

ВЕТЕРИНАРИЯ И КОРМЛЕНИЕ

VETERINARIA I KORMLENIE

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ ОТКРЫТОГО ДОСТУПА

INTERNATIONAL SCIENTIFIC JOURNAL OF OPEN ACCESS



Журнал награжден
медалями
"За заслуги в области
ветеринарии",
"За развитие
биологической науки
и промышленности"

ISSN:1814-9588

DOI:10.30917/1814-9588

ЖУРНАЛ ВКЛЮЧЕН В

ВАК, РИНЦ, CROSSREF, AGRIS,
ОТРАСЛЕВЫЕ СМИ МИНСЕЛЬХОЗА РФ

Наши партнеры:



Россельхознадзор



Федеральная служба
по ветеринарному
и фитосанитарному
надзору

Центр
«Амурский тигр»



Автономная
некоммерческая
организация

Необходим 1 миллион доз вакцин для работников АПК 1 million doses of vaccines needed for agribusiness workers

20 января Министр сельского хозяйства Дмитрий Патрушев провел первое в 2021 году заседание оперативного штаба по мониторингу ситуации в АПК и на продовольственном рынке. Участники мероприятия, в том числе представители федеральных ведомств, региональных органов управления АПК, отраслевых союзов и организаций, обсудили ценовую ситуацию на продовольственном рынке, проведение вакцинации от коронавируса работников АПК, обеспеченность отрасли трудовыми ресурсами и другие вопросы.

Как подчеркнул Дмитрий Патрушев, важнейшей задачей является круглосуточный мониторинг цен на основные продовольственные товары. Правительством предпринят комплекс по стабилизации ситуации - это дополнительные субсидии, пошлины и квоты. Кроме того, заключено соглашение между Минсельхозом, Минпромторгом, торговыми сетями, союзами и ассоциациями, направленное на снижение цен на подсолнечное масло и сахар. По словам Министра, это дает свои результаты, цены на сахар-песок и подсолнечное масло снижаются у производителей и в рознице. Вместе с тем регионам необходимо обеспечивать постоянный мониторинг ситуации.

Также в фокусе особого внимания в текущем году продолжает оставаться ситуация с распространением коронавирусной инфекции. "Учитывая специфику организации отдельных производств, организациям АПК совместно с региональными властями необходимо проработать возможность обеспечения доступа к вакцинации в первоочередном порядке для работников убойных, перерабатывающих и сортировочных цехов. Исходя из полученной от субъектов информации, на первом этапе потребность для желающих сделать прививку работников АПК оценивается в 250 тысяч доз вакцины. Всего, по предварительным расчетам, необходим 1 миллион доз", - отметил Дмитрий Патрушев.

В ходе заседания также была затронута тема подготовки к весенним полевым работам. Глава Минсельхоза России поручил держать на контроле вопрос обеспечения аграриев материально-техническими ресурсами, а также продолжить мониторинг состояния посевов озимых культур.

По материалам пресс-службы Минсельхоза РФ

Редакционная коллегия / Editorial board

Russia Moscow M. Gulyukin  М.И. Гулюкин Россия, Москва	Spain Madrid L. Enjuanes  Луис Энхуанес Испания, Мадрид	USA, Manhattan I. Morozov  И.А. Морозов США, Манхэттен	Russia Moscow A. Panin  А.Н. Панин Россия, Москва	Russia Moscow A. Smirnov  А.М. Смирнов Россия, Москва
Russia Moscow B. Usha  Б.В. Уша, Россия, Москва	Poland Warsaw T. Stadejek  Томаш Стадиак, Польша, Варшава	Russia S.Posad V. Fisinin  В.И. Фисинин, Россия, С. Посад	Полная информация о членах редакционной коллегии и редакционного совета размещена на сайте журнала Full information about the members of the editorial board is posted on the journal's website	

Редакционный совет / Editorial board

 Алиев А.Ю. Махачкала, Россия Aliyev A.Y. Makhachkala, Russia	 Галатюк А.Е. Житомир, Украина Galatiuk O.Yu. Zhytomyr, Ukraine	 Гринь С.А. Щелково, Россия Grin S.A. Schelkovo, Russia	 Иванов Е.А. Красноярск, Россия Ivanov E.A. Krasnoyarsk, Russia	 Кассич В.Ю. Сумы, Украина Kassich V.Yu. Sumy, Ukraine	 Клетикова Л.В. Иваново, Россия Kletikova L.V. Ivanovo, Russia
 Красочко П.А. Витебск, Беларусь Krasochko P.A. Vitebsk, Belarus	 Некрасов Р.В. Подольск, Россия Nekrasov R.V. Podolsk, Russia	 Слепцов Е.С. Якутск, Россия Sleptsov E.S. Yakutsk, Russia	 Ткачев А.В. Белгород, Россия Tkachev A.V. Belgorod, Russia	 Чекрышева В.В. Ростов-на-Дону, Россия Chekrysheva V.V. Rostov-on-Don Russia	 Шантыз А.Х. Краснодар, Россия Shantyz A.K. Krasnodar, Russia

№ 1/2021

Международный научный рецензируемый журнал открытого доступа
 «Ветеринария и кормление» / «Veterinaria i kormlenie»
 International scientific peer-reviewed open access journal
 Подписной индекс в каталоге Пресса России - 42111
 109428, Москва, Рязанский проспект, д. 24, стр. 1, офис 916
 Тел., whatsapp: +7916 819-48-13 www.vetkorm.ru.
 Учредитель – ООО «Агентство творческих технологий».
 Свид-во о регистрации ПИ № ФС77-18901 от 19.11.2004 г.
 ISSN:1814-9588 DOI:10.30917/1814-9588
 Подписано в печать 11.02.2021. Отпечатано ООО «ПринтЮ»
 Заказ 20504. Тираж 2000

Главный редактор
 Владимир Александрович ХРАМЕНКОВ

Полное или частичное воспроизведение, размножение любым способом материалов, опубликованных в журнале, допускается только с письменного разрешения редакции со ссылкой на журнал. Мнения авторов могут не совпадать с точкой зрения редакции. Ответственность за содержание и достоверность информации в публикациях, включая рекламные, полностью несет автор.
 ©Журнал «Ветеринария и кормление», 2020

СОДЕРЖАНИЕ / CONTENTS

	Научные основы разработки и производства биопрепаратов в ФГБНУ ВНИТИБП Забережный А.Д. / Zaberezhny A. D. -----	4
	Scientific basis for the development and production of biologics in VNITIBP	
	Эффективность использования белкового гидролизата для стимуляции репродуктивной функции норок и улучшения товарных свойств шкурок животных Албулов А.И., Фролова М.А., Гринь А.В., Елисеев А.К., Абрамов А.Б. -----	8
	The efficiency of using protein hydro-lyzate to stimulate the reproductive function of minks and improve the commercial properties of animal skins Albulov A.I., Frolova M.A., Grin A.V., Eliseev A.K., Abramov A.B.	
А	Действие дезинфицирующих препаратов на вирус оспы овец и коз в условиях внешней среды и в животноводческих помещениях Атовуллозода Р.А., Жбанова С.Ю., Одинаев К.А., Назруллозода С.Х., Раджабалии М., Богомолова О.А., Пухова Н.М. -----	11
	The effect of disinfectants on the sheep and goat pox virus in the environment and in livestock buildings Atovullozoda R.A., Zhbanova S.Yu., Odinaev K.A., Nazrullozoda S.Kh., Rajabaliya M. Bogomolova O.A., Pukhova N.M.	
↓	Применение инновационной технологии интерферометрии биослоя молекул в фундаментальных исследованиях при создании новых вакцин Гринь С.А., Матвеева И.Н. / Grin S. A., Matveeva I.N. - -----	14
	Application of innovative technology of biolayer interferometry in basic research in the development of new vaccines	
Я	Эффективность конъюгированных с флуоресцеином антирабических и антихламидийных антител, высушенных сублимационно Клюкина В.И., Люлькова Л.С., Анисина О.В., Глинский К.А., Лобанова В.А., Святенко М.С. -----	17
	Efficiency of fluorescein-conjugated anti-rabies and anti-chlamydia antibodies freeze-dried Klyukina V.I., Lyulkova L.S., Anisina O.V., Glinsky K.A., Lobanova V.A., Svyatenko M.S.	
	Технология изготовления низкомолекулярного хитозана на основе ферментативного гидролиза Ковалева Э.И., Албулов А.И., Фролова М.А., Варламов В.П., Гринь А.В. -----	20
	Manufacturing technology of low-molecular-weight chitosan based on enzymatic hydrolysis Kovaleva E.I., Albulov A.I., Frolova M.A., Varlamov V.P., Grin A.V.	
	Влияние минерализации воды и растворенных главных катионов на выживаемость, размеры и сейсмочувствительные признаки молоди речного окуня (<i>Perca fluviatilis</i> L.) Котегов Б.Г. / Kotegov B.G. -----	23
	Influence of water mineralization and dissolved main cations on survival, size and seismosensory characteristics of perch fry (<i>Perca fluviatilis</i> L.)	
А	Спектроскопические характеристики коллоидных растворов наночастиц металлов Красочко П.А., Корочкин Р.Б., Красочко П.П., Гвоздев С.Н., Понаськов М.А., Еремец В.И., Неминущая Л.А. -----	27
	Spectroscopic characteristics of colloidal solutions of metal nanoparticles Krasochko P.A., Korachkin R.B., Krasochko P.P., Gvozdev S.N., Ponasov M.A., Eremets V.M., Neminushaya L.A.	
↓	Сравнительная оценка эффективности методов паспортизации перевиваемых линий клеток Маркова Е.В., Ночевный В.Т., Манин Б.Л., Матвеева И.Н. -----	31
	Comparative evaluation of the effectiveness of methods for certification of transplanted cell lines Markova E. V., Nochevny V. T., Manin B. L., Matveeva I. N.	
Z	Требования к стандартным образцам вирусных вакцин для ветеринарии Матвеева И.Н., Скотникова Т.А., Неминущая Л.А., Еремец Н.К., Еремец В.И., Маркова Е.В., Красочко П.П. -----	35
	Requirements for standard viral vaccine samples for veterinary medicine Matveeva I.N. Skotnikova T.A., Neminushchaia L.A., Eremets N.K., Eremets V.I., Markova E.V., Krasochko P.P.	
	Разработка и изготовление пуллорозного эритроцитарного диагностикума для диагностики пуллороза-тифа птиц Мельник Р.Н., Клюшенцева Н.С., Мельник Н.В. -----	38
	Development and manufacture of erythrocyte pullorosis diagnosticum for the diagnosis of avian pullorosis typhoid R.N. Melnik, N.S. Klyushentseva, N.V. Melnik	
	Подбор адъювантов при конструировании инактивированной вакцины против респираторных инфекций КРС Притыченко А.В., Красочко П.А., Еремец Н.К., Провоторова О.В. -----	42
	Selection of adjuvants in the design of an inactivated vaccine against respiratory infections of cattle Prytychenko A. V., Krasochko P.A., Eremets N.K., Provotorova O.V.	
	Разработка математической модели непрерывного (хемостатного) процесса культивирования пастерелл Раевский А.А. / Raevsky A.A. -----	45
	Development of a mathematical model of the continuous (chemostat) process of culturing pasteurilla	
	Лиофилизация биопрепаратов. Оборудование. Технология. Валидация. Сербис Е.С., Матвеева И.Н., Еремец В.И. -----	49
	Lyophilization biologicals products. Equipment. Technology. Validation. Serbis E. S., Matveeva I. N., Eremets V. I.	
	Вирус иммунодефицита кошки: характеристика и роль в патологии Федоров Ю.Н., Клюкина В.И., Богомолова О.А., Романенко М.Н., Царькова К.Н. -----	52
	Feline Immunodeficiency Virus: characteristics and role in pathology Fedorov Yu.N., Klukina V.I., Bogomolova O.A., Romanenko M.N., Tsarykova K.N.	
	Опыт применения стимулирующей подкормки для медоносных пчел "БиХит" в Московской области и Республике Крым Фролова М.А., Албулов А.И., Ковалева Э.И., Елисеев А.К., Гринь А.В. -----	57
	Experience of using stimulating feeding for honey bees "BiHit" in the Moscow region and the Republic of Crimea Frolova M.A., Albulov A.I., Kovaleva E.I., Eliseev A.K., Grin A.V.	
	Выбор оптимальной дозы применения ассоциированной вакцины против рота-, коронавирусной инфекции и колибактериоза телят Яромчик Я.П., Красочко П.А., Красочко П.П., Еремец В.И., Скотникова Т.А. -----	60
	Selection the optimal dose of application associated vaccine against rota-, coronavirus infection and colibacillosis in calves Yaromchik Y. P., Krasochko P. A., Krasochko P. P., Eremets V.M., Skotnikova T.A.	

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-1

Научные основы разработки и производства биопрепаратов в ФГБНУ ВНИТИБП



Забережный А.Д.
Zaberezhny A. D.

Забережный А.Д., доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, врио директора

ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности", Щелково Московской обл.
e-mail: vnitidp@mail.ru

Ключевые слова: биотехнология, биологическая промышленность, биопрепараты для ветеринарии, технологии производства, диагностика.

Резюме: основными направлениями деятельности ФГБНУ ВНИТИБП являются разработка и совершенствование технологий промышленного производства эффективных средств профилактики и лечения болезней животных, создание тест-систем для экспресс-индикации и идентификации биологических агентов для профилактики и лечения болезней животных, том числе птиц. Институт несет ответственность за научно-технический прогресс в области биотехнологического производства. В статье сделан анализ достижений института за 50 лет и намечена программа дальнейших исследований.

Датой основания Всероссийского научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности (ВНИТИБП) считается 1969 г. Это был период, когда в стране происходило бурное развитие сельского хозяйства, в том числе животноводства и птицеводства. Возникла необходимость разработки принципиально новых технологий производства лечебно-профилактических и диагностических биопрепаратов для обеспечения ветеринарного благополучия. Под руководством И.В. Звягина, начальника Главного управления биологической промышленности МСХ СССР, началось строительство новых биопредприятий и реконструкция существующих. Государственным комитетом Совмина СССР по науке и технике было принято решение (от 12 июня 1969 г. № 32) о создании научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности, и по приказу МСХ СССР (от 8 июля 1969 г. № 231) на базе Щелковского биокombината стали формироваться первые научные отде-

Scientific basis for the development and production of biologics in VNITIBP

Zaberezhny A. D., Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Acting Director

Federal state budgetary scientific institution "all-Russian research and technological Institute of biological industry", Shelkovo, Moscow region.
e-mail: vnitibp@mail.ru

141142, Russia, Moscow region., Shelkovsky m, pos. Biokombinata, house 17, Federal State Budget Scientific Institution All-Russian Scientific Research and Technological Institute of Biological Industry, (FGBNU VNITIBP), Tel./Fax: 8-(496)-56-7-32-63, zaberezhny@mail.ru; vnitibp@mail.ru

Key words: institute, biological industry, bio preparation, technology, vaccine, biological products, diagnostics

Abstract. The main activities of FGBNU VNITIBP are the development and improvement of industrial production technologies for effective means of prevention and treatment of animal diseases, the creation of test systems for rapid indication and identification of biological agents for the prevention and treatment of animal diseases, including birds. The Institute is responsible for scientific and technological progress in the field of biotechnological production. The article analyzes the achievements of the Institute over 50 years and outlines a program for further research.

The date of foundation of the All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry (VNITIBP) is considered to be 1969. This was a period when the country was experiencing rapid development of agriculture, including animal husbandry and poultry farming. There was a need to develop fundamentally new technologies for the production of therapeutic and diagnostic biologics to ensure veterinary well-being. Under the direction of I. V. Zvyagin, head of the Main Department of Biological Industry of the Ministry of Agriculture of the USSR, began construction of new biological enterprises and reconstruction of existing ones. The State Committee of the USSR Council of Ministers for Science and Technology adopted a decision (No. 32 of June 12, 1969) on the establishment of the Research and Technological Institute of Biological Industry, and by order of the Ministry of Agriculture of the USSR (dated July 8, 1969, No. 231), the first scientific departments and laboratories were formed on the basis of the Shchelkovsky biocombinat with an invitation to their leadership of highly professional and promising scientists.

The first head of the Institute was appointed Director of the Shchelkovsky biocombinat I. A. Khor'kov, Candidate of Veterinary Sciences. The main directions of scientific topics were laid by the Deputy Director for Science E. E. Nikitin, Doctor of Biological Sciences, Professor.

