

препарата наступило у 16-ти коров (34,0%), положительный результат лечения получен от трех введений - у 18-ти больных коров (38,3%), двум коровам потребовалось 4 введения тетрамаста для полного выздоровления.

Таким образом, тетрамаст проявил высокую терапевтическую эффективность при субклиническом и серозно-катаральном маститах: от одного и двух его введений в пораженные доли наступило выздоровление у 57,4% опытных коров, а в целом его эффективность составила 95,7%, при этом курс лечения не превышал 3-х дней.

В то же время курс лечения больных маститом коров в контрольной группе продолжался 4-5 и более дней лечебными средствами постоянного и длительного применения.

Положительные результаты применения тетрамаста основываются, во-первых, на бактериологическом исследовании маститного молока и подтитровке к антибиотикам по чувствительности к ним микрофлоры помещений (мест нахождения животных и окружающей среды) данного хозяйства, в числе которых находился и активный компонент тетрамаста - тетрациклин в сочетании с пролонгирующими веществами.

Во-вторых, повышенный эффект обусловлен применением нового препарата, к которому не образовались устойчивые популяции микробов, что характерно для препаратов с длительным сроком их применения в хозяйстве. В борьбе с микробными возбудителями мастита необходима ротация через год-полтора антибактериальных средств, либо их использовать нужно в новых сочетаниях по сезонам года.

Заключение. По результатам проведенного научно-производственного опыта по испытанию в числе новых противомаститных препаратов тетрамаста установлена высокая его терапевтическая эффективность - 95,7% в лечении субклинического и серозно-катарального мастита у коров в течение 3-4 дней. После курса лечения наблюдалось ускоренное восстановление функции молочной железы, что имело значительное преимущество перед применяемыми однообразно в течение 2-3-х лет препаратов без определения к ним чувствительности микроорганизмов среды обитания животных.

Применение тетрамаста в этом хозяйстве в течение года позволит увеличить молочную продуктивность в среднем по стаду на 180-220кг за лактацию. По терапевтической эффективности препарат заслуживает широкого использования в лечении мастита.

Литература. 1. Бойко А.В., Волкова М.Н. Маститы - комплексный подход к лечению и профилактике. НГЖ «Ветеринария сельскохозяйственных животных», №5, 2007. 2. Воскобойников В.М. Маститы коров, Минск, Урожай, 1981. 3. Гончаров В.П., Карлов В.А., Якимчук Н.Л. Профилактика и лечение маститов у животных. Россельхозиздат, 1987. 4. Иващур А.И. Маститы коров, М., Колос, 1972. 5. Париков В.А., Климов Н.Т. и др. Мастит у коров. Ж «Ветеринария», №11, 2000. 6. Полянцев Н.И., Синявин А.Н. Акушерско-гинекологическая диспансеризация на молочных фермах. М., Россельхозиздат, 1985. 7. Шабунин С.В., Кириллова Е.С., Паршин П.А., Сулейманов С.М. Фармакология эроксимаста и его применение при мастите у коров. Ж. «Ветеринарная патология», №2 (25), 2008. 8. Шахов А.Г., Париков В.А. и др. Неотложные задачи профилактики мастита у коров. НГЖ «Ветеринария сельскохозяйственных животных», №5, 2007.

УДК 616:619.98

ОЧИСТКА АНТИГЕНА ВИРУСА КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

Гаранович М.М.

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

В статье приведен метод получения высокоочищенного антигена вируса классической чумы свиней для определения антител в иммуноферментном анализе и определены параметры чувствительности и специфичности.

In clause are resulted a method of reception high purified an antigen of a virus of a classical swine fever for definition of antibodies in discriminatory Elisa and parameters of sensitivity and specificity are determined.

Введение. Классическая чума свиней (КЧС) - высококонтагиозная вирусная болезнь всех возрастных групп и пород домашних и диких свиней, характеризующаяся при остром течении лихорадкой постоянного типа, септициемией и анемией, острым катаральным или крупозно-геморрагическим гастроэнтеритом, а при подостром и хроническом - крупозной или крупозно-геморрагической пневмонией или фолликулярно-язвенном колите и тифлитом [1, 3]. Чума для стран с интенсивной системой развития свиноводства считается одной из наиболее экономически важных проблем, а в ветеринарном плане - одной из наиболее трудно ликвидируемых и диагностируемых инфекционных болезней.

