергической диагностики гиподерматоза с использованием аллергена из личинок подкожного овода (ТУ 600049853.086-2006).

Превышение оптической плотности исследуемого образца над контролем (S/N) в 1,5 и более раз свидетельствовало об инвазировании крупного рогатого скота личинками подкожного овода - больное животное.

Результаты исследований. Были получены 4 серии антигена из личинок подкожного овода (Hypoderma bovis), диагностическая эффективность которых в ИФА для диагностики гиподерматоза представлена в таблице 1.

Таблица 1 – **Испытание приготовленных 4-х серий антигенов с сыворотками крови и молоком животных при клиническом проявлении гиподерматоза крупного рогатого скота**

Используемая серия антигена	Среднее превышение оптической плотности положительной пробы над отрицательной	
	сыворотки крови	молоко
Экскреторный антиген	1,08±0,41	0,97±0,26
1 серия соматического антиген	1,7±0,11	1,57±0,13
2 серия соматического антиген	1,23±0,29	1,11±0,36
3 серия соматического антиген	1,12±0,37	0,90±0,29

Таким образом, соматический антиген 1-й серии показал наиболее приемлемые результаты для дальнейшего его использования (наибольшее значение среднего превышения оптической плотности положительной пробы над отрицательной).

Далее работа была направлена на оптимизацию параметров диагностики для увеличения ее диагностической значимости.

При испытании использования различных составов буферных растворов наиболее высокие показатели среднего превышения оптической плотности положительной пробы над отрицательной (в 2 раза и более) были получены при сочетании следующих буферов: КББ 0,15 М, с pH 9,8; ФСБТ 0,1 М фосфатный буфер на бидистиллированной воде, 0,05% твин-20, pH 7,4.

При проведении серии опытов с различным временем инкубирования планшета на начальном этапе установлено, что при инкубировании планшета с антигеном в течение 5 – 7 часов результаты исследований резко снижались (превышение оптической плотности положительной пробы над отрицательной было в 1,2 – 1,3 раза), тогда как при более длительной инкубации (14 – 24 часа) наблюдались схожие результаты (превышение оптической плотности положительной над отрицательной сывороткой было в 2 раза и более). Наиболее приемлемые результаты были достигнуты при инкубировании планшета с антигеном в течение 8 – 12 часов (превышение оптической плотности положительной над отрицательной сывороткой было в 2 раза и более).

Таким образом, были подобраны этапы и компоненты для приготовления антигена из личинок подкожного овода предназначенного для выявления животных, инвазированных личинками Hypoderma bovis на ранних стадиях развития заболевания по исследованию сыворотки крови или молока.

Использование вышеуказанных параметров в их совокупности, позволило подобрать наиболее оптимальные этапы приготовления антигена из личинок Hypoderma bovis для ранней диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота позволяющего выявлять инвазированных животных на начальных этапах развития заболевания.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

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 были, тогда как у животных, положительно реагировавших в ИФА, при визуальном осмотре были обнаружены гиподерматозные желваки, с интенсивностью инвазии 1-8 личинкок 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., Мясцова 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. Мясцова // Сборник статей Международной научно-практической конференции, Воронеж, 22 – 23 июня 2006 года. – Воронеж: «Научная книга», 2006. – С. 377-380. 8. Фишалевич, М.А. Распространение оводов, паразитирующих на крупном рогатом скоте и лошадях в Белоруской ССР / М.А. Фишалевич // Труды ВНИИВС, 1962. – С. 44-47.9. Ямов, В. Раняя 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 содержание транзиторных микроорганизмов: аэробных бацилл, микромицет, протея, клостридий, стрептококков и стафилококков.

Variations in intestinal microflora of dogs with mono- and mixed infestations, its comparative evaluations with healthy conditions are indicative of redaction 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

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