From 1974 to 1980, the deputy Director for scientific work was N. S. Shevryev, under whom the scientific developments of the Institute were widely implemented in the biological industry: Shchelkovo and Alma-Ata bio-plants, Kursk, Krasnodar, Armavir, Kherson, Stavropol, Sumy and other bio-factories.

Для цитирования / For citation

Забережный, А.Д. Научные основы разработки и производства биопрепаратов в ФГБНУ ВНИТИБП // Ветеринария и кормление. – 2021. – №1. – С. 4–7.
Zaberezhny, A. D. Scientific basis for the development and production of biologics in VNITIBP // Veterinaria i kormlenie. – 2021. – №1. – P. 4–7.

лы и лаборатории с приглашением на их руководство высокопрофессиональных и перспективных ученых.

Первым руководителем института был назначен директор Щелковского биокомбината И.А. Хорьков, кандидат ветеринарных наук. Основные направления научной тематики заложил заместитель директора по науке Е.Е. Никитин, доктор биологических наук, профессор.

С 1974 по 1980 годы заместителем директора по научной работе был Н. С. Шевырев, при котором научные разработки института стали широко внедряться на биопредприятиях биологической промышленности: Щелковском и Алма-Атинском биокомбинатах, Курской, Краснодарской, Армавирской, Херсонской, Ставропольской, Сумской и других биофабриках.

Главные задачи института состояли в повышении уровня фундаментальных и прикладных исследований в области разработки технологии промышленного производства биопрепаратов и разработки специализированного оборудования для биопроизводства.

Институт проводил апробацию предложений научно-исследовательских и других организаций, связанных с созданием и совершенствованием биопрепаратов, разрабатывал нормативы санитарного режима на предприятиях биологической промышленности, технологические нормативы и методы экономического анализа, контроля и прогнозирования развития биологической промышленности. Кроме того, институт проводил работу по улучшению научно-методического руководства предприятиями биологической промышленности.

В 1976 году было начато строительство собственного здания института. В этот трудный период организационно-технического становления коллектив ВНИТИБП совместно с другими научно-исследовательскими учреждениями и биопредприятиями активно проводил исследования, имеющие важное отраслевое и народно-хозяйственное значение для страны: замена рутинных трудоемких технологий на более производительные, внедрение современных методов и средств механизации и автоматизации, разработка новых видов биопрепаратов для диагностики и профилактики инфекционных болезней животных. К основным разработкам тех лет, внедренных на производство, относятся:

- промышленная технология изготовления жидких и сухих моно- и поливакцин против болезни Марека из вируса герпеса индеек, ассоциированная вакцина против болезни Марека и Гамборо (на Щелковском биокомбинате, Херсонской и Курской биофабриках);

- регламент по изготовлению и контролю культуральной антирабической вакцины из вируса бешенства, штамм "Щелково-51", культивируемый в перевиваемой линии клеток ВНК-21/13 (на Щелковском и Табахмельском биокомбинатах);

- регламент по деконтаминации инкубационного яйца (на Сумской и Курской биофабриках, Щелковском и Табахмельском биокомбинатах);

- регламент по культивированию вируса Ауески в тканевых эксплантатах в биореакторах (5 и 100 л), оснащенных автоматическими системами контроля основных технологических параметров (на Армавирской биофабрике);

- способ культивирования бруцелл в аппаратах АКМ-Ш (на Щелковском и Алма-Атинском биокомбинатах);

- способ управляемого культивирования бактерий пастерелл, сальмонелл, кампилобактерий в биореакторах при производстве вакцин (на Сумской, Армавирской биофабриках);

- полупромышленный способ изготовления гонадотропина из сыворотки крови жеребых кобыл (на Херсонской и Орловской биофабриках) и полиглобулинов риванольным методом (на Армавирской и Херсонской биофабриках);

- полупромышленная технология изготовления гидрата окиси алюминия (на Щелковском биокомбинате).

The main tasks of the Institute were to increase the level of fundamental and applied research in the field of development of technology for industrial production of biological products and the development of specialized equipment for biological production.

The Institute tested proposals of research and other organizations related to the creation and improvement of biological products, developed standards of sanitary regime at the enterprises of the biological industry, technological standards and methods of economic analysis, control and forecasting of the development of the biological industry. In addition, the Institute worked to improve the scientific and methodological management of biological industry enterprises.

In 1976, the construction of the Institute's own building was started. During this difficult period of organizational and technical development, the VNIITBP team, together with other research institutions and bio-enterprises, actively conducted research of important industrial and national economic importance for the country: replacing routine labor-intensive technologies with more productive ones, introducing modern methods and means of mechanization and automation, developing new types of biological products for the diagnosis and prevention of infectious diseases of animals. The main developments of those years, introduced into production, include:

- industrial technology for the production of liquid and dry mono – and poly-vaccines against Marek's disease from the herpes virus of turkeys, associated vaccine against Marek's disease and Gumboro (at the Shchelkovo bio-plant, Kherson and Kursk bio-factories);

- regulations for the production and control of culture rabies vaccine from rabies virus, strain "Shchelkovo-51", cultured in the transplanted cell line VNK-21/13 (at the Shchelkovsky and Tabakhmelsky bio-plants);

- regulations on decontamination of hatching eggs (on the Sumy and Kursk bio-mills, and Tabahmela the Shchelkovo biokombinat);

- regulations for the cultivation of Aujeszki virus in tissue explants in bioreactors (5 and 100 liters) equipped with automatic systems for monitoring the main technological parameters (at the Armavir biofactory);

- method for the cultivation of brucella in AKM-Sh devices (at the Shchelkovsky and Alma-Ata bio-plants);

- method of controlled cultivation of pasteurilla, salmonella, campylobacter bacteria in bioreactors in the production of vaccines (at Sumy and Armavir biofactories);

- a semi-industrial method for manufacturing gonadotropin from the blood serum of foaled mares (at the Kherson and Oryol biofactories) and polyglobulins by the rivanol method (at the Armavir and Kherson biofactories);

- semi-industrial technology for the production of aluminum oxide hydrate (at the Shchelkovsky bio-plant).

In the 80s, the Institute was given new tasks to improve the level of fundamental and applied research. The Institute has new research areas and laboratories for associated vaccines, immunology, molecular biology and virology, biologically active substances, quality assurance of biological products and industrial sanitation.

During the establishment of the Institute, great importance was attached to the creation of engineering research units. The Department of Automation and Mechanization of biological production became the first specialized technical scientific unit in the country in the biological industry. At various times, the structure of the institute included such engineering divisions as the automation laboratory, later transformed into a department, the laboratory of mechanization of technological processes, the laboratory "Processes and Devices", the design bureau and the laboratory "Clean Rooms".

The analysis of technical condition of equipment of biological enterprises was carried out and scientifically grounded recommendations of use of the equipment, means of mechanization and automation at industrial production of biological products were developed.

В 80-е годы перед институтом были поставлены новые задачи по повышению уровня фундаментальных и прикладных исследований. В институте появились новые научные направления и лаборатории ассоциированных вакцин, иммунологии, молекулярной биологии и вирусологии, биологически активных веществ, обеспечения качества биопрепаратов и производственной санитарии.

При становлении института большое значение придавалось созданию инженерных научных подразделений. Отдел автоматизации и механизации биологических производств стал первым в стране специализированным техническим научным подразделением в биологической промышленности. В разное время в структуру института входили такие инженерные подразделения как лаборатория автоматизации, в дальнейшем преобразованная в отдел, лаборатория механизации технологических процессов, лаборатория "Процессы и аппараты", конструкторское бюро и лаборатория "Чистые помещения".

Проводился анализ технического состояния оснащённости биопредприятий и разрабатывались научно обоснованные рекомендации использования оборудования, средств механизации и автоматизации при промышленном производстве биопрепаратов.

На Краснодарской биофабрике была создана опытно-промышленная линия производства противобактериальных препаратов с использованием разработанных приборов систем автоматизации и современных ферментеров. Инженерными подразделениями совместно с "Иркутскими химмаш" и Грозненским НПО "Промавтоматика" разработаны биореакторы для культивирования клеток животных и микроорганизмов, технические средства контроля автоматизации и оптимизации процессов культивирования: анализатор растворенного O_2 и CO_2 , анализаторы глюкозы и оптической плотности культуральной жидкости, которые были оформлены в автоматизированную систему управления и оптимизации технологического процесса культивирования с использованием микропроцессорной техники (АСУ ТП). Использование этих систем позволило разработать новейшие способы крупномасштабного культивирования клеток животных и вирусов в биореакторах.

Разрабатывались и внедрялись современные методы диагностики инфекционных заболеваний на основе молекулярной биологии; на фундаментальном уровне изучались вопросы стабилизации биопрепаратов методами сублимационного и распылительного высушивания; совершенствовалась система санитарных режимов биологических производств и охраны окружающей среды с использованием новой нетрадиционной технологии биологической очистки сточных вод.

Более 30 лет (с 1987 по 2018 годы) ВНИТИБП возглавлял А.Я. Самуйленко, доктор ветеринарных наук, профессор, академик РАН, лауреат Государственной премии РФ и премии Правительства РФ в области науки и техники, заслуженный деятель науки. При нем проходило становление института как ведущего научного учреждения по промышленной биотехнологии в России. Под его руководством был создан диссертационный совет по защите научных работ на соискание ученой степени доктора и кандидата наук, открыта и аккредитована аспирантура по направлению 06.06.01 Биологические науки.

С переходом институтов Россельхозакадемии в РАН (Федеральный закон РФ от 27 сентября 2013 г. № 253) под ведомство ФАНО и последующий их перевод в Минобрнауки (2018 г.) в институте были сформулированы приоритетные научные направления в соответствии с выполнением программ фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы, Стратегией научно-технологического развития Российской Федерации (Указ Президента Российской Федерации от 7

At the Krasnodar biofactory, a pilot industrial line for the production of antibacterial drugs was created using the developed devices of automation systems and modern fermenters. Engineering departments together with "Irkutskniihimash" and Grozny NGO "Promavtomatika" developed bioreactors for the cultivation of animal cells and microorganisms, technical means for controlling the automation and optimization of cultivation processes: an analyzer of dissolved O_2 and CO_2 , analyzers of glucose and optical density of culture liquid, which were designed into an automated control system and optimization of the technological process of cultivation using microprocessor technology (APCS). The use of these systems made it possible to develop the latest methods for large-scale cultivation of animal cells and viruses in bioreactors.

Modern methods of diagnostics of infectious diseases based on molecular biology were developed and implemented; the issues of stabilization of biological products by methods of sublimation and spray drying were studied at the fundamental level; the system of sanitary regimes of biological production and environmental protection was improved using a new non-traditional technology of biological wastewater treatment.

More than 30 years (1987 to 2018) VNIITBP was headed by A. Ya. Samoilenko, doctor of veterinary Sciences, Professor, academician, laureate of the State prize of the Russian Federation and the RF Government prize in science and technology, honored worker of science. Under his leadership, the Institute was established as a leading scientific institution for industrial biotechnology in Russia. Under his leadership, the dissertation council for the defense of scientific works for the degree of doctor and Candidate of Sciences was established, and a postgraduate course in the direction of 06.06.01 Biological Sciences was opened and accredited.

With the transition of the institutes of the Russian agricultural Academy Russian Academy of Sciences (the Federal law of the Russian Federation of September 27, 2013 № 253) under the Ministry of FANO and their subsequent transfer to the Ministry of education (2018), the Institute formulated the priority research areas in line with the implementation of the program of fundamental scientific research of state academies of Sciences for 2013–2020 of the Strategy for scientific and technological development of the Russian Federation (decree of the President of the Russian Federation from May 7, 2018 No. 204) and a national project "Science" (Protocol of the presidential Council of the Russian Federation from December 24, 2018 No. 16), which are also reflected in the development program of the Institute for the period 2020–2024.

The purpose of the Institute according to the adopted Strategy of Scientific and technical development of the Russian Federation is scientific support and testing of new technological solutions that are highly ready for mass production, in order to reduce the time between obtaining new knowledge in basic research, creating technologies and mastering them in production.

The main consumers (customers) of scientific and technological products of VNIITBP are federal state-owned biological enterprises of the country, biological organizations of other forms of ownership and diagnostic veterinary laboratories. The results of fundamental and exploratory research are in demand in research institutes and higher educational institutions of biological profile. The developed technological techniques and methods are universal and applicable for the development of a wide range of biological products in other industries.

Over the past 50 years, the Institute has developed a highly productive team, which today employs 3, corresponding member of RAS, 15 doctors and 25 candidates of Sciences, 3 honoured scientist of the Russian Federation, 2 honoured veterinarian of the Russian Federation, 11 winners of Government prize of the Russian Federation, including 4 young scientists, 3 staff members of the Institute in 1990 was awarded the State prize of the Russian Federation in the field of science and technology.

мая 2018 г. № 204) и национальным проектом "Наука" (Протокол Совета при Президенте Российской Федерации от 24 декабря 2018 г. № 16), которые отражены также в программе развития института на период 2020–2024 годы.

Предназначение института по принятой Стратегии научно-технического развития РФ – научное сопровождение и апробация новых технологических решений, имеющих высокую готовность к запуску в серийное производство, с целью сокращения времени между получением новых знаний в фундаментальных исследованиях, созданием технологий и их освоением в производстве.

Основными потребителями (заказчиками) научно-технологической продукции ВНИТИБП являются федеральные казенные биопредприятия страны, биологические организации другой формы собственности и диагностические ветеринарные лаборатории. Результаты фундаментальных и поисковых исследований востребованы в НИИ и высших учебных заведениях биологического профиля. Разрабатываемые технологические приемы и способы универсальны и применимы для разработки широкого спектра биопрепаратов в других отраслях.

За прошедшие 50 лет в институте сложился высокопрофессиональный работоспособный коллектив, в котором сегодня трудятся 3 члена-корреспондента РАН, 15 докторов и 25 кандидатов наук, 3 заслуженных деятеля науки РФ, 2 заслуженных ветврача РФ, 11 лауреатов премии Правительства РФ, в том числе 4 молодых ученых, 3 сотрудника института в 1990 г. были удостоены Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники.

В настоящее время структура научных подразделений ФГБНУ ВНИТИБП представлена 10 отделами: противобактериальных препаратов, вирусологии и молекулярной биологии, иммунологии, обеспечения качества лекарственных средств для животных, производственной санитарии и охраны окружающей среды, биологически активных веществ, конструирования биопрепаратов, сублимационного высушивания, информатики и научно-организационный отдел, включающий аспирантуру.

За более чем полувековой период коллективом института была проведена большая работа по всему комплексу проблем развития биологической промышленности, изданы монографии в том числе "Вирусные болезни животных", "Инфекционная патология животных" в 3 томах, 7 томов руководства "Инфекционная патология животных", 2 издания учебника "Биотехнология".

За успехи в подготовке высококвалифицированных специалистов, оказание научно-консультативных услуг и вклад в решение научных проблем сотрудники института награждены многочисленными медалями и дипломами ВДНХ, ВВЦ, выставок "Золотая осень", "Биоиндустрия" и другими. ФГБНУ ВНИТИБП осуществляет международное сотрудничество в соответствии с двухсторонними договорами и соглашениями с Белорусским государственным университетом (Минск), БНИИЭВ имени С.Н. Вышелесского (Минск), Государственной академией ветеринарной медицины (Витебск). В течение нескольких лет продолжается совместная научная работа с Харбинским научно-исследовательским институтом Китайской академии сельскохозяйственных наук и Таджикской академией сельскохозяйственных наук.

Институт в настоящее время обладает достаточным научным потенциалом для выполнения поставленных задач. Для повышения эффективности фундаментальных и прикладных научных исследований необходимо постоянно проводить оптимизацию работы подразделений института, улучшать приборно-техническую базу и интенсивнее привлекать молодые высококвалифицированные кадры с обязательной системой мотивации и поощрения сотрудников.

Currently, the structure of scientific divisions of the VNIITBP is represented by 10 departments: antibacterial drugs, virology and molecular biology, immunology, quality assurance of medicines for animals, industrial sanitation and environmental protection, biologically active substances, design of biological products, freeze-drying, computer science and scientific and organizational department, including postgraduate studies.

For more than fifty years the Institute staff has done a great job on the whole complex of problems of development of the biological industry, published monographs including "Viral diseases", "Infectious pathology of animals" in 3 volumes, 7 volumes of the leadership of "Infectious pathology of animals", 2 editions of "Biotechnology".

For their success in training highly qualified specialists, providing scientific advisory services and contributing to the solution of scientific problems, the Institute's employees were awarded numerous medals and diplomas of VDNH, VVC, exhibitions "Golden Autumn", "Bioindustry" and others. VNIITBP carries out international cooperation in accordance with bilateral agreements and agreements with the Belarusian State University (Minsk), the Vyshellessky Institute of Veterinary Medicine (Minsk), and the State Academy of Veterinary Medicine (Vitebsk). Joint scientific work with the Harbin Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences and the Tajik Academy of Agricultural Sciences has been ongoing for several years.