Характерной особенностью течения заболевания в последние десятилетия является легкая и хроническая формы, проявляющиеся нарушением функции воспроизводства. В основе такого явления лежит циркуляция низковирулентных штаммов вируса на фоне поголовной вакцинации свиней, индуцирующих персистентную (латентную) инфекцию и иммунологическую толерантность [6, 9].

Развитие латентных форм, длительное вирусоносительство, сходство по клиническим признакам с другими болезнями затрудняют клиническую, патологоанатомическую и лабораторную диагностику и не позволяют своевременно выявлять инфекцию, что способствует ее широкому распространению.

Возбудителем заболевания является РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству Flaviviridae, роду Pestivirus. Вирионы пестивирусов имеют сферическую форму диаметром 35-60 нм, включают в себя нуклеокапсид, окруженный оболочкой. Вирионы - оболочечные частицы диаметром 40-60 нм с нуклеокапсидом диаметром около 29 нм.

По разным данным в структуре вируса КЧС обнаружено 3 гликопротеина с молекулярной массой 44, 33 и 55 кД, 4 структурных белка (3 гликопротеида - VP1, VP2, VP3 и 1 капсидный белок - CP), 3-7 неструктурных белков (p125, p80, gp62, gp53, gp48, gp25 и gp20) [3, 6, 7]. Полагают, что VP1 и VP2 представляют собой оболочечные белки.

Описан один иммунологический тип вируса, который по степени вирулентности разделяется на три (А, С, В) группы. К группе А относят высоковирулентные штаммы, вызывающие острое заболевание у свиней всех половозрастных групп, а также лапинизированные и «холодные» варианты культурального вируса. К группе С относят слабовирулентные штаммы (американский штамм 331), которые вызывают острое течение болезни только у поросят, а у взрослых свиней - атипичную или хроническую чуму.

К группе В относят авирулентные штаммы (Тиверваль, К), которые используют для изготовления живых вакцин.

Существуют полевые (эпизоотические) штаммы вируса, вызывающие у кроликов значительное повышение температуры тела (лапинизированные). Предполагается, что это или изначально природная популяция вируса КЧС, смешанная, или рекомбинация популяций полевых и вакцинных штаммов с лапинизированными свойствами [7, 19].

Широкий спектр вирулентности и иммуногенности штаммов вируса обуславливает многообразие клинико-эпизоотических форм КЧС, затрудняет мониторинг, диагностику и вакцинопрофилактику инфекции. В этой связи актуальной задачей является изучение иммунологических аспектов инфекции.

Лабораторная диагностика КЧС включает прямое обнаружение вируса в патологическом материале методами иммунофлюоресценции (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР) или иммуноферментного анализа (ИФА) [7, 8, 10, 17, 18]. Вместе с тем, не потеряла значение, особенно для контроля эффективности вакцинации, серо- и ретроспективная диагностика, особенно в непрямом варианте твердофазного ИФА [8, 16]. Для ее осуществления необходимо получение высокоочищенных антигенов вируса КЧС, поэтому целью работы явилась очистка антигенов вируса классической чумы свиней для использования в иммуноферментном анализе.

Материалы и методы. Лапинизированный штамм вируса КЧС «Синлак» накапливали путем заражения 6 кроликов массой 2,5-3 кг. Животным внутривенно вводили вирусосодержащий материал в объеме 2 мл. Через 12-24 часа после подъема температуры тела до 41,5-42 °С сердечной пункцией получали 50-70 мл крови, которую стабилизировали гепарином в концентрации 0,2 мг/мл.

Лейкокцентрат получали путем очистки в градиенте, создаваемом фи-колл-гипаком или визотрастом 370 [6].

Концентрацию белка определяли по модифицированному методу Bred-ford [4].