The Institute currently has sufficient scientific potential to fulfill its tasks. To increase the efficiency of fundamental and applied scientific research, it is necessary to constantly optimize the work of the Institute's departments, improve the instrument and technical base and intensively attract young highly qualified personnel with a mandatory system of motivation and encouragement of employees.

Литература

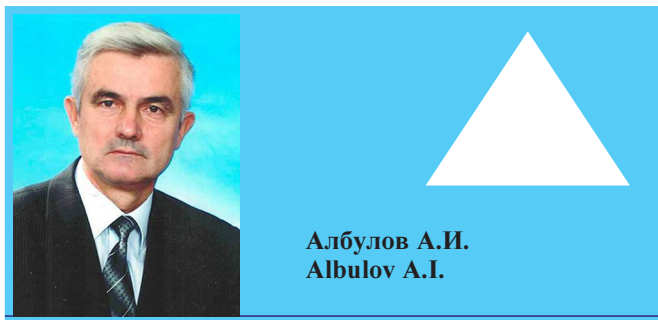
1. Вклад ФГБНУ ВНИТИБП в развитие отечественной биотехнологии и обеспечении ветеринарного благополучия / С.А. Гринь [и др.] // Ветеринария и кормление. - 2020. - № 2. - С. 4-8.
2. Гринь С. А. Научные основы производства и обеспечение качества биологических препаратов для АПК / С.А. Гринь, Н.М. Пухова, В. И. Еремец, Т.А. Авдеева, Е.В. Маркова // Современные проблемы ветеринарии, зоотехнии и биотехнологии", посвящённой 10-летию Ассоциации "Ветеринария, зоотехния и биотехнология". - М.: ЗооВетКнига, 2020. - С. 37-44
3. Рубан Е.А. Научно-практическая деятельность инженерных отделов ВНИТИБП за 40 лет / Е.А. Рубан, А.А. Раевский, А.И. Гуславский // Научные основы производства и обеспечение качества биологических препаратов. - Щелково, 2009. - С. 85-89.
4. Самуйленко А.Я. Всероссийскому научно-исследовательскому и технологическому институту биологической промышленности - 50 лет [Текст] / А.Я. Самуйленко, С.А. Гринь // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. - М.2019. - С.13-21.
5. Самуйленко А.Я. Основные направления развития производства биопрепаратов для профилактики бешенства животных [Текст] / А.Я. Самуйленко, С.А. Гринь, Н.М. Пухова // Ветеринария и кормление. - 2018. - С.13-21.

Referens

1. Vklad FGBNU VNIITBP v razvitie otechestvennoj biotekhnologii i obespechenii veterinarnogo blagopoluchiya / S.A. Grin' [i dr.] // Veterinariya i kormlenie. - 2020. - № 2. - S. 4-8.
2. Grin' S. A. Nauchnye osnovy proizvodstva i obespechenie kachestva biologicheskikh preparatov dlya APK / S.A. Grin', N.M. Puhova, V. I. Eremec, T.A. Avdeeva, E.V. Markova // Sovremennye problemy veterinarii, zootekhnii i biotekhnologii", posvyashchyonnoj 10-letiyu Assotsiatsii "Veterinariya, zootekhniiya i biotekhnologiya". - M.: ZooVetKniga, 2020. - S. 37-44
3. Ruban E.A. Nauchno-prakticheskaya deyatelnost' inzhenernykh otdelov VNIITBP za 40 let / E.A. Ruban, A.A. Raevskij, A.I. Guslavskij // Nauchnye osnovy proizvodstva i obespechenie kachestva biologicheskikh preparatov. - SHChelkovo, 2009. - S. 85-89.
4. Samujlenko A.YA. Vserossijskomu nauchno-issledovatel'skomu i tekhnologicheskomu institutu biologicheskoy promyshlennosti - 50 let [Tekst] / A.YA. Samujlenko, S.A. Grin' // Nauchnye osnovy proizvodstva i obespecheniya kachestva biologicheskikh preparatov dlya APK. - M.2019. - S.13-21.
5. Samujlenko A.YA. Osnovnye napravleniya razvitiya proizvodstva biopreparatov dlya profilaktiki beshenstva zhivotnykh [Tekst] / A.YA. Samujlenko, S.A. Grin', N.M. Puhova // Veterinariya i kormlenie. - 2018. - S.13-21.

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-2
УДК 577.636.9

Эффективность использования белкового гидролизата для стимуляции репродуктивной функции норок и улучшения товарных свойств шкурки животных



Албулов А.И.
Albulov A.I.

Албулов А.И., д.б.н., профессор, зав. отделом получения биологически активных веществ

Фролова М.А., д.б.н., в.н.с. отдела получения биологически активных веществ

Гринь А.В., к.б.н. с.н.с. отдела получения биологически активных веществ

Елисеев А.К., к.б.н., с.н.с. отдела получения биологически активных веществ

Абрамов А.Б., с.н.с. отдела получения биологически активных веществ

ФГБНУ ВНИТИБП РАН, М.О, Щелковский район, п. Биокombината, д.17, ВНИТИБП, vnitibp@mail.ru

Ключевые слова: белковый гидролизат, пушное звероводство, норки, репродуктивная функция, товарные свойства шкурки

Резюме. С точки зрения решения проблемы кормобеспечения в пушном звероводстве большой интерес представляет использование биологически активных добавок, нормализующих протеиновый баланс. Полученный по разработанной нами технологии гидролизат из отходов пушного звероводства является высокоусвояемым белком, характеризуется высоким содержанием аминного азота, содержит все незаменимые аминокислоты. Введение в основной рацион кормления норок гидролизата из мышечной ткани соболей позволило снизить в 1,3 раза количество пропустивших самок норок, увеличить выход щенков норок на основную самку, повысить жизнеспособность приплода. Эффективность скармливания белкового гидролизата в рационе кормления норок клеточного разведения оценивалась по товарным свойствам шкурки. Наиболее важными индикаторами являются толщина кожного покрова и соотношение его слоев, от которых зависит длительность обработки сырья при производственных операциях и показатели физико-механических свойств шкурки. Анализ полученных изменений позволил сделать вывод, что скармливание белкового гидролизата привело к увеличению толщины кожного покрова различных топографических участков шкурки норок. Максимальное значение толщины эпидермиса наблюдалось на огузочной части, минимальное – на хребтовой области, при этом максималь-

The efficiency of using protein hydrolyzate to stimulate the reproductive function of minks and improve the commercial properties of animal skins

Albulov A.I., Doctor of Biological Sciences, Professor, Head. department for production of biologically active substances

Frolova M.A., Doctor of Biological Sciences, Leading Scientist from the Department of Production of Biologically Active Substances

Grin A.V., Ph.D. senior researcher department of obtaining biologically active substances

Eliseev A.K., Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher department of obtaining biologically active substances

Abramov A.B., senior researcher department of obtaining biologically active substances

FGBNU VNITIBP RAS M.O., Shchelkovsky district, Biokombinata, 17, VNITIBP, vnitibp@mail.ru

Key words: protein hydrolyzate, fur farming, mink, reproductive function, commercial properties of skins

Abstract. From the point of view of solving the problem of feed supply in fur farming, the use of biologically active additives that normalize the protein balance is of great interest. The hydrolyzate obtained by the technology developed by us from the waste of fur farming is a highly digestible protein, is characterized by a high content of amine nitrogen, and contains all non-replaceable amino acids. The introduction of hydrolyzate from sable muscle tissue into the main diet of minks allowed to reduce by 1.3 times the number of missing female minks, to increase the yield of mink puppies per main female,

increase the viability of the offspring. The efficiency of feeding the protein hydrolyzate in the diet of caged minks was assessed by the commercial properties of the skins. The most important indicators are the thickness of the skin and the ratio of its layers, on which the duration of processing of raw materials during production operations and indicators of the physical and mechanical properties of the skins depend. Analysis of the obtained measurements made it possible to conclude that feeding with protein hydrolyzate led to an increase in the thickness of the skin of various topographic areas of mink skins. The maximum value of the epidermis thickness was observed on the rump part, the minimum - on the spinal region, while the maximum number of guard hairs was noted on the spinal part, the minimum - on the lateral part of the mink skins. Thus, the results obtained indicate the effectiveness of using a protein hydrolyzate to stimulate the reproductive function of minks and improve the commercial properties of animal skins.

ное количество остевых волос отмечено на хребтовой части, минимальное – на боковой части шкурки норок. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования белкового гидролизата для стимуляции репродуктивной функции норок и улучшения товарных свойств шкурки животных.

В связи с существующим в настоящее время в отечественном животноводстве дефицитом качественных и бе-

Для цитирования / For citation

Эффективность использования белкового гидролизата для стимуляции репродуктивной функции норок и улучшения товарных свойств шкурки животных/Албулов А.И. [и др.] // Ветеринария и кормление. - 2021. -№1 - С.8-10.

The effectiveness of using protein hydrolyzate to stimulate the reproductive function of minks and improve the commercial properties of animal skins / Albulov A.I. [and others] // Veterinaria i kormlenie. – 2021. – #1. – P. 8-10.

зопасных для организма животных кормов, актуальным является поиск новых источников белка и получение на их основе кормовых препаратов, которые обладают не только биологической ценностью, но и безопасностью для организма животных, а их производство является экономически оправданным для животноводческой отрасли [1,2,3].

Для нормализации протеинового баланса в кормлении животных используют различные белковые добавки, в частности отходы переработки молока, мясокостную и рыбную муку, кормовые дрожжи, белковые гидролизаты и др. [4,5]. Особую группу в составе отходов составляют отходы пушного звероводства, поскольку тушки зверей после убоя необходимо своевременно утилизировать или уничтожить, чтобы не загрязнять окружающую среду.

В отечественном пушном звероводстве на сегодняшний день крайне остро стоит проблема кормообеспечения. С этой точки зрения большой интерес представляет использование биологически активных добавок, нормализующих протеиновый баланс за счет содержащихся в них всех незаменимых аминокислот и хорошей усвояемости организмом. Такой биологически активной добавкой является белковый гидролизат из мышечной ткани пушных зверей. Он оказывает стабильный положительный эффект на прирост живой массы молодняка пушных зверей в период интенсивного роста, что в свою очередь влияет на товарные свойства получаемой шкурковой продукции [6].

Материалы и методы исследований

В качестве белокосодержащего сырья для получения белкового гидролизата использовали отходы пушного звероводства (тушки соболей), которые получали в ОАО "Племенной зверосовхоз "Салтыковский" и зверосовхозе "Русский соболь" Московской области.

Изучение влияния гидролизата на репродуктивные свойства норок и жизнеспособность их приплода проводили в условиях ОАО "Племенной зверосовхоз "Салтыковский" Московской области. Из самок и самцов норки было сформировано шесть опытных и одна контрольная группы зверей (норка окраса "Дикая норка" по 450 самок и 90 самцов в каждой), аналогичных по возрасту, массе и результатам щенения. Звери всех групп в период опыта со-

держались на сбалансированном рационе зверохозяйства. Самцам и самкам 1–6 опытных групп в течение 30 дней до начала гона, в период гона, самкам 1–6 опытных групп в течение 60 дней во время вынашивания потомства и 40–45 дней в период выкармливания до отсадки детенышей вводили в основной рацион кормления гидролизат из мышечной ткани соболей в дозе 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 и 0,6 г на голову сутки, соответственно. Животным седьмой группы (контрольная) гидролизат в корм не вводили. Регистрацию щенков проводили во время отсадки от самок.

Изучение влияния белкового гидролизата в рационе кормления норок клеточного разведения на товарные свойства шкурок проводили в условиях ОАО "Племенной зверосовхоз "Салтыковский" Московской области. Для проведения исследования были сформированы две группы самок норок (контрольная и опытная) 7–8 месячного возраста по 15 голов в каждой. Ежедневно в течение 60 суток животные контрольной группы получали только основной рацион, а животные опытной группы в дополнение к основному рациону получали белковый гидролизат из мышечной ткани соболей в количестве 4 г на 1 кг живой массы.

Исследования по товарным свойствам невыделанных шкурок норки коричневой (дикого типа) состояли из определения площади и массы шкурок, а также гистологического исследования кожного покрова на разных топографических участках шкурок норок [6]. Полученные цифровые данные обработаны методом вариационной статистики. Для выявления статистически значимых различий использовался критерий Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты опыта по изучению влияния гидролизата на репродуктивные функции норок и жизнеспособность их приплода представлены в таблице 1.

Из данных таблицы 1 следует, что введение в основной рацион кормления норок гидролизата из мышечной ткани соболей в дозе 0,4 г на голову в сутки (четвертая опытная группа) позволило снизить в 1,3 раза количество пропустивших самок норок, получить наилучший выход щенков норок на основную самку (7,6 головы против 6,7 головы в контроле) и повысить жизнеспособность приплода (со-

Таблица 1. Влияние вскармливания белкового гидролизата норкам окраса «Дикая норка» на количество приплода и сохранность молодняка

Table 1. Influence of protein hydrolyzate feeding for minks of the "Wild mink" color on the number of offspring and the safety of young animals

№ группы	Кол-во самок (гол.)	Кол-во самцов (гол.)	Доза препарата, г/кг массы тела	Пропустивших самок, %	Выход щенков на одну самку, гол.	Сохранность щенков к отъему, %	% щенков с физиологич. откл.
1	450	90	0,1	12	7,0	95,4	1,4
2	450	90	0,2	12	7,1	94,8	1,0
3	450	90	0,3	10	7,5	95,1	0,8
4	450	90	0,4	10	7,6	96,1	0,6
5	450	90	0,5	11	7,4	94,6	1,2
6	450	90	0,6	13	7,0	94,2	1,3
7 (контр)	450	90	-	13	6,7	93,8	1,6

Таблица 2. Результаты измерений толщины кожного покрова шкурок норок (n=15)

Table 2. The results of measurements of the thickness of the skin of mink skins (n = 15)

Толщина слоев, мкм	Контроль			Опыт		
	Бок	Хребет	Огузок	Бок	Хребет	Огузок
Эпидермис	25,1±3,1	33,7±3,5	36,3±3,0	31,6±3,7	19,0±4,0	46,4±3,9
Сосочковый слой	68,4±8,4	93,6±18,6	76,4±15,4	94,6±7,8	103,8±21,4	87,9±13,5
Сетчатый слой	621,7±20,6	929,5±34,8	942,4±32,7	753,7±36,4	969,1±40,7	1267,4±42,4

Таблица 3. Результаты определения количества волосяных фолликул (n=15) на площади 5x10⁵ мкм² на различных топографических участках шкурок

Table 3. Results of determining the number of hair follicles (n = 15) on an area of 5x10⁵ μm² in different topographic areas of skins

Количество фолликулов	Контроль			Опыт		
	Бок	Хребет	Огузок	Бок	Хребет	Огузок
Остевых волос	14,8±3,4	17,4±3,5	15,8±4,2	16,4±2,5	19,4±3,2	18,4±4,3
Пучков пуховых волос	7,6±2,3	12,6±3,2	6,5±1,5	11,6±1,8	15,8±3,3	10,7±1,7

хранность щенков норок к отъему 96,1% против 93,8% в контроле, количество щенков с физиологическими отклонениями 0,6% против 1,6% в контроле).

Эффективность скармливания белкового гидролизата в рационе кормления норок клеточного разведения оценивалась по товарным свойствам шкурок. Большинство потребительских свойств шкурок норок, как продукции биологического происхождения, зависит от их гистологического строения, определяемого в первую очередь микроструктурой кожного и волосяного покровов. Наиболее важными индикаторами являются толщина кожного покрова и соотношение его слоев, от которых зависит длительность обработки сырья при производственных операциях и показатели физико-механических свойств шкурок.

Анализируя полученные данные измерений толщины кожного покрова различных топографических участков шкурок норок контрольной и опытной группы, можно сделать вывод о том, что все показатели опытной группы превосходят контрольную. Максимальное значение толщины эпидермиса наблюдается на огузочной части, минимальное – на хребтовой у опытной группы норок. Максимально развит сосочковый слой на хребтовой части у опытной группы норок, минимально – на огузочной части у контрольной группы норок. В целом можно судить об увеличении толщины кожного покрова всех топографических участков у опытной группы норок, что, в свою очередь, может быть связано с увеличением числа волосяных фолликулов и различных включений сосочкового слоя за счет поступления дополнительных аминокислот, способствующих развитию волосяного покрова пушных зверей.