Очистку антигенов вируса проводили с помощью ультрафильтрации через Centrifugal Filter Devices Amicon Ultra Ultracel 100 K.

Позитивные и негативные сыворотки крови поросят отбирали с использованием тест-системы НПО «Парвак» в соответствии с инструкцией изготовителя. Кроме того, в качестве положительного контроля использовали 4 пробы сыворотки крови вакцинированных свиней. Отрицательными контролями служили заведомо известные: негативная свинья сыворотка набора IDCXX и 3 пробы крови поросят от свиноматок, не вакцинированных против КЧС.

В ИФА сыворотки крови исследовали в разведениях 1:10, 1:50, 1:100. В лунки вносили по 100 мкл исследуемых проб сывороток крови. Планшеты инкубировали 1 час при 37 °С, реагенты удаляли и трехкратно промывали лунки 0,02М натрий-фосфатным буфером, pH 7,5, с 0,2М NaCl и 0,05% твин-20, по 200 мкл на лунку.

В лунки вносили пероксидазный конъюгат (конъюгат пероксидазы хрена моноклональных антител к IgG свиней или конъюгат пероксидазы хрена с белком А собственного изготовления). Планшеты инкубировали и промывали, как указано выше. Далее в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора тетраметилбензидаина (ТМБ) и перекиси водорода. Через 5-10 минут реакцию останавливали добавлением 50 мкл H₂SO₄. Измеряли оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм (D450) с использованием автоматического многоканального спектрофотометра (Anthos), определяя разницу оптической плотности (ОП) исследуемых сывороток крови по сравнению с негативной сывороткой набора IDEXX.

Результаты исследований. Так как вирус КЧС локализуется преимущественно в лимфоцитарной фракции, на первом этапе очистки цельную гепаринизированную кровь разводили фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с pH 7,2-7,4 в соотношении 1:3. В центрифужные пробирки наслаивали по 4 мл разведенной крови на 4 мл фи-коллагипака или визотраста 370, центрифугировали 20 минут при 400 об./мин. В результате центрифугирования в градиенте плотности (1,077 г/см³) лимфоциты крови концентрировались в виде белесого кольца в области интерфазы. «Лимфоидное» кольцо собирали и ресуспендировали в тройном объеме ФСБ, затем центрифугировали 5 минут при 250 об./мин., отмычку повторяли трижды. Лейкокцентрат дважды замораживали и размораживали, детрит удаляли центрифугированием, а надосадочную жидкость обрабатывали ультразвуком в течение 20 минут, после чего вирусосодержащую фракцию осаждали сульфатом аммония 30 и 40% насыщения.

После диализа фракции, полученные осаждением сульфатом аммония 30 и 40% насыщения, очищали на Centrifugal Filter Devices Amicon Ultra Ul-tracei 100 K, собирая задерживаемую фракцию.

Полученные фракции (7-10 мкг/мл) вносили по 100 мкл в лунки иммунологических панелей Sarstedt, обработанные глутаровым альдегидом (pH 9,0).

В ИФА исследовали фракции вируса, полученные осаждением сульфатом аммония 30% и 40% насыщения, очищенные фракции с размером молекул меньше и больше 100 кДа. Положительными считали пробы с Δ ОП более 2,0.

Результаты исследований представлены в таблице 1. Установлено, что все исследованные фракции не реагировали с негативной сывороткой набора IDEXX (ОП менее 0,2 ед.)

При исследовании сыворотки крови невакцинированных свиней, дававших негативные результаты при тестировании набором НПО «Парвак» установлено, что фракции, полученные осаждением сульфатом аммония, давали слабые положительные реакции с разведением 1:10 сыворотки N1, фракции, полученные ультрафильтрацией, не реагировали с ней.

С сывороткой N2 отмечались достаточно сильные реакции (Д ОП 2,5-9,8), хотя фракция с размером молекул меньше 100 kDa с разведением сыворотки 1:100 давала отрицательный результат (Д ОП 1,6). Вероятно, можно считать, что сыворотка N2 действительно содержит антитела к антигенам КЧС, которые не были определены с применением набора НПО «Нарвак», поэтому результат с ней не принимали во внимание при интерпретировании результатов.

С сывороткой N3 негативная реакция с фракциями, осажденными сульфатом аммония отмечалась с разведением 1:100, а фракции, полученные ультрафильтрацией, не реагировали, начиная с разведения 1:50.

С позитивными сыворотками наблюдались более интенсивные реакции. Так, фракции, полученные осаждением сульфатом аммония 30% и 40% насыщения, положительно реагировали со всеми сыворотками, во всех исследованных разведениях, причем с последней реакции были более интенсивными.

Фракции, очищенные ультрафильтрацией с частью сывороток, разведенных 1:100, давали отрицательные реакции (таблица 1).

Таблица 1 - Результаты испытания в ИФЛ антигенов вируса КЧС, полученных осаждением сульфатом аммония и ультрафильтрацией

Разведения сывороток	Превышение ОП в сравнении с IDEXX K-						
	Не вакцинированные			Вакцинированные			
	N1	N2	N3	P1	P2	P3	P4
Антиген КЧС 30%-го насыщения (NH₄)₂SO₄							
1:10	2,1	9,8	4,3	8,0	7,5	9,1	11,4
1:50	1,3	3,2	2	5,0	3,9	3,6	5,3
1:100	1,27	2,5	1,7	3,5	3,2	2,5	3,9
Антиген КЧС 40%-го насыщения (NH₄)₂SO₄							
1:10	2,4	9,2	4,6	13,7	15,2	10,7	28
1:50	1,6	3,3	2,2	5,7	5	2,8	16,7
1:100	1,3	2,6	1,8	3,5	3,1	2,3	9,9
Фракция с размером молекул больше 100 kDa							
1:10	1,9	8,7	6,23	9,1	9,5	10,6	15,5
1:50	1,3	2,3	1,88	3,7	2,8	3,4	4,2
1:100	1,2	2	1,27	1,3	1,75	1,8	4,5
Фракция с размером молекул меньше 100 kDa							
1:10	1,5	5,4	5	6,1	6	5,7	5,2
1:50	1,08	2,1	1,4	3,2	2,3	2,5	3,4
1:100	0,98	1,6	1,05	1,7	1,5	1,5	2,5

Таким образом, результаты исследований показали, что антиген КЧС 30%-го насыщения (NH₄)₂SO₄ реагировал со всеми позитивными сыворотками в испытанных разведениях (чувствительность 100%). В реакции с негативными сыворотками его специфичность зависела от разведения последних и повышалась от 0 до 100% (разведением 1:100). Чувствительность антигена КЧС 40%-го насыщения (NH₄)₂SO₄ с позитивными сыворотками также составила 100%, но специфичность была ниже 50% с разведениями сывороток 1:50 и 100% - 1:100.

Фракции с размером молекул больше и меньше 100 kDa выявляли антитела в 9 случаях из 12 (средняя чувствительность 75%, а в разведении 1:50-100%). Их специфичность с разведениями сывороток 1:10 была 50%, 1:50-100%).

Таким образом, если исследование проводить с разведением сывороток 1:50, предпочтительнее использовать фракцию, очищенную ультрафильтрацией с размером молекул менее 100 kDa. Если использовать большие разведения сывороток (1:100 и более), целесообразнее применять антигены, очищенные осаждением сульфатом аммония, лучше 30% насыщения.

Заключение. 1. Разработана методика частичной очистки антигенов вируса классической чумы свиней штамма «Синлак» путем получения инфицированного лейкоконцентрата, осаждения вируса сульфатом аммония с последующей ультрафильтрацией через мембрану с пределом задержания 100 kDa.

2. По параметрам чувствительности и специфичности в ИФА предпочтительнее оказались фракции, полученные осаждением сульфатом аммония 30% насыщения (при использовании разведений сывороток 1:100 и более) и фракция, очищенная ультрафильтрацией с размером молекул менее 100 kDa (при использовании разведений сывороток 1:50 и менее).