Исходя из полученных результатов можно заключить, что максимальное количество фолликулов остевых волос наблюдается на хребтовой части опытной группы, минимальное на боковой части контрольной группы. Таким образом, скармливание гидролизата из мышечной ткани соболей в составе основного рациона кормления норок повысило репродуктивную функцию животных, жизнеспособность их приплода, а также способствовало улучшению товарных свойств шкурок норок.

Литература

1. Максимюк Н.Н. Биотехнологические аспекты переработки белковых отходов животного происхождения / Н.Н. Максимюк, А.Н. Денисенко, Д.С. Мисак // *Фундаментальные исследования*. -2006. -№9. -С. 44-45.
2. Фролова М.А. Получение продуктов гидролиза белка из сырья животного и растительного происхождения / М.А. Фролова, А.И. Албулов, Р.В. Рогов // *Молодежная наука - пищевой промышленности: материалы II междуна. Научной конференции*. - Ставрополь. - 2011. -С. 151-154.
3. Гунько А.Е. Переработка отходов пушного звероводства как один из путей решения проблемы экологической безопасности / А.Е. Гунько, М.А. Фролова, А.И. Албулов, А.В. Гринь, А.К. Елисеев, А.В. Абрамов // *Ж. "Актуальная биотехнология"* - 2018г. -№3(26), - С. 208-209.
4. Буханцев О.В. Применение хитозана и белкового гидролизата в комплексе с пробиотиком "Муцинол" при откорме поросят / О.В. Буханцев, Р.В. Рогов, М.А. Фролова, // *Свиноводство* - 2012. - №3. -С. 69-71.
5. Чудилов О.А. Влияние белкового гидролизата на организм лошадей / О.А. Чудилов, Н.Н. Максимюк // *Учен. Зал. Института с.х. и Пр.*, Нов ГУ. - 2005. - Т.12. - В.2 - С. 36-38.
6. Беседин А.Н., Каспарьянц С.А., Игнатенко В.Б. Товароведение и экспертиза меховых товаров: Учебник для вузов - М.: Изд. Академия 2007. - 232 с.

References

1. Maksimyuk N.N. Biotechnological aspects of processing protein waste of animal origin / N.N. Maksimyuk, A.N. Denisenko, D.S. Misak // *Fundamental Research*. -2006. -№9. -p. 44-45.
2. Frolova M.A. Obtaining products of protein hydrolysis from raw materials of animal and plant origin / M.A. Frolov, A.I. Albulov, R.V. Rogov // *Youth science - food industry: materials of the II international. Scientific conference*. - Stavropol. - 2011. -S. 151-154.
3. Gunko A.E. Processing of waste from fur farming as one of the ways to solve problems of environmental safety / AE. Gunko, M.A. Frolov, A.I. Albulov, A.V. Grin, A.K. Eliseev, A.V. Abramov // *J. "Actual biotechnology"* - 2018. -No. 3 (26), -С. 208-209.
4. Bukhantsev OV The use of chitosan and protein hydrolyzate in combination with the probiotic "Mucinol" for fattening piglets / O.V. Bukhantsev, R.V. Rogov, M.A. Frolova, // *Pig breeding* - 2012. №3. - Number 3. -FROM. 69-71.
5. Chudilov O.A. Influence of protein hydrolyzate on the organism of horses / O.A. Chudilov, N.N. Maksimyuk // *Uchen. Hall. Institute of Agricultural Sciences etc.*, New GU. - 2005. - Т.12. - В.2 - С. 36-38.
6. Besedin A. N., Kaspariants S. A., Ignatenko V. B. Merchandising and examination of fur products: Textbook for universities - M.: Izd. Academy 2007. -- 232 p.

Пресс-релиз/ Press-release

За аналогичные правонарушения неоднократно привлекалось и раньше

Восемнадцатый арбитражный апелляционный суд оставил без изменения постановление Управления Россельхознадзора по Челябинской области о наказании производителя фальсифицированной молочной продукции

Управление Россельхознадзора по Челябинской области совместно с подведомственным Службе ФГБУ "Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов" отстаивали в апелляционной инстанции законность и обоснованность привлечения к административной ответственности челябинского производителя молочной продукции.

13 мая 2020 года должностными лицами Управления Россельхознадзора по Амурской области в рамках пищевого мониторинга в одном из магазинов города Благовещенска Амурской области была отобрана проба сладко-сливочного масла производства ООО "Росмол" (Челябинская область, город Озерск) и направлена в ФГБУ "ВГНКИ" для исследования на показатели качества и безопасности. Лабораторным путем установлено, что масло фальсифицировано растительными маслами или жирами на растительной основе, а также содержит консервант (сорбиновую кислоту).

Постановлением Управления Россельхознадзора по Челябинской области ООО "РОСМОЛ" было привлечено к ответственности в виде штрафа в размере 100 000 рублей за совершение административного правонарушения, предусмотренного ч. 1 ст. 14.43 КоАП РФ. Не согласившись с привлечением к ответственности, ООО "РОСМОЛ" оспорило законность постановления в суде.

12 января 2021 года Восемнадцатый арбитражный апелляционный суд оставил без изменения решение Арбитражного суда Челябинской области о признании законным постановления Управления Россельхознадзора по Челябинской области о привлечении ООО "РОСМОЛ" к административной ответственности за совершение административного правонарушения, предусмотренного ч. 1 ст. 14.43 КоАП РФ, – изготовление молочной продукции – масло сладко-сливочное "Крестьянское" с нарушениями требований технических регламентов ЕАЭС "О безопасности пищевой продукции", "О безопасности молока и молочной продукции" и ГОСТ 32261-2013 "Масло сливочное. Технические условия".

Управление Россельхознадзора по Челябинской области и ФГБУ "ВГНКИ" обращают внимание потребителей и всех заинтересованных лиц, что в 2019–2020 гг. ООО "РОСМОЛ" неоднократно привлекалось к административной ответственности за аналогичные правонарушения.

По материалам Россельхознадзора

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-3
 УДК 619:616.98:578.821.21:636.3

Действие дезинфицирующих препаратов на вирус оспы овец и коз в условиях внешней среды и в животноводческих помещениях



Атовуллозода Р.А.
Atovullozoda R.A.

¹Атовуллозода Р.А., кандидат ветеринарных наук, директор института

¹Жбанова С.Ю., кандидат ветеринарных наук, главный научный сотрудник

¹Одинаев К.А., кандидат ветеринарных наук, заведующий вирусологической лабораторией

¹Назруллозода С.Х., кандидат ветеринарных наук

¹Раджабалии М., аспирант лаборатории вирусологии

²Богомоллова О.А., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ ВНИТИБП

²Пухова Н.М., кандидат биологических наук, заведующая лабораторией вирусологии

¹Ветеринарный институт Таджикской академии сельскохозяйственных наук, Республика Таджикистан. г. Душанбе e-mail: iveterinari@vail.ru

²ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности", г. Щелково Московской области, e-mail: vnitibp@mail.ru

Ключевые слова: дезинфицирующее средство, контаминация, антивирусное действие, оспа овец и коз.

Резюме. Оспа овец и коз – остропротекающая контагиозная болезнь, характеризующаяся образованием специфической папулезно-пустулезной сыпи на коже и слизистых оболочках животных. Заболевание получило широкое распространение и в настоящее время часто регистрируется в странах Азии и Африки, где сосредоточено значительное поголовье овец и коз. Заболевание регистрируется на территории Евросоюза и Российской Федерации. В России оспа регистрируется в основном на приграничных территориях. В Республике Таджикистан в районе Хатлонской области оспа овец и коз относится к одному из пяти самых распространенных заболеваний мелкого рогатого скота, наносящих значительный экономический ущерб в отрасли в целом. Оспа овец и коз отнесена специалистами МЭБ к группе А – быстро распространяющихся болезней животных. Важную роль в недопущении появления и распространения оспы наряду с вакцинацией и карантинными мероприятиями играет соблюдение ветеринарно-санитарных

The effect of disinfectants on the sheep and goat pox virus in the environment and in livestock buildings

¹Atovullozoda R.A., ¹Zhbanova S.Yu.,

¹Odinaev K.A., ¹Nazrullozoda S.Kh., ¹Rajabaliya M.

²Bogomolova O.A., ²Pukhova N.M.

¹Veterinary Institute of the Medicine of the TASKHN Tajik Academy of Agricultural Sciences, Republic of Tajikistan. Dushanbe, iveterinari@vail.ru

²FGBNU "All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry", Shchelkovo, Moscow Region, vnitibp@mail.ru

Key words: disinfectant, contamination, antiviral effect, sheep and goat pox.

Abstract. Smallpox of sheep and goats is an acute contagious disease characterized by the formation of a specific papular-pustular rash on the skin and mucous membranes of animals. The disease has become widespread and is now often recorded in the countries of Asia and Africa, where a significant number of sheep and goats are concentrated. The disease is registered in the European Union and the Russian Federation. In Russia, smallpox is registered mainly in the border areas. In the Republic of Tajikistan, in the Khatlon region, sheep and goat pox is one of the five most common diseases of small ruminants, causing significant economic damage to the industry as a whole. Smallpox of sheep and goats has been classified by the OIE as Group A - rapidly spreading animal diseases. An important role in preventing the emergence and spread of smallpox, along with vaccination and quarantine measures, is played by observance of veterinary and sanitary standards when grazing livestock on pastures, places for drinking and keeping animals. The purpose of this work was to conduct comparative studies on the use of disinfectants to localize outbreaks of sheep and goat pox in the farms of the Republic of Tajikistan.

The experimental work was carried out at the Institute of Veterinary and in the production conditions of sheep-breeding farms in the Republic of Tajikistan. The effectiveness of new drugs was determined in comparison with traditional ones.

The results of the study showed a high virucidal activity of GAN, Dexid-400 and sodium hydroxide against the Variolaovium virus, the causative agent of sheep and goat pox. The use of these disinfectants indoors during outbreaks of sheep pox made it possible to prevent the spread of infection, reduce economic losses, while ensuring the safety and productivity of animals.

норм при выпасе скота на пастбище, местах поения и содержания животных.

Цель настоящей работы заключалась в проведении сравнительных исследований по применению дезинфицирующих средств для локализации вспышек оспы овец и коз в хозяйствах Республики Таджикистан.

Экспериментальная работа проводилась в Институте Ветеринарии ТАСХН и в производственных условиях овцеводческих хозяйств Республики Таджикистан. Определяли эффективность новых препаратов в сравнение с традиционными. Результаты исследования показали высокую вирулицидную активность препаратов GAN, Dexid-400 и гидроксидных

Для цитирования / For citation

Атовуллозода, Р.А. Действие дезинфицирующих препаратов на вирус оспы овец и коз в условиях внешней среды и в животноводческих помещениях / Р.А. Атовуллозода [и др.] // Ветеринария и кормление. -2021.-№1.- С. 11-13.

Atovullozoda R.A. The effect of disinfectants on the sheep and goat pox virus in the environment and in livestock buildings / R.A. Atovullozoda [et.al.] // Veterinaria i kormlenie. -2021.-№1.-P. 11-13.

Таблица – Эффективность дезинфицирующих средств в отношении возбудителя оспы овец в зависимости от их концентрации
Table – The effectiveness of disinfectants against the causative agent of sheep pox, depending on their concentration

Дезинфектант	Форма применения	Разведение (концентрация активного в-ва)	Время контакта, мин	Эффективность препарата, %
Гипохлорит натрия NaClO	Концентрированный раствор (10-12% активного хлора)	1:5 (2-3% активного хлора)	10-30	65
Гидроксид натрия NaOH	Гранулы	20 г/л (2%)	10-30	95
Глутаровый альдегид CH ₂ (CH ₂ CHO) ₂	Концентрированный раствор	по инструкции (2%)	10-30	85
ГАН	Концентрированный раствор	0.5 л/м ² (2%)	30	90
Дексид-400	Концентрированный раствор	1 л Dexid-400:200 л воды (2%)	20	95

да натрия против вируса *Variola ovium*, возбудителя оспы овец и коз. Применение этих дезинфектантов в помещениях при вспышках оспы овец позволило предотвратить распространение инфекции, снизить экономические потери обеспечив сохранность и продуктивность животных.

Введение

В Республике Таджикистан (РТ) разведение овец и коз является важной отраслью животноводства. Эти животные отлично приспособлены к горным условиям выживания, дают мясо, кожу, шерсть и молоко. В настоящее время в стране ставится задача превратить овцеводство и козоводство в высокодоходную отрасль.

При разведении овец и коз используют: отгонную систему овцеводства, летом – в горных зонах (с апреля по август месяцы), зимой – содержат в равнинных и предгорных зонах. Применяется совместный выпас и совместное содержание овец и коз. Быстрому развитию отрасли препятствует ухудшение эпизоотической ситуации по оспе овец и коз (ООК), которое за последние 30 лет отмечается во многих странах Евразии и Африки (зарегистрировано более чем в 70 странах мира) и наносит существенный экономический ущерб [1,4]. Болезнь возникает в любое время года, поражает животных всех возрастов, но наиболее тяжело проявляется у тонкорунных пород и у молодняка. Инфекция сопровождается массовыми абортными, гибелью новорожденных козлят (до 85–90%), истощением, потерей зрения, поражением вымени и приводит к бесплодию. Наиболее тяжело оспа протекает у коз перед окотом и в период окота. Восприимчивость коз к оспе зависит не только от породы, но и от условий содержания, кормления, времени года, а также от физиологического статуса животных. У истощенных животных болезнь протекает более тяжело, особенно в холодное осеннее время и зимой [2,3,5].

Целью настоящих исследований явилось изучение дезинфицирующей активности препаратов различных групп из числа ранее используемых гипохлорит натрия (окислитель), гидроксид натрия (щелочь) и глутаровый альдегид) и новых комплексных дезинфектантов ГАН (GAN) и Дексид-400 (Dexid-400) в отношении вируса оспы овец и коз в лабораторных и производственных условиях.

Материалы и методы

Работа проводилась в лаборатории вирусологии Института Ветеринарии ТАСХН и в двух овцеводческих хозяйствах Хатлонского региона Республики Таджикистан. Для сбора вирусного материала и постановки биологических проб использовано 44 головы овец и коз, 250 эмбрионов кур. Всего проведено 352 исследования с постановкой биопробы на белых лабораторных мышках, реакции диффузной преципитации в агаровом геле, реакции гемагглютинации и микроскопии.

Объектами внешней среды служили почва, кормушки, поилки, пол и стены кошар, ограждения для содержания животных. При изучении вирулицидной активности различных дезинфицирующих средств к ингибированию вируса оспы овец были использованы дезинфектанты: гидро-

ксид натрия, гипохлорит натрия, глутаровый альдегид, ГАН, Дексид-400.

Последние два препарата разработаны специально для дезинфекции объектов животноводческих помещений и выпускаются в промышленных объемах. ГАН содержит в своем составе 5% глутарового альдегида, 5% глиоксаля, 10% катаПАВа и обладает широким спектром антимикробного действия. Дексид-400 получен на основе оптимизированной смеси в водной среде глутаральдегида и четвертичных соединений аммония и обладает мощным воздействием глутаральдегидной составляющей. Дезинфицирующие препараты в производственных условиях использовали согласно инструкциям и по режимам, технологии и циклограммам профилактической и вынужденной дезинфекции объектов животноводческих помещений.

Результаты исследований

В процессе предварительных лабораторных исследований были установлены процент и сроки выживаемости вируса оспы овец в различных объектах внешней среды, его устойчивости к действию ряда современных и традиционных дезинфицирующих средств. Выявлены наиболее действенные дезинфектанты и режимы для обеззараживания возбудителя оспы. Полученные данные в дальнейшем послужили для разработки рекомендаций по обеззараживанию возбудителя оспы овец в очагах.

На первом этапе провели экспериментальные опыты на выживаемость вируса оспы к действию дезинфицирующих веществ. Периодически (согласно методическим рекомендациям) проводили исследование тест-объектов на наличие в них живого вируса путем постановки биологических проб на куриных эмбрионах, овцах и козах. Полноту инактивации агентов подтверждали постановкой биопробы.

На втором этапе были проведены исследования уровня контаминации вирусом оспы в двух хозяйствах Хатлонского региона, которые являлись стационарно неблагополучными по оспе коз и коз.

При изучении полноты инактивации агента и действие на вирус оспы и коз из доступных в практике химических средств (гидроксид натрия, хлорная известь, глутаровый альдегид) наиболее эффективным оказался гидроксид натрия из группы щелочей (95%). Гипохлорит натрия имел слабую эффективность и убивал вирус в течение 30 минут в 65% проб (см. Таблицу).