Литература. 1. Максимович, В.В. Дифференциальная диагностика классической чумы свиней / В.В. Максимович. - Мозырь: КПУП «Колор», 2001. 2. Бабкин, М.В. Особенности течения классической чумы у свиней различных возрастов, вызываемой полевыми изолятами / М.В. Бабкина, В.В. Куриннов, И.Ф. Вишняков // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии, эпизоотологии: Материалы научной конференции ВНИИВВиМ.- Покров, 1992.-4.1.-с.128-129. 3. Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Л. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. - Москва, ВНИТИБП, 1998. - 928 с. 4. Северина, СЕ. Практикум по биохимии / СЕ. Северина, Г.А. Соловьева. - М.: Изд-во МГУ, 1989. - 509 с. 5. Практикум по вирусологии / под редакцией В.М. Жавненко. - Мн.: Дизайн ПРО, 1998.-144 с: ил. 6. Anon. Commission decision of 1 February 2002 approving a Diagnostic Manual establishing diagnostic procedures, sampling methods and criteria for evaluation of the laboratory tests for the confirmation of classical swine fever (2002 / 106 / EC) //Official Journal of the European Union.- 2002. - p.39/71. 7. Anon. EC as regards the establishment of a classical swine fever discriminatory test. Commission decision of 5 December 2003 amending Decision 2003 / 859 / EC //Official Journal of the European Union.-2003. - p.324 / 55. 8. Bouma, A., Stegeman J.A., Engel B., de Kluijver E.P., Elbers A.R., De Jong M.C. Evaluation of diagnostic tests for the detection of classical swine fever in the field without a gold standard //J. Vet. Diagn. Invest, 13. - 2001. -p.383-388. 9. Colijn

- E.O., Bloemraad M., Wensvoort G. An improved ELISA for the detection of serum antibodies directed against classical swine fever virus // *Vet. Microbiol.*, 59. - 1997. - p. 15 - 25. 10. IO. Commission of the European Communities. The Use of Marker Vaccines in the Control of Infectious Diseases in Particular, Classical Swine Fever // Report Sci. Vet. Comm. Commission of the European Communities, DGV1, B112, doc VI/8119. - 1997. - p. 1-13. 11. Depner K., Gruber A. & Liess B. Experimental infection of weaner pigs with a field isolate of HC / CSF virus derived from a recent outbreak in Lower Saxony. I: Clinical, virological and serological findings // *Wien. Tierarztl. Monatsschr.* 81. - 1994. - p. 370 - 373. 12. Depner K., Paton D. J., Cruciere C, De Mia G.M., Muller A., Koenen F., Stark R., Liess B. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid screening and detection of classical swine fever virus antigens in the blood of pigs // *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 14. - 1995. - p. 677-689. 13. Depner K., Bouma A., Koenen F., Klinkenberg D., Lange E., de Smit H., Vanderhallen H. Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial II. Challenge study in pregnant sows // *Vet. Microbiol.* 83. - 2001. - p. 107 - 120. 14. De Smit A. J., Terpstra C, Wensvoort G. Comparison of Viral Isolation Methods from Whole Blood or Blood Components for Early Diagnosis of CSF // Rep. Meeting Nat. Swine Fever Lab. Brussels 24 - 25 November. Commission of the European Communities, DGV1 / 5848 / 95. - 1994. - p. 21 - 22. 15. Kdwards S., Moening V., Wensvoort G. The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses // *Vet. Microbiol.*, 29. - 1991. - p. 101 - 108. 16. Floegel - Niesmann G. Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial III. Evaluation of discriminatory ELISAs // *Vet. Microbiol.*, 83. - 2001. - p. 121 - 136. 17. Langedijk J.P., Middel W.G., Melen R.H., Kramps J.A. & de Smit J.A. Enzyme-linked immunosorbent assay using a virus type - specific peptide based on a subdomain of envelope protein K(rns) for serologic diagnosis of pestivirus infections in swine // *J. Clin. Microbiol.*, 39. - 2001. - p. 906 - 912. 18. Liess B. & Prager D. (1976). Detection of neutralising antibodies (N1F) test: use of new technical equipment for laboratory swine fever diagnosis. In: CEC Seminar on Diagnosis and Epizootiology of Classical Swine Fever. // EUR 5486, 187-197. 19. McGoldrick A., Lowings J.P., Iyata G., Sands J.J., Belak S. & Paton D.J. A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT - PCR. 20. With a fluorogenic probe (Taq Man). // *J. Virol Methods*, 72. - 1998. - p. 125-135. 20. Ogawa N., Takaga-va П., Yamamoto И., Sawada VI., Ilanaki T., Sazawa H. Viral detection in pigs inoculated with the GPE - strain of hog cholera attenuated virus // *Ann. Rep. Nat. Vet. Assay Lab. (Japan)*, 10. - 1973. - p. 15 - 19.