Хороших результатов удалось достичь при обеззараживании поверхностей современными дезинфицирующими препаратами, имеющими в своем составе комплекс групп дезосредств ГАН и Дексид-400. За 20–30 минут получен результат инактивации вируса оспы овец и коз в 90 – 95% случаях соответственно.

Таким образом, проведенные нами в лабораторных условиях исследования показали, что препараты ГАН, Дексид-400 и гидроксид натрия обладают наиболее высокой вирулицидной активностью и могут быть использованы для дезинфекции при проявлении вспышки оспы овец.

В животноводческих помещениях, которые ранее были неблагополучными по оспе овец и коз, после проведенной

дезинфекции препаратами ГАН, Дексид-400 и гидроксидом натрия, согласно инструкциям по применению и правилам проведения дезинфицирующих мероприятий, в пробах взятых после обработки через 1 сутки возбудитель оспы овец и коз не обнаружен.

Заключение

Наиболее эффективными средствами для дезинфекции вируса оспы овец и коз являются: 2 % раствор едкого натрия и растворы дезосредств 0,2% ГАН и 2% Дексид-400. Эти средства убивают вирус Variola ovium в 90–95% случаях в течение 20–30 минут.

Установлено, что вирулентность оставшихся живых микробов сохранялась, но их количество резко уменьшалось и не могло вызвать заболевание животных.

Литература

1. Акимова, Т.П. Эпизоотическая ситуация по оспе овец и коз в мире / Т.П. Акимова, В.П. Семакина // Ветеринарный врач. - 2019. - №3. - С. 3-8. DOI: 10.33632/1998-698X.2019-3-3-9.
2. Диев, В.И. Оспа овец и коз: эпизоотическая ситуация и профилактика / В.И. Диев, В.М. Захаров, А.М. Рахманов, Н.А. Яременко /

/ Ветеринария. - 2003. - №11. - С.20-28.

3. Инфекционная патология животных: в 3 т. / под ред. А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина - М.: ИКЦ "Академкнига", 2006. - Т1. - 2006. - 911 с.

4. Колбасов, Д.В. Трансмиссивные заболевания жвачных / Д.В. Колбасов // Животноводство России. - 2013. - №10. - С. 14-15.

5. Хухоров, И.Ю. Оспа овец в странах СНГ / И.Ю. Хухоров // Биологоэколог. проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии с.-х. жив-х и людей: матер. между. науч.-практ. конф., Покров, 2002. - С. 206-211.

Referens

1. Akimova, T.P. Epizooticheskaya situatsiya po ospe ovec i koz v mire / T.P. Akimova, V.P. Semakina // Veterinarnyy vrach. - 2019. - №3. - S. 3-8. DOI: 10.33632/1998-698X.2019-3-3-9.

2. Diev, V.I. Ospavovetkhoz: epizooticheskaya situatsiya i profilaktika / V.I. Diev, V.M. Zaharov, A.M. Rahmanov, N.A. Yaremenko // Veterinariya. - 2003. - №11. - S.20-28.

3. Infektsionnaya patologiyazhivotnyh: v 3 t. / pod red. A.YA. Samujlenko, B.V. Solov'eva, E.A. Nepoklonova, E.S. Voronina - M.: IKC "Akademkniga", 2006. - T1. - 2006. - 911 s.

4. Kolbasov, D.V. Transmissivnye zabolevaniya zhvachnyh / D.V. Kolbasov // Zhivotnovodstvo Rossii. - 2013. - №10. - S. 14-15.

5. Huhorov, I.YU. Ospavovetkhoz v stranah SNG / I.YU. Huhorov // Biologo-ekolog. problemy zaraznyh boleznej dikih zhivyh i rol' v patologii s.-h. zhiv-h i lyudej: mater. mezhd. nauch.-prakt. konf., Pокrov, 2002. - S. 206-211.

Пресс-релиз/ Press-release

В аптеке в Алтайском крае – грубые нарушения лицензионных требований

При проверке ветеринарной аптеки в Алтайском крае установлены грубые нарушения лицензионных требований Управлением Россельхознадзора по Алтайскому краю в январе 2021 года была проведена плановая выездная проверка в отношении индивидуального предпринимателя Старцевой Е. И., осуществляющей фармацевтическую деятельность в сфере обращения лекарственных средств для ветеринарного применения на территории города Бийска.

При проверке ветеринарной аптеки установлены нарушения правил хранения лекарственных средств для ветеринарного применения:

- отделка стен помещения не допускает возможности проведения влажной уборки;
- отсутствуют документы, подтверждающие поверку прибора для регистрации температуры в холодильнике;
- отсутствуют стеллажные карты, нумерация и маркировка полок и витрин;
- отсутствует систематизация;
- нарушены условия фиксирования параметров воздуха в помещении для хранения лекарственных препаратов и холодильном оборудовании;
- не осуществляется учет лекарственных средств, срок годности которых составляет менее одной трети от всего срока годности, в обращении у ИП Старцевой Е. И. выявлены лекарственные препараты, срок годности которых истек;
- отсутствует специально выделенная зона или отдельный контейнер для лекарственных средств с истекшим сроком годности, в поврежденной упаковке, недоброкачественных, фальсифицированных или контрафактных.

ИП Старцевой Е. И. выдано предписание об устранении нарушений, лекарственные препараты с истекшим сроком годности в количестве 12 упаковок изъяты из обращения и направлены на уничтожение.

Выявленные нарушения стали основанием для возбуждения дела об административном правонарушении, в связи с чем в отношении ИП Старцевой Е.И. составлен протокол по ч. 4 ст. 14.1 КоАП РФ (осуществление предпринимательской деятельности с грубым нарушением требований и условий, предусмотренных специальным разрешением (лицензией)).

Материалы дела об административном правонарушении переданы в Арбитражный суд Алтайского края.

Ответственность за торговлю контрафактом

В Курской области предприниматель привлечен к ответственности за торговлю контрафактными лекарственными средствами

Управлением Россельхознадзора по Орловской и Курской областям в ветеринарной аптеке ИП Талдыкиной С. А. (Курская область, Октябрьский район) установлены грубые нарушения Федерального Закона "Об обращении лекарственных средств", Положения о лицензировании фармацевтической деятельности.

Так, в ветеринарной аптеке осуществлялась розничная торговля и хранение контрафактных обезличенных лекарственных препаратов для ветеринарного применения без маркировки производителя (порошок бежевого цвета, расфасованный в полипропиленовые пакеты в количестве 10 шт.).

По результатам мероприятий Управлением Россельхознадзора были составлены материалы дела об административном правонарушении и направлено заявление о привлечении к административной ответственности в Арбитражный суд Курской области.

Решением суда, вступившим в законную силу 26 января 2021 года, ИП Талдыкина С. А. привлечена к административной ответственности, предусмотренной частью 4 статьи 14.1 КоАП РФ, с назначением административного наказания в виде административного штрафа с передачей на уничтожение изъятых контрафактных лекарственных препаратов для ветеринарного применения.

По материалам Россельхознадзора

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-4
УДК:576.57

Применение инновационной технологии интерферометрии биослоя молекул в фундаментальных исследованиях при создании новых вакцин



Гринь С.А.
Grin S. A.

Гринь С.А., член-корреспондент РАН, заместитель директора

Матвеева И.Н., доктор биологических наук, профессор, зам. директора по бионанотехнологиям
ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности (141142, Московская область, пос. Биокомбината, ВНИТИБП, тел.: +7(496) 567-32-63; vnitibp@mail.ru)

Ключевые слова: технология интерферометрии биослоя, вакцина, вирус, антиген, эпитоп, иммуногенность.

Резюме. Один из эффективных методов анализа белка в режиме реального времени основан на явлении интерференции света и называется "биослойная интерферометрия". Патентованная технология биослойной интерферометрии (Bio-Layer Interferometry, BLI), которая лежит в основе платформы ForteBio Octet, обеспечивает анализ взаимодействий на поверхности одноразовых оптоволоконных биосенсоров. В статье представлена технология интерферометрии биослоя молекул BLI, которая может быть использована для определения кинетики и аффинности, для специфического количественного определения молекул, связанных с биосенсором. Целью обзора являлось обобщение научных данных по использованию технологий интерферометрии биослоя молекул BLI в определении концентрации белков и изучении кинетики взаимодействия с использованием систем Octet при создании новых вакцин многими способами. Технология интерферометрии биослоя молекул BLI позволяет измерять концентрацию протеинов без использования меток или вспомогательных реагентов, даже в необработанных средах. Она характеризуется чувствительностью вплоть до нескольких нг/см³, обеспечивает точные количественные изменения за несколько секунд, а не за многие часы, как традиционные методы (ELISA, HPL Coder). Показатели аффинности, концентрации и кинетика связывания изучаемых белков могут

Application of innovative technology of biolayer interferometry in basic research in the development of new vaccines

Grin S. A., Doctor of Biological Sciences, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Deputy Director

Matveeva I. N., Doctor of Biological Sciences
Russia, Moscow region., Schelkovsky m, pos. Biokombinata, house 17, Federal State Budget Scientific Institution All-Russian Scientific Research and Technological Institute of Biological Industry, (FGBNU VNITIBP), vnitibp@mail.ru

Key words: biolayer interferometry technology, vaccine, virus, antigen, epitope, immunogenicity.

Abstract. One of the effective methods for real-time protein analysis is based on the phenomenon of light interference and is called "biolayer interferometry". The patented Bio-Layer Interferometry (BLI) technology, which underlies ForteBio Octet platform, provides surface interaction analysis for disposable fiber optic biosensors. The article presents the technology of interferometry of the biolayer of BLI molecules, which can be used to determine the kinetics and affinity, for the specific quantitative determination of molecules bound to the biosensor. The purpose of the review was to summarize scientific data on the use of the interferometry technology of the biolayer of BLI molecules in determining the concentration of proteins and studying the kinetics of interaction using Octet systems when creating new vaccines in many ways. BLI biolayer interferometry technology allows protein concentration measurements to be performed without using of labels or auxiliary reagents, even in untreated media. It is characterized by a sensitivity up to several ng/cm³, provides accurate quantitative changes in a few seconds, and not in many hours like traditional methods (ELISA, HPL Coder). The affinity, concentration, and binding kinetics of the studied proteins can be measured in 4- μ l drop samples directly on the laboratory table. The technology of interferometry of the biolayer of BLI molecules can be used by researchers to select the most immunogenic epitopes in the molecular structure of a pathogen, it is also possible to conduct studies on the characterization and recognition, diversity and distribution of pathogens, affinity for antibodies, it is possible to characterize the immune response of the host, to study molecular interactions between the pathogen and the host, and to carry out therapeutic and clinical research. Currently, the technology of interferometry of the biolayer of BLI molecules has already been used in fundamental studies of pathogens that cause HIV, herpes, Ebola, influenza A H7N9, Dengue, malaria, Zika virus, diphtheria, tuberculosis, listeriosis, gastroenteritis, respiratory pathology, including the COVID outbreak. -19.

измеряться в капельных пробах объёмом 4 мкл прямо на лабораторном столе. Технология интерферометрии биослоя молекул BLI может применяться исследователями для выбора наиболее иммуногенных эпитопов в молекулярной структуре патогена, также возможно проводить исследования по характеристике и распознаванию, разнообразию и распространению патогенов, сродству к антителам, можно давать характеристику иммунного ответа хозяина, изучать молекулярные взаимодействия патогена и хозяина, а также

Для цитирования / For citation

Применение инновационной технологии интерферометрии биослоя молекул в фундаментальных исследованиях при создании новых вакцин / Гринь С.А., Матвеева И.Н. // Ветеринария и кормление. - 2021. - №1 - С. 14-16.

Application of innovative technology of biolayer interferometry in basic research in the development of new vaccines / Grin S.A., Matveeva I.N. // Veterinaria i kormlenie. - 2021. - #1. - P. 14-16.

осуществлять терапевтические и клинические исследования. В настоящее время технология интерферометрии биослоя молекул BLI уже использована в фундаментальных исследованиях патогенов, вызывающих ВИЧ, герпес, Эбола, грипп А H7N9, Денге, малярию, болезнь Зика, дифтерию, туберкулез, листериоз, гастроэнтериты, респираторную патологию, в том числе и вспышку COVID-19.

В настоящее время внимание российских исследователей привлекла инновационная технология интерферометрии биослоя молекул BLI в определении концентрации белков и изучении кинетики взаимодействия с использованием систем Octet. Один из эффективных методов анализа белка в режиме реального времени основан на явлении интерференции света и называется "биослойная интерферометрия". Устройства, работающие по этому принципу, позволяют быстро в комплексе решать задачи по исследованию вирусов и разработке вакцин, взаимодействию РНК и ДНК, белково-липидного взаимодействия, характеристике антител и фрагментов антител, созданию новых лекарственных препаратов.

Считаем, что технология интерферометрии биослоя молекул BLI будет очень полезна при фундаментальных исследованиях с целью разработки вакцин. Пояснения представлены ниже на конкретных примерах.

Безмаркерная технологии в реальном времени (RT-LF) внесла большой вклад в фундаментальные исследования, а также широко используется при разработке, и при производстве вакцин в последние годы. Биосенсорные технологии на основе Surface Plasmon Resonance (SPR), Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRi), и интерферометрии биослоя молекул (BLI) имеют доказанную практическую ценность и эффективность мониторинга молекулярных взаимодействий, так как связывающие события могут контролироваться в режиме реального времени без необходимости дополнительной и дорогостоящей маркировки. Эти

РТ-НЧ биосенсорные методы являются очень мощными и полезными для характеристики молекулярных взаимодействий на большинстве стадий производства и разработки вакцин. Эти биосенсорные методы используют ведущие мировые лидеры – производители ветеринарных вакцин, например фирма "Берингер", технология BLI используется учеными в России в "Сколково".

Так как технология BLI может быть использована для определения кинетики и аффинности, для специфического количественного определения молекул, связанных с биосенсором, что обеспечивает широкий спектр применений. Использование технологии BLI может помочь в исследованиях при разработке вакцин многими способами: подбирать наиболее иммуногенные эпитопы в молекулярной структуре патогена, проводить исследования по характеристике и распознаванию, разнообразию и распространению патогенов, средству к антителам, можно давать характеристику иммунного ответа хозяина, изучать молекулярные взаимодействия патогена и хозяина, а также осуществлять терапевтические и клинические исследования.

В настоящее время технология BLI уже использована в фундаментальных исследованиях патогенов, вызывающих ВИЧ, герпес, Эбола, грипп А H7N9, Денге, малярию, болезнь Зика, дифтерию, туберкулез, листериоз, гастроэнтериты, респираторную патологию, в том числе и вспышку COVID-19.

Невероятное разнообразие микробов и их способность к адаптации требуют постоянного изучения молекулярных взаимодействий и понимания механизма действия болезни. Правильный подбор дизайна эпитопа, отвечающего за иммуногенность, повлияет на эффективность вакцины, так как различные эпитопы могут иметь различную иммуногенность, функции и мишени. Следующие примеры показывают стратегии, которые использует технология BLI и как она работает, чтобы внести свой вклад в понимание и характеристику дизайна эпитопов для разработки вакцин или улучшения вакцины.