УДК: 595.42:619:616.995.42 (470.44/.47)

**ЧЛЕНИСТОНОГИЕ СЕМЕЙСТВА IXODIDAE НА ТЕРРИТОРИИ НИЖНЕГО ПОВОЛЖЬЯ
КАК НОСИТЕЛИ И ПЕРЕНОСЧИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА**

Денисов А.А.

Волгоградская государственная сельскохозяйственная академия,
г. Волгоград, Россия

Установлен видовой состав иксодовых клещей на территории Нижнего Поволжья, который составил 24 вида. Выявлены виды доминантов, ими явились иксодовые клещи из рода Hyalomma, а субдоминантами - из рода Dermacentor.

Specific composition of iksodovih ticks on territory of Lower Povolgya, which made a 24 kind, is set. The types of dominantov are exposed, they were been by the iksodovie ticks from Hyalomma family, and by subdominantami from Dermacentor family.

Введение. Начало изучения клещей в России относится к концу 19-го века. Сначала они были объектами чисто зоологических исследований, несколько позднее привлекли внимание ветеринаров и медиков и им были посвящены публикации многих авторов: Е.Н. Павловского, И.Г. Галузо, Б.В. Лотоцкого, Н.Г. Олсуфьева, Б.И. Померанцева, Г.В. Сердюковой и многих других. Все иксодиды являются высокоспециализированными паразитами наземных позвоночных животных, и в первую очередь млекопитающих и птиц. Иксодовые клещи привлекают пристальное внимание исследователей как переносчики и длительные хранители возбудителей некоторых бактериальных, вирусных, риккетсиозных и протозойных заболеваний человека и животных [1, 6]. Для выяснения причин и условий существования природного очага любой трансмиссивной инфекции необходимо, как это вытекает из учения академика Е. Н. Павловского [7, 8, 9, 10, 11], знание видового состава, биологии и экологии основных источников и переносчиков возбудителя заболевания.

Иксодовые клещи характеризуются повсеместным распространением, географическое распространение иксодид как временных эктопаразитов зависит от условий окружающей среды, распространения их прокормителей и отражает историю формирования фауны конкретного региона. К настоящему времени с разной степенью точности установлено географическое распространение большинства видов иксодовых клещей [1].

Среди более 40000 описанных видов клещей (Acari) семейство клещей Ixodidae представляет небольшую группу, состоящую из 680 видов, относимых к 2 подсемействам и 14 родам [1, 6]. По литературным данным на сегодняшний день на территории России зарегистрировано 6 родов иксодовых клещей: *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Boophilus*, *Dermacentor*, *Haemophysalis*, *Hyalomma* и около 60 видов [2,3,4,5].

Ввиду того, что иксодовые клещи представляют собой группу высоко специализированных кровососущих членистоногих эктопаразитов, которые имеют первостепенное ветеринарное и медицинское значение, являясь переносчиками и резервуарами возбудителей всевозможных заболеваний, необходимо изучение и определение видовой и родовой принадлежности иксодовых клещей, паразитирующих на животных и человеке в той или иной географической зоне. Так как это имеет важное значение для принятия эпидемиологических и эпизоотологических решений по предупреждению распространения кровопаразитарных и других заболеваний сельскохозяйственных, диких животных и человека.