Хотя вакцина против натуральной оспы хорошо известна и была одной из первых вакцин, в настоящее время возникают проблемы с ортологическими штаммами. Поскольку широкомасштабные усилия по вакцинации против оспы закончилась, население в целом больше не может быть защищено от ортопоксвирусов, которые включают вирус оспы обезьян и различные штаммы вирусов коровьей оспы. Технология BLI используется как инструмент, чтобы помочь в поиске межвидового защитного механизма и в разработке вакцины против вируса коровьей оспы. Хорошо организованная стратегия BLI обобщена и проиллюстрирована на Рисунке 1, в котором зарубежные авторы изучили эпитопы L1, чтобы понять защитный механизм анти-L1 антител, поскольку антитела к эпитопу L1 являются важной мишенью для вирусной нейтрализации. Рекомбинантные белки L1 (N27, Q31, и D35) подвергали простой замене аланином с использованием сайт-направленного мутагенеза, и мутировавшие рекомбинантные белки L1 были иммобилизованы на биосенсорах Ni-NTA

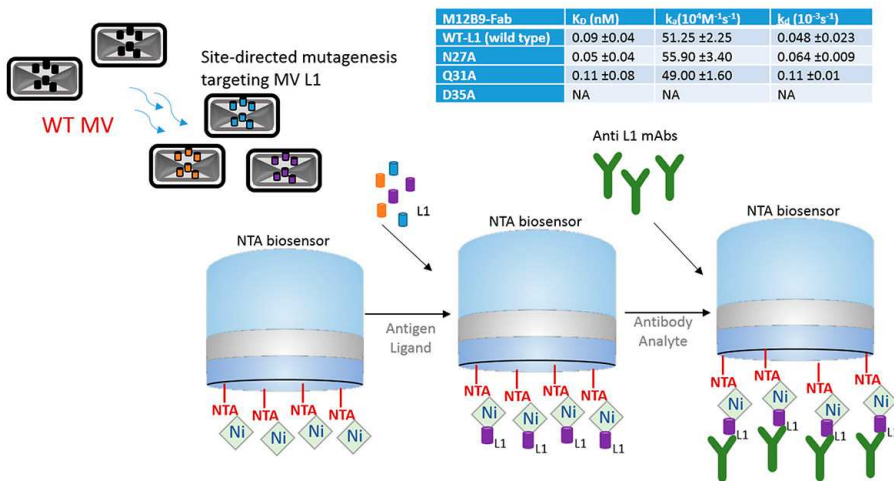


Рисунок 1. Схема стратегии био-слоевой интерферометрии (BLI) с использованием заряженного никелем Трис-нитрилотриуксуса (NTA) биосенсор для идентификации вирусных остатков L1, которые наиболее активны после введения вакцины. Сайт-направленный мутагенез использовался для изменения остатков L1, а BLI - для проверки их сродства к анти-L1 mAbs. В таблице приведены результаты константы связывания M12B9-Fab по сравнению с диким типом, N 27 A, Q31A и D35A. Кд-это константы аффинности, ка-ассоциация постоянная, и KD является константой диссоциации. Данные в таблице получены из опубликованных данных [6] с согласия автора. **Figure 1.** Schematics of bio-layer interferometry (BLI) strategy using a nickel-charged trisnitrilotriacetic (NTA) biosensor for the identification of viral L1 residues that are most active during vaccinia infection. Site-directed mutagenesis was used to alter L1 residues, and BLI was used to test their affinity to anti-L1 mAbs. Table shows binding constant results of M12B9-Fab versus wild-type, N27A, Q31A, and D35A. KD is affinity constant, ka is association constant, and kd is dissociation constant. Table data was derived from published data [6] with author consent.

через его С-концевой гексагистамин tag, и моноклональные антитела mAb против L1, используемые в качестве аналита. Измеряя константу аффинности (KD), скорость ассоциации константу (ka) и константу скорости диссоциации (kd), используя модель связывания 1: 1, авторы сравнили кинетику связывания WT-L1 (дикого типа или полевого типа), N27A, Q31A и D35A с антителами mAb. В результате они не обнаружили связывания D35A с M12B9-Fab, тогда как между белками полевого штамма и N27A и Q31A (рисунок 1, таблица) не наблюдалось значительной разницы в аффинности связывания с антителами mAb к эпитопу L1.

Эти результаты показывают, что M12B9 связывается с белком L1 с высоким сродством, но одна замена D35A в L1 отменяет связывание, что доказывает, что боковая цепь D35 важна для связывания группы мощных нейтрализующих антител. Это исследование показывает, как BLI может внести большой вклад в понимание функциональных способностей белков, участвующих в распознавании вируса, что может привести к повышению эффективности вакцины в будущем. В этом случае эпитоп сначала иммобилизуется на биосенсоре, а антитела mAb в растворе позволяют связываться с эпитопами. Этот подход полезен для сайт-направленного исследования мутагенеза, потому что технология BLI помогает тестировать модифицированные пептиды на их сродство и связывающие характеристики.

Очень интересен еще один подход использования технологии BLI при разработке вакцин – это подбор эпитопа патогена и вычислительный дизайн каркаса эпитопа для трансплантации интересующего эпитопа на гетерологичный белковый каркас. Эта стратегия создания вакцины, ориентированная на эпитопы, может быть очень успешной в повышении эффективности вакцины. В следующем примере технологии BLI были использованы для тестирования аффинности каркасов эпитопа вируса гепатита С к нейтрализующим антителам. В отличие от оспы, вакцин против вируса гепатита С не существует. Разработка профилактической вакцины против гепатита С была затруднена из-за большого разнообразия вирусной структуры и особенностей иммунного ответа хозяина. Исследователи Neetal. разработали "скаффолды" эпитопа вируса гепатита С из антигенных сайтов гликопротеинов E1 и E2. Авторы провели поиск и отфильтровали потенциальные каркасы, используя метод матричного мета-сервера, который состоит из шести различных баз данных: TM-align (F), TM-align (C), SPAlign, CLICK, FAST и Mammoth. Затем авторы моделировали потенциальные каркасы эпитопов. Отобранные каркасы эпитопов были экспрессированы в клетках, очищены и их сродство проверено на приборе BLI Octet. Структурное моделирование и расчетные конструкции могут быть протестированы экспериментально с использованием различных платформ BLI, превращая теорию в реальность. В своем исследовании авторы использовали инструмент BLI - Octet RED96 – для демонстрации сродства связывания между каркасами эпитопов вируса гепатита С и нейтрализующими антителами, что помогло охарактеризовать и выбрать наиболее эффективные каркасы.

Биосенсорные технологии предоставляют информацию о сродстве и кинетике связывания, которая имеет решающее значение для исследований характеристик. Технология BLI может предоставить константы скорости включения и выключения связывания антитела с антигеном путем подбора модели.

Ниже приводим пример использования технологии биослойной интерферометрии (BLI) при разработке вакцины против короновиральной инфекции. Используя технологию биослойной интерферометрии (BLI), зарубежные ис-

следователи разработали ряд тестов для идентификации антител с реакционной способностью к SARS-CoV-2 и для обеспечения быстрой характеристики кандидатов на вакцину SARS-CoV-2. Серьезность вспышки COVID-19 подчеркивает необходимость разработки терапевтических препаратов, таких как: вакцины, низкомолекулярные ингибиторы и препараты для иммунотерапии.

Первоначально исследователи протестировали набор моноклональных антител SARS-CoV, полученных из ресурсов BEI, для оценки перекрестной реактивности к гликопротеину SARS-CoV-2 Spike. Эти антитела нацелены на консервативный эпитоп, присутствующий на SARS-CoV и связанных с ним бета-коронавирусах, сосредоточенных на рецептор-связывающем домене Proline 384. Используя этот набор антител и дополнительный набор сильнодействующих нейтрализующих антител, учёные провели антигенный скрининг более чем 100 кандидатов на вакцину из наночастиц SARS-CoV-2. Подмножество этих иммуногенов было оценено в исследованиях иммуногенности у мышей. Используя системы Octet и технологию BLI, исследователи оценили вызванную вакциной выработку специфических антител против домена, связывающего рецептор вируса SARS-CoV-2 (RBD), чтобы сделать возможным отбор кандидатов на вакцину. Кроме того, используя рекомбинантный белок рецептора ACE2, был разработан анализ ингибирования ACE2 для оценки активности специфических антител к ACE2, индуцированных вакциной. Кроме того, применение системы Octet также позволило в тот же день исследовать вновь продуцированные белки-кандидаты иммуногенов и быстро проанализировать вызванные ими иммунные реакции после вакцинации.

Таким образом, учитывая все выше изложенное, можно сделать вывод о необходимости использования безмаркерной технологии измерения BLI и систем Octet в области фундаментальных научных исследований по разработке отечественных вакцин.

Литература.

1. Х. Вюнше, Д. Зиверс Безмаркерный анализ белка методом биослойной интерферометрии // Аналитика. -2015.-№6 (25).-с.84-88
2. Zika and Dengue Structural Basis of Potent Zika-dengue Virus Antibody Cross-Neutralization, Barba-Spaeth G, et al., Nature, 2016, 536(7614):48-53
3. Dengue Virus Infection Is through a Cooperative Interaction between a Mannose Receptor and CLEC5A on Macrophage as a Multivalent Hetero-Complex, Lo YL, et al., PLoS One, 2016, 11(11):e0166474
4. Antibody-Mediated Internalization of Infectious HIV-1 Virions Differs among Antibody Isotypes and Subclasses, Tay MZ, et al., PLoS Pathog, 2016, 12(8):e1005817
5. HIV-infected T-cell Immunogenicity of a Prefusion HIV-1 Envelope Trimer in Complex with a Quaternary Structure-Specific Antibody, Cheng C, et al., J Virol, 2015, 90(6):2740-55
6. Kaefer, T.; Meng, X.; Matho, M.H.; Schlossman, A.; Li, S.; Selaculang, I.; Ofran, Y.; Buller, M.; Crump, R.W.; Parker, S.; et al. Potent Neutralization of Vaccinia Virus by Divergent Murine Antibodies Targeting a Common Site of Vulnerability in L1 Protein. J. Virol. 2014, 88, 11339-11355. [CrossRef] [PubMed]

References

1. H. Wunsche, D. Sievers Marker-free protein analysis by biolayer interferometry // Analytica. - 2015.-№6 (25) . - p.84-88
2. Zika and Dengue Structural Basis of Potent Zika-dengue Virus Antibody Cross-Neutralization, Barba-Spaeth G, et al., Nature, 2016, 536 (7614): 48-53
3. Dengue Virus Infection Is through a Cooperative Interaction between a Mannose Receptor and CLEC5A on Macrophage as a Multivalent Hetero-Complex, Lo YL, et al., PLoS One, 2016, 12 (8): e0166474
4. Antibody-Mediated Internalization of Infectious HIV-1 Virions Differs among Antibody Isotypes and Subclasses, Tay MZ, et al., PLoS Pathog, 2016, 12 (8): e1005817
5. HIV-infected T-cell Immunogenicity of a Prefusion HIV-1 Envelope Trimer in Complex with a Quaternary Structure-Specific Antibody, Cheng C, et al., J Virol, 2015, 90 (6): 2740-55
6. Kaefer, T.; Meng, X.; Matho, M.H.; Schlossman, A.; Li, S.; Selaculang, I.; Ofran, Y.; Buller, M.; Crump, R. W.; Parker, S.; et al. Potent Neutralization of Vaccinia Virus by Divergent Murine Antibodies Targeting a Common Site of Vulnerability in L1 Protein. J. Virol. 2014, 88, 11339-11355. [CrossRef] [PubMed]

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-5
УДК 57.083.34

Эффективность конъюгированных с флуоресцеином антирабических и антихламидийных антител, высушенных сублимационно



Клюкина В.И.
Klyukina V.I.-

Клюкина В.И. – доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом иммунологии ФГБНУ ВНИТИБП, г. Щелково, klyukinavi@yandex.ru

Люлькова Л.С. – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела обеспечения качества лекарственных средств для животноводства и ветеринарии ФГБНУ ВНИТИБП, г. Щелково, lasl_51@mail.ru

Анисина О.В. – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ ВНИТИБП, г. Щелково, anisina-olga@mail.ru

Глинский К.А. – и.о. заведующего отделом сушки биологических препаратов ФГБНУ ВНИТИБП, г. Щелково, glinskiy_kirill@mail.ru

Лобанова В.А. – аспирант ФГБНУ ВНИТИБП, г. Щелково, varya307@yandex.ru

Святенко М.С. – младший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ ВНИТИБП, г. Щелково, svyatenko@mail.ru

Ключевые слова: декстран, флуоресцирующие конъюгаты, лиофильные препараты, сублимационная сушка, таблетка, влажность, специфичность.

Резюме. Резюме. В данной статье представлены результаты исследования эффективности конъюгированных с флуоресцеином антирабических и антихламидийных антител, высушенных сублимационно. Лиофилизация иммунобиологических препаратов является одним из наиболее надежных способов сохранения их биологических и физико-химических свойств, так как это способ мягкой сушки, при котором высушиваемый препарат замораживается, потом помещается в вакуумную камеру, где и происходит сублимация растворителя. Лиофилизация позволяет получать препараты без потери их формы, структурной целостности и что более важно, без потери их биологической активности.

Целью исследования являлась стандартизация способов очистки ФИТЦ-конъюгатов, а также реагентов, используемых в процессе их производства и высушивания. В работе использовали конъюгаты антирабических и анти-

Efficiency of fluorescein-conjugated anti-rabies and anti-chlamydia antibodies freeze-dried

Klyukina V.I. – FGBNU VNITIBP, Schelkovo, klyukinavi@yandex.ru

Lyulkova L.S. – FGBNU VNITIBP, Schelkovo, lasl_51@mail.ru

Anisina O.V. – FGBNU VNITIBP, Schelkovo, anisina-olga@mail.ru

Glinsky K.A. – FGBNU VNITIBP, Schelkovo, glinskiy_kirill@mail.ru

Lobanova V.A. – FGBNU VNITIBP, Schelkovo, varya307@yandex.ru

Svyatenko M.S. – FGBNU VNITIBP, Schelkovo, svyatenko@mail.ru

Keywords: dextran, fluorescent conjugates, lyophilic preparations, freeze-drying, tablet, moisture, specificity.

Abstract. This article presents the results of a study of the effectiveness of anti-rabies and anti-chlamydia antibodies conjugated with fluorescein, freeze-dried. Immunobiological products lyophilization is one of the most reliable ways to preserve their physicochemical and biological properties, since this is a soft drying method, in which the dried product is frozen, then it is placed in a vacuum chamber, where the solvent is sublimated. Lyophilization allows you to get drugs without losing their shape, structural integrity and more importantly, without losing their biological activity. The study aimed to standardize methods for the purification of FITC conjugates, as well as reagents used in the production and drying of FITC conjugates. We used conjugates of anti-rabies and anti-chlamydia antibodies labeled with fluorescein isothiocyanate (FITZ) obtained by hyperimmunization of sheep and rams using an immunostimulant. We tested the ability of various concentrations of dextran T-70 to retain the specific activity of fluorescent conjugates of anti-rabies and anti-chlamydia antibodies when added dextran T-70 to them before the lyophilization. To determine the optimal amount of T-70 dextran filler, prepared 1%, 2%, 3%, 4%, and 5% solutions in 10mm phosphate-salt solution. We found that the effectiveness of dextran T-70 as a filler substance in the lyophilization of FITC conjugates depends on its concentration. The optimal stabilizing vehicle for lyophilization of both fluorescent conjugates is 2-3% concentration of dextran T-70 in 10 mM phosphate-buffered saline. Analysis of the results of the quality of FITZ-conjugates allows us to conclude about the high quality of biological products prepared during freeze-drying of the material in the developed temperature regime using dextran T-70 as a filler substance.

As a result of the studies, the technology for the preparation of lyophilized FITC conjugates of anti-rabies and anti-chlamydia antibodies for diagnostic test systems was optimized. The specific activity and stability of the physicochemical characteristics of the preparations after lyophilization and during subsequent storage for two years were observed.

Для цитирования / For citation

Клюкина В.И. Эффективность конъюгированных с флуоресцеином антирабических и антихламидийных антител, высушенных сублимационно / Клюкина В.И., Люлькова Л.С., Анисина О.В., Глинский К.А., Лобанова В.А., Святенко М.С. // Ветеринария и кормление. - 2021. - №1 - С. 17-19.

Klyukina V.I. Efficiency of fluorescein-conjugated anti-rabies and anti-chlamydia antibodies freeze-dried / Klyukina V.I., Lyulkova L.S., Anisina O.V., Glinsky K.A., Lobanova V.A., Svyatenko M.S. // Veterinaria I kormlenie. 2021.- №1.- P. 17-19.

хламидийных антител меченных флуоресцеинизотиоционатом (ФИТЦ), полученных гипериммунизацией овец и баранов с применением иммуностимулятора. Тестировали способность различных концентраций декстрана Т-70 сохранять специфическую активность флуоресцирующих конъюгатов антирабических и антихламидийных антител при его добавлении к ним перед лиофильной сушкой. Для определения оптимального количества наполнителя декстрана Т-70, готовили 1%, 2%, 3%, 4%, и 5% растворы в 10ММ фосфатно-солевом растворе. Было установлено, что эффективность декстрана Т-70 в качестве вещества-наполнителя при лиофилизации ФИТЦ-конъюгатов варьирует в зависимости от используемой концентрации. Оптимальным стабилизирующим наполнителем для лиофилизации обоих флуоресцирующих конъюгатов является 2–3% декстран Т-70 в 10ММ фосфатно-солевом растворе. Анализ результатов качества ФИТЦ-конъюгатов позволяет сделать вывод о высоком качестве биопрепаратов, приготовленных при сублимационной сушки материала в разработанном температурном режиме с использованием в качестве вещества-наполнителя декстрана Т-70.

В результате проведенных исследований оптимизирована технология приготовления лиофилизированных ФИТЦ-конъюгатов антирабических и антихламидийных антител для диагностических тест-систем с сохранением специфической активности и стабильности физико-химических характеристик препаратов после лиофильного высушивания и в процессе последующего хранения в течение двух лет.

Введение

Для диагностики многих инфекционных болезней, в том числе бешенства применяют метод флуоресцирующих антител (МФА), который остается золотым стандартом в диагностике, так как обладает высокой чувствительностью, экспрессностью выполнения, простотой постановки и относительной дешевизной [2,4]. Чувствительность метода МФА напрямую зависит от активности и специфичности антител, меченых флуоресцеинизотиоционатом (ФИТЦ). Лиофилизация биологических препаратов является одним из способов сохранения их биологических свойств. Введение в раствор биопрепарата перед лиофилизацией защитной среды предотвращает падение его специфической активности и увеличивает срок хранения за счет формирования объемной таблетки [3]. Для лиофилизации биопрепаратов применяют различные стабилизаторы: среды на основе сахарозы и желатина, смеси глицина и маннитола, бычий сывороточный альбумин или декстраны различной молекулярной массы.

Целью исследования являлась стандартизация способов и реагентов, используемых для очистки и лиофилизации ФИТЦ-конъюгатов.

В экспериментах по лиофильному высушиванию меченых флуоресцеинизотиоционатом антирабических и антихламидийных антител, нами изучена эффективность защитного действия декстрана Т-70 на сохранность специфической активности конъюгатов после лиофилизации и при их хранении в течение двух лет.

Материалы и методы

Для сублимации использовали конъюгаты антирабических и антихламидийных антител с флуоресцеинизотиоционатом (ФИТЦ - $C_{20}H_{12}O_5$ из группы ксантиновых красителей, 90–97% чистоты, "Sigma"). В работу отбирали высокоактивные антирабические сыворотки с титром преципитирующих антител не менее 1:64 – 1:256 и хламидийные иммунные сыворотки с активностью комплементсвязывающих антител в РСК 1:160–1:320 и отсутствием антител к тканевым белкам, полученных гипериммунизацией овец и баранов с применением иммуностимулятора [1,4,5,6]. Активность сывороток устанавливали с компонентами набора "Набор компонентов для диагностики бешенства в реакции диффузионной преципитации (РДП)" ТУ 9388-006-0049763-99 и 99 и в РСК, используя компоненты "Набора для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных в РСК и РДСК" ТУ-9388-020-00497963-05, разработанными в отделе обеспечения качества лекарственных средств методом Е. Kuwert (1973).

Хроматографически чистые фракции антител получали методом ионообменной хроматографии из обогащенной глобулинами фракции, полученной одним из методов с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000 Д), риванола (этакридинлактат), каприловой кислоты (ТУ 6-09-529-75) и этанола из сыворотки крови баранов, иммунизированных очищенным вирусом бешенства производственного штамма "Овечий-ВГНКИ" и иммунной сыворотки крови овец, иммунизированных штаммом "Улетово-96-ВНИТИБП".

Для определения оптимального количества наполнителя декстрана Т-70 (Dextran 70, "AppliChem") готовили 1%, 2%, 3%, 4%, и 5% растворы декстрана Т-70 в 10ММ фосфатно-солевом растворе pH 7,4±0,2. Сублимационную сушку конъюгатов проводили на установках Usifroid SM.J. и TG-50 с выполнением дифференциально-термического анализа (ДТА) каждой пробы при замораживании и последующем нагревании замороженных образцов. Эффективность высушенных конъюгатов оценивали по внешнему виду, спектру субклассов IgG, наличию конгломератов в ФИТЦ-конъюгатах методом гель-хроматографии на сефадексе G-100. Специфическую активность после сублимационной сушки и в процессе хранения при (2+8°C) в течение 2-х лет конъюгата хламидийных антител с ФИТЦ оценивали на мазках-отпечатках желточных мешков эмбрионов кур, инфицированных хламидиями штамма "Улетово-96-ВНИТИБП, антирабического конъюгата – методом МФА на мазках-отпечатках мышей, зараженных тест-штаммом вируса бешенства "CVS".

Результаты и обсуждение

Методы, применяемые на разных этапах приготовления конъюгатов антител с флуоресцеинизотиоционатом, не могут быть полностью стандартизированы из-за variability отдельных особенностей, определяющих специфичность и чувствительность ФИТЦ-конъюгатов. Результаты изучения зависимости реагентов и способа фракционирования показали, что осадки глобулина после фракционирования антирабической и антихламидийной сывороток с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ), спирто-риванола и каприловой кислоты содержали 75–95% целевого

Таблица 1. Характеристика ФИТЦ-конъюгатов после сублимационной сушки
Table 1. Characteristics of FITC conjugates after sublimation drying

Вид конъюгата	Характеристика ФИТЦ-конъюгатов					
	Внешний вид	Наличие конгломератов	Специфичность, титр в МФА			Остаточная влажность (%)
			до сушки	после сушки	через 2 года	
ФИТЦ- антирабический глобулин	таблетка	нет	1:128-1:256	1:128-1:256	1:128	1,8±0,2
ФИТЦ- антихламидийный глобулин	таблетка	нет	1:80-1:320	1:80-1:320	1:80-1:160	1,6±0,1

белка 92–97% чистоты с минимальной влажностью 56–60%, при максимальной влажности до 75–80% с применением солевой экстракции. В дальнейших опытах схема приготовления ФИТЦ-конъюгатов была унифицирована и для ионообменной хроматографии использовали глобулиновую фракцию, выделенную 7,5% ПЭГ-6000.

Для сублимационной сушки ФИТЦ-конъюгатов готовили по 5 серий препаратов с содержанием декстрана Т-70 от 1 до 5%, которые разливали по 1,0 см³ в ампулы по 5 см³. Перед замораживанием продукта важно проверить физические критерии контроля: температура полного затвердения, эвтектические температуры, плотность жидкого продукта. После достижения температуры полного замерзания в продукте (-55–60 °С), проводили сушку препаратов при начальной температуре полки -20 °С. На этапе досушивания конечная температура материала составляла +25±2 °С. Общее время сублимационной сушки составило 24 часа (без учета времени этапа замораживания) После сублимационного досушивания проверяли параметры (качественные, количественные) готового лиофилизированного продукта. Важным для сохранения этих параметров является этап закупорки (запайки) ампул под инертным газом, использовался Азот (N₂) особой очистки. Характеристика ФИТЦ-конъюгатов, полученных при введении в высушиваемый материал в качестве вещества-наполнителя 2–3% декстрана Т-70, приведены в таблице 1.

Анализ результатов качества ФИТЦ-конъюгатов позволяет сделать вывод о высоком качестве биопрепаратов, приготовленных при сублимационной сушке материала в разработанном температурном режиме с использованием в качестве вещества-наполнителя 2–3% декстрана Т-70.

Конъюгат на основе хроматографически чистых антирабических IgG, при оптимальном молярном соотношении, обладал антигенсвязывающей активностью и выявлял антигены вируса бешенства в мазках-отпечатках мышей, зараженных стандартным вирусом бешенства штамм "CVS" в титре 1:128-1:256.

Так же установлено, что конъюгат на основе хроматографически чистого антихламидийного IgG при оптимальном молярном соотношении, обладал антигенсвязывающей активностью и выявлял антиген в мазках-отпечатках желточных мешков эмбрионов кур, инфицированных хламидиями штамма "Улетово-96-ВНИТИБП" в разведении 1:80-1:320.

Результаты изучения специфичности и стабильности ФИТЦ-конъюгатов после высушивания и дальнейшего

хранения при 2–8 °С в течение двух лет показали, что препараты не снижали свою активность, не образовывали конгломераты и не диссоциировали на свободный краситель флуорохрома и глобулиновую фракцию.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований нами оптимизирована технология приготовления лиофилизированных ФИТЦ-конъюгатов антирабических и антихламидийных антител для диагностических тест-систем с сохранением специфической активности и стабильности препаратов после высушивания и последующего хранения в течение двух лет.

Литература

1. Клюкина В.И. Эффективность применения адъюванта и иммуномодулирующих препаратов при иммунизации животных вирусом бешенства / Клюкина В.И., Федоров Ю.Н., Богомолова О.А., Анисина О.В., Романенко М.Н., Святенко М.С., Устинова В.А. // Ветеринария и кормление. 2019 - №5, - С.16-18. DOI CrossRef: 10.30917/ATT -VK-1814-9588- 2019-5-5
2. Самуйленко А.Я., Гринь С.А., Еремец В. И., Клюкина В.И., Матвеева И.Н. и др. Под редакцией Самуйленко А.Я. // Инфекционная патология животных. Руководство в 7 томах. Том II. Бешенство. Москва, 2012. - 153 с. ISBN 978-5-89904-015-3.
3. Нежута А.А., Токарик Э.Ф., Самуйленко А.Я., Безгин В.М., Сербис Е.С. // Теоретические и практические основы технологии сублимационного высушивания биопрепаратов. Курск: КГСХА. -2002.
4. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals // OIE Terrestrial Manual, 2008. - Part 2, section 1, chapter 2.1.13. - P. 304-323.
5. ГОСТ СССР 26075-84. Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики бешенства. - М.: Государственный комитет СССР по стандартам, 1984. - 12 с.
6. Каплан, М.М. Методы лабораторных исследований по бешенству / М.М.Каплан // ВОЗ. - Женева, 1995. - С. 13-26.

References

1. Klyukina V.I. Effektivnost' primeneniya ad'yuvanta i immunomoduliruyushchih preparatov pri immunizacii zhivotnyh virusom beshenstva / Klyukina V.I., Fedorov Yu.N., Bogomolova O.A., Anisina O.V., Romanenko M.N., Svyatenko M.S., Ustinova V.A. // Veterinariya i kormlenie. 2019 - №5, - S.16-18. DOI CrossRef: 10.30917/ATT -VK-1814-9588- 2019-5-5
2. Samujlenko A.Ya., Grin' S.A., Eremec V. I., Klyukina V.I., Matveeva I.N. i dr. Pod redakciej Samujlenko A.Ya. // Infekcionnaya patologiya zhivotnyh. Rukovodstvo v 7 tomah. Tom II. Beshenstvo. Moskva, 2012. - 153 s. ISBN 978-5-89904-015-3.
3. Nezhuta A.A., Tokarik E.F., Samujlenko A.Ya., Bezgin V.M., Serbis E.S. // Teoreticheskie i prakticheskie osnovy tekhnologii sblimacionnogo vysushivaniya biopreparatov. Kursk: KGSXA. -2002.
4. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals // OIE Terrestrial Manual, 2008. - Part 2, section 1, chapter 2.1.13. - P. 304-323.
5. GOST SSSR 26075-84. Zhivotnye sel'skokozyajstvennyye. Metody laboratornoj diagnostiki beshenstva. - M.: Gosudarstvennyj komitet SSSR postandartam, 1984. - 12 s.

Пресс-релиз/ Press-release

На тамбовской птицефабрике – нарушения ветеринарного законодательства

Управлением Россельхознадзора по Рязанской и Тамбовской областям в рамках исполнения поручения заместителя председателя Правительства РФ Абрамченко В.В. в ноябре 2020 года была проведена внеплановая выездная проверка в отношении ОАО "Токаревская птицефабрика", расположенного в р.п. Токаревка Токаревского района Тамбовской области.

В ходе осмотра цеха переработки установлено наличие участков коррозии на внутренней стороне вытяжки над линией субпродуктов, а также хранение биологических отходов в таре, предназначенной для субпродуктов.

При производстве осмотра площадок откорма птицы также были выявлены нарушения:

- не исключен беспрепятственный доступ диких и домашних животных на территорию площадки;
- скопление талых вод;
- использование одних и тех же дорог для подвоза цыплят, кормов и вывоза помета и падежа птицы.

Птицеводческое предприятие допустило нарушения требований технического регламента ТР ТС 021/2011 "О безопасности пищевой продукции" и "Ветеринарных правил содержания птиц на птицеводческих предприятиях закрытого типа (птицефабриках)".

За выявленные нарушения в январе 2021 года юридическое и должностное лицо привлечены ведомством к административной ответственности по ч. 1 ст. 14.43 КоАП РФ и ч. 1 ст. 10.6 КоАП РФ с назначением штрафов на сумму 115 тыс. рублей и 3 тыс. рублей соответственно.

По материалам Россельхознадзора

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-6
УДК 57.036

Технология изготовления низкомолекулярного хитозана на основе ферментативного гидролиза



Ковалева Э.И.
Kovaleva E.I.

Ковалева Э.И., м.н.с. отдела получения биологически активных веществ

Албулов А.И., д.б.н., профессор, зав. отделом получения биологически активных веществ

Фролова М.А., д.б.н., в.н.с. отдела получения биологически активных веществ

Варламов В.П., д.х.н., зав. лаб. отдела получения биологически активных веществ

Гринь А.В., к.б.н., с.н.с. отдела получения биологически активных веществ

ФГБНУ ВНИТИБП РАН, М.О, Щелковский район, п. Биокombината, д.17, ВНИТИБП, vnitibp@mail.ru

Ключевые слова: низкомолекулярный хитозан, ферментативный гидролиз, средневязкостная молекулярная масса.

Резюме. Хитозан – природный высокомолекулярный полимер D-глюкозамина и N-ацетил – D - глюкозамина, соединенных 1,4 - β - гликозидной связью с молекулярной массой 1000 кДа (и выше), практическое использование которого затруднено из-за высокой вязкости его водных растворов даже при низкой концентрации, а также недостаточной растворимости при нейтральных значениях pH и, как следствие, низкой биологической активности. Для снижения вязкости, улучшения растворимости и усиления биологической активности высокомолекулярный хитозан подвергают деполимеризации. Для хитозана, как и для других полисахаридов, свойственна реакция гидролиза, которая обусловлена наличием в молекуле гликозидных связей, обладающих лабильностью к гидролизующим агентам, например, водным растворам кислот, щелочей, а также к воздействию некоторых гидролаз. При гидролизе происходит разрыв гликозидных связей и, как следствие, снижение молекулярной массы хитозана. Однако эти процессы сопровождаются образованием значительных количеств токсичных продуктов и требуют весьма затратного обезвреживания отходов перед их сбросом в окружающую среду. Хитин и хитозан являются природными биополимерами и их синтез, модификация и деградация связана с ферментативными превращениями. Именно биоразлагаемость до обычных для организма веществ является одним из основных среди многочисленных достоинств хитозана. Очевид-

Manufacturing technology of low-molecular-weight chitosan based on enzymatic hydrolysis

Kovaleva E.I., junior researcher department of obtaining biologically active substances

Albulov A.I., Doctor of Biological Sciences, Professor, Head. department for production of biologically active substances

Frolova M.A., Doctor of Biological Sciences, Leading Scientist from the Department of Production of Biologically Active Substances

Varlamov V.P., Doctor of Chemical Sciences, Head lab. department of obtaining biologically active substances

Grin A.V., Ph.D. senior researcher department of obtaining biologically active substance

FGBNU VINITIBP RAS M.O., Shchelkovsky district, Biokombinata, 17, VINITIBP, vnitibp@mail.ru

Key words: low molecular weight chitosan, enzymatic hydrolysis, viscosity average molecular weight.

Abstract. Chitosan is natural high molecular weight polymer of D-glucosamine and N-acetyl - D - glucosamine connected by 1,4 - β - glycoside bond with a molecular mass of 1000 kDa (and above), practical use is difficult because of high viscosity of its aqueous solutions even at low concentrations, and lack of solubility at neutral pH and, consequently, low biological activity. To reduce viscosity, improve the solubility and enhance biological activity of high molecular weight chitosan subjected to depolymerization. Chitosan, like other polysaccharides, is characterized by a hydrolysis reaction, which is due to the presence of glycoside bonds in the molecule that are able to hydrolyzing agents, for example, aqueous solutions of acids, alkalis, as well as to the effect of some hydrolases. During hydrolysis, glycoside bonds are broken and, as a result, the molecular weight of chitosan decreases. However, these processes are accompanied by the formation of significant amounts of toxic products and require very costly disposal of waste before it is discharged into the environment. Chitin and chitosan are natural biopolymers and their synthesis, modification and degradation are associated with enzymatic transformations. It is the biodegradability to the usual substances for the body that is one of the main advantages of chitosan. It is obvious that the most appropriate method is the enzymatic hydrolysis of chitosan. As enzyme preparations for the degradation of chitin and chitosan, enzyme complexes of various origins are used. These can be enzymes from crab or krill hepatopancreas complexes, as well as pancreatin from the pancreas of cattle. But more often for this purpose, enzymes complexes with chitinolytic activity of microbiological origin are used. In this study, low-molecular-weight chitosan was obtained by enzymatic hydrolysis using the extracellular chitinolytic complex of *Streptomyces kurssanovii*. The resulting chitosan had a medium-viscosity molecular weight of 25-40 kDa. Carrying out two stages of fractionation (stepwise acidification and separation on membranes) made it possible to obtain chitosan fractions with a narrow distribution by molecular weight.

Для цитирования / For citation

Технология изготовления низкомолекулярного хитозана на основе ферментативного гидролиза/Ковалева Э.И. [и др.] / Ветеринария и кормление. - 2021.-№1.-С.20-22.
Manufacturing technology of low-molecular-weight chitosan based on enzymatic hydrolysis/Kovaleva E.I [and others] // Veterinaria i kormlenie. – 2021. – #1. – P. 20-22.

но, что самым подходящим способом является ферментативный гидролиз хитозана. В качестве ферментных препаратов для деградации хитина и хитозана применяют комплексы ферментов различного происхождения. Это могут быть ферментные комплексы гепатопанкреаса краба или крылья, а также панкреатин из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Но чаще для этой цели применяют ферментные комплексы с хитинолитической активностью микробиологического происхождения. В данной работе низкомолекулярный хитозан получали ферментативным гидролизом с использованием внеклеточного хитинолитического комплекса *Streptomyces kurssanovii*. Полученный хитозан имел средневязкостную молекулярную массу 25–40 кДа. Проведение двух этапов фракционирования (ступенчатого подкисления и разделения на мембранах) позволило получить фракции хитозана с узким распределением по молекулярным массам.

Хитозан, как природный полисахарид, имеет достаточно широкое молекулярно-массовое распределение. Входящие в его состав фракции обладают различными физико-химическими характеристиками. В связи с этим нативный хитозан может проявлять в той или иной степени сорбционные, пленкообразующие, радиопротекторные, иммуномодулирующие и другие свойства. В то же время применение хитозана в медицине, ветеринарии, пищевой биотехнологии требует от него строго определенных физико-химических характеристик и специфического действия, что в значительной степени определяется молекулярной массой и степенью чистоты конечного продукта.

Использование высокомолекулярного хитозана часто сужено вследствие ограниченной растворимости в биологических жидкостях (рН 6,8–7,8), которая обусловлена, главным образом, наличием в полимерных молекулах жидких кристаллических участков, образованных внутри – и межмолекулярными водородными связями. Хитозан хорошо растворим в кислых водных растворах при рН 4,5–6,5 благодаря протонированию аминогруппы.

Для придания лучшей растворимости в более широкой области значений рН хитозан модифицируют, например, вводят гидрофильные остатки, ковалентно присоединяя их к реакционноспособным аминогруппам. Карбоксиметилированные, ацетилированные производные и четвертичные соли хитозана хорошо растворимы. Но чтобы достиг эффекта, необходимо получить степень замещения не менее 50%. В результате такой модификации физико-химические характеристики производных и их биологическая активность будут заметно отличаться от присущих первоначальной структуре хитозана. Улучшение растворимости может приводить к ухудшению биодegradируемости, увеличению токсичности и т.д. [1].

Одним из перспективных направлений использования хитозана является применение его низкомолекулярных водорастворимых производных. Продукты деполимеризации хитозана, более низкомолекулярные производные, а также хитоолигомеры демонстрируют большую физиологическую активность, чем хитозан, и поэтому имеют большие перспективы применения [2–4]. Деполимеризация хитозана может проводиться как химическим способом, так и механическим и ферментативным.

Последний способ является наиболее химически чистым, экологически безопасным и перспективным. Ферментативный гидролиз расщепляет 0-гликозидные связи между соседними звеньями, что позволяет сохранить активную структуру и степень дезацетилирования. Применение ферментов позволяет до минимума сократить использование различных реагентов, избежать химической модификации полисахарида, плавно регулировать молекулярную массу получаемых полимеров от исходной до 8–10 кДа. Стандар-

Таблица - Средневязкостная молекулярная масса фракций низкомолекулярного хитозана

Table - Average viscosity molecular weight of low molecular weight chitosan fractions

Размер пор мембраны кДа	Молекулярная масса хитозана, кДа	Содержание фракции в гидролизованном хитозане, %
<5	-	0,3
5-10	7,8	27,9
10-30	17,4	37,2
30-50	30,8	32,3
>50	42,8	2,3

тная схема ферментативного гидролиза включает в себя несколько стадий: растворение хитозана, создание оптимальных условий для проведения гидролиза, ферментативный гидролиз, фильтрация от механических и нерастворимых примесей, переосаждение, фильтрация с последующей промывной, концентрацией, сушкой и фасовкой.

Гидролиз хитозана может быть осуществлен многими ферментными препаратами микробного происхождения, в том числе за счет неспецифического действия на этот полисахарид. Особый интерес представляют ферменты неспецифического по отношению к хитозану действия, ряд из которых более эффективно деполимеризуют хитозан по сравнению с хитиназами (пепсин, папаин, бромелайн, фицин) [5]. Известна также способность хитиназ микробного происхождения и ряда гидролаз неспецифического действия для получения низкомолекулярного хитозана [6–8]. Экстракт из гепатопанкреаса краба имеет мощную гидролитическую ферментную систему, которая также может оказаться действенной при получении низкомолекулярного хитозана и его производных [9–10]. В ряде работ описано модифицирование структуры и уменьшение молекулярного веса хитозана посредством γ -облучения [11–14] и высокоэнергетических ионных пучков [15–17]. При использовании данных методов величина среднего молекулярного веса исходного биополимера уменьшается только в 2–3 раза и может сопровождаться увеличением полидисперсности. Однако действие специфических ферментов-хитозаназ как деполимеризатора наиболее эффективно.

Низкомолекулярный водорастворимый хитозан обладает высокой иммуностимулирующей активностью и обеспечивает системность и продолжительность защитного действия против грибковых и вирусных заболеваний растений и животных. Ветеринарно-биологический аспект применения хитозана представляется весьма перспективным. Хитозановые препараты позволяют ускорить и удешевить курс лечения, исключить или значительно уменьшить использование антибиотиков и сульфениламидов, обладающих кумулятивным эффектом.

Низкомолекулярный хитозан выгодно отличается от нативного достаточно узким молекулярно-массовым распределением, что придает ему определенные специфические четко выраженные свойства. Например, фракции с молекулярной массой 80–150 кДа обладают высокой адгезивной и пленкообразующей активностью. Хитозан с молекулярной массой 30–50 кДа оказывает стимулирующее действие на микрофлору. Хитозан с молекулярной массой 15–25 кДа легко проникает в кровь, с чем связана его иммуномодулирующая и адаптогенная активность.

Материалы и методы исследований

Низкомолекулярный хитозан получали ферментативным гидролизом с использованием внеклеточного хитинолитического комплекса, продуктивного микроорганизмом *Streptomyces kurssanovii* в 0,2 М ацетатном буфере при рН 4,9–5,4 и температуре 45 °С. Гидролиз останавливали добавлением 10%-ной гидроокиси натрия до рН 9,5–11,0. Промывку переосажденного хитозана проводили деиони-

зированной водой до pH 8,5. Отмытый хитозан с целью фракционирования ступенчато растворяли в соляной, уксусной и янтарной кислотах с различными pH. Определение средневязкостной молекулярной массы хитозана проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), используя в качестве растворителя 0,2 М ацетат натрия и 0,3 М уксусную кислоту (pH буфера 4,6).

Результаты исследований и их обсуждение

Несмотря на высокие биофункциональные свойства хитозана его применение в некоторых сферах ограничено из-за высокой молекулярной массы и вязкости, и, как следствие, низкой абсорбции *in vivo*.

Особый интерес для перспективных применений хитозана представляют его низкомолекулярные формы. В настоящее время в промышленных масштабах такие низкомолекулярные соединения получают методами химического гидролиза. Однако эти процессы сопровождаются образованием значительных количеств токсичных побочных продуктов, содержащих белки, щелочи, кислоты и соли и требуют весьма затратного обезвреживания отходов перед их сбросом в окружающую среду. Кроме того, для данного метода характерны большие временные затраты, а получающиеся при этом низкомолекулярные продукты обладают высокой степенью полидисперсности.

Хитин и хитозан являются природными биополимерами и их синтез, модификация и деградация связаны с ферментативными превращениями. Именно биоразлагаемость до обычных для организма веществ является одним из основных среди многочисленных достоинств хитозана. Очевидно, что самыми подходящими из ферментов для осуществления процесса ферментативного гидролиза являются хитозаназы, которые приводят к получению олигосахаридов со степенью полимеризации 2–5. Однако в живой природе хитозан деградирует и с помощью неспецифических ферментов.

Низкомолекулярный хитозан изготавливали ферментативным гидролизом с использованием внеклеточного хитинолитического комплекса, продуцируемого микроорганизмом *Streptomyces kurssanovii*. Полученный хитозан имел средневязкостную молекулярную массу 25–40 кДа.

Предварительное фракционирование проводили, используя ступенчатую фильтрацию с подкислением, pH – метрией и промывкой на каждом этапе. Этот технологический прием позволяет отсечь фракции ди- и моносахаридов, а также выделить высокомолекулярные полимеры и хитозаны с низкой степенью деацетилирования. Дальнейшее фракционирование проводили на мембранах производства "Владипор" с размером пор, соответствующих 5 кДа, 10 кДа, 30 кДа и 50 кДа. Молекулярная масса отдельных фракций, определенная методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), имела узкое распределение в определенной области.

Результаты определения средневязкостной молекулярной массы фракций низкомолекулярного хитозана представлены в таблице. Как видно из приведенных в таблице данных, предварительное фракционирование практически полностью удаляет из низкомолекулярного хитозана фракцию моно- и дисахаридов, а также высокомолекулярные негидролизованые участки полимера. Применение мембраны с размером пор 50 кДа является нецелесообразным, так как существенного разделения на этом этапе не происходит. Использование мембраны на 5 кДа позволяет получить практически обессоленный продукт. Таким образом, ферментативный гидролиз с использованием внеклеточного хитинолитического комплекса, продуцированного микроорганизмом *Streptomyces kurssanovii*, позволил получить низкомолекулярный хитозан со средневязкостной молекулярной массой 25–40 кДа с узким распределением молекулярных масс отдельных фракций низкомолекулярного хитозана.

Литература

- Ильина А.В., Варламов В.П. Галактозилированные производные низкомолекулярного хитозана: получение, свойства // Прикладная биохимия и микробиология. - 2007. - Т.43, №2. - С. 82-87.
 - Vishu Kumar A.B./ Tharanathan R.N. A comparative study on depolymerization of chitosan by proteolytic enzymes // Carbohydrate Polymers. - 2004. - Vol. 58, №3. - P. 275-283.
 - Vishu Kumar A.B., Varadaraq, M.C., Gowda L.R. Tharanathan R.N. Low molecular Weight chitosans - Preparation with the aid of pronase, characterization and their bactericidal activity towards *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* // Biochimica et Biophysica Acta. - 2007. - Vol. 1770. - P. 495-505.
 - Shih - Bin Lin, Yi-Chun Lin, Hui-Huang Chen. Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulose, lysozyme and chitinase: Characterisation and antibacterial activity // Food Chemistry. - 2009. - Vol.116. - P. 47-53.
 - Фролов В. Г., Душкова З. Г. Исследование хитозанолизитической активности папаина. 8-ая Международная конференция "Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана". 12-17 июня 2006 г. - Казань. - С. 315.
 - Ceng C. Y., Li Y. K. // Biotexnol. Appe. Biohem. - 200. - V. 32, №3. - P. 197-203.
 - Kumar A.B., Gowda L.R., Tharanathan R.N. // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271. № 4. P. 713-723.
 - Kittur F.S., Vishu Kumar A.B., Varadaraj M.C., Tharanathan R.N. // Carbohydr. Res. 2005. V. 340. № 6. P. 1239-1245.
 - Новиков В. Ю., Мухин В. А., Рысаков К. С. Свойства хитинолитических ферментов гепатопанкреаса камчатского краба *paralithodes camtschaticus* // Прикл. Биохимия и микробиология. - 2007. - Т. 43, №2. - С. 178-183.
 - Рысаков К. С., Новиков В. Ю., Мухин В. А., Серафимчик Е. М. Гликолитическая активность ферментного препарата из гепатопанкреаса камчатского краба *paralithodes camtschaticus* // Прикл. Биохимия и микробиология. - 2008. - Т. 44, №3. - С. 281-286.
 - Rashid T.U., Rahman M.M., Kabir S., Shamsuddin S.M., Khan M.A. // Polym. Int. 2012. V. 61. № 8. P. 1302.
 - Gryczka U., Dondi D., Chmielewski A.G., Migdal W., Buttafava A., Faucitano A. // Radiat. Phys. Chem. 2009. V. 78. № 7-8. P. 543.
 - Pasanphan W., Rimdusit P., Choofong S., Piroonpan T., Nilsuwankosit S. // Radiat. Phys. Chem. 2010. V. 79. №10. P. 1095.
 - Chmielewski A.G. // Radiat. Phys. Chem. 2010. V. 79. № 3. P. 272.
 - Saranwong N., Inthanon K., Wongkham W., Wanichapichart P., Suwannakachorn D., Yu L.D. // Nucl. Instrum. Meth. B. 2012. V. 272. 386.
 - Wanichapichart P., Taweepreeda W., Choomgan P., Yu L.D. // Radiat. Phys. Chem. 2010. V. 79. № 3. P. 214.
 - Inthanon K., Saranwong N., Wongkham W., Wanichapichart P., Prakrajang K., Suwannakachorn D., Yu L.D. // Surf. Coat. Tech. 2012. V. 229. P. 112.
- #### References
- Ilyina A.V., Varlamov V.P. Galactosylated derivatives of low molecular weight chitosan: preparation, properties // Applied biochemistry and microbiology. - 2007. - T.43, No. 2. - S. 82-87.
 - Vishu Kumar A.B./ Tharanathan R.N. A comparative study on depolymerization of chitosan by proteolytic enzymes // Carbohydrate Polymers. - 2004. - Vol. 58, №3. - P. 275-283.
 - Vishu Kumar A.B., Varadaraq, M.C., Gowda L.R. Tharanathan R.N. Low molecular Weight chitosans - Preparation with the aid of pronase, characterization and their bactericidal activity towards *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* // Biochimica et Biophysica Acta. - 2007. - Vol. 1770. - P. 495-505.
 - Shih - Bin Lin, Yi-Chun Lin, Hui-Huang Chen. Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulose, lysozyme and chitinase: Characterisation and antibacterial activity // Food Chemistry. - 2009. - Vol.116. - P. 47-53.
 - Frolov V.G., Dushkova Z.G. Study of the chitosanolytic activity of papain. 8th International Conference "Modern perspectives in the study of chitin and chitosan." June 12-17, 2006 - Kazan. - S. 315.
 - Ceng C. Y., Li Y. K. // Biotexnol. Appe. Biohem. - 200. - V. 32, no. 3. - P. 197- 203.
 - Kumar A.B., Gowda L.R., Tharanathan R.N. // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271. No. 4. P. 713-723.
 - Kittur F.S., Vishu Kumar A.B., Varadaraj M.C., Tharanathan R.N. // Carbohydr. Res. 2005. V. 340. No. 6. P. 1239-1245.
 - Novikov V. Yu., Mukhin V.A., Rysakov K.S. Properties of chitinolytic enzymes of the hepatopancreas of the Kamchatka crab *paralithodes camtschaticus* // Prikl. Biochemistry and Microbiology. - 2007. - T. 43, No. 2. - S. 178-183.
 - Rysakov K.S., Novikov V. Yu., Mukhin V.A., Serafimchik E.M. Glycolytic activity of an enzyme preparation from the hepatopancreas of the king crab *paralithodes camtschaticus* // Appl. Biochemistry and Microbiology. - 2008. - T. 44, No. 3. - S. 281-286.
 - Rashid T.U., Rahman M.M., Kabir S., Shamsuddin S.M., Khan M.A. // Polym. Int. 2012. V. 61. № 8. P. 1302.
 - Gryczka U., Dondi D., Chmielewski A.G., Migdal W., Buttafava A., Faucitano A. // Radiat. Phys. Chem. 2009. V. 78. № 7-8. P. 543.
 - Pasanphan W., Rimdusit P., Choofong S., Piroonpan T., Nilsuwankosit S. // Radiat. Phys. Chem. 2010. V. 79. №10. P. 1095.
 - Chmielewski A.G. // Radiat. Phys. Chem. 2010. V. 79. № 3. P. 272.
 - Saranwong N., Inthanon K., Wongkham W., Wanichapichart P., Suwannakachorn D., Yu L.D. // Nucl. Instrum. Meth. B. 2012. V. 272. 386.
 - Wanichapichart P., Taweepreeda W., Choomgan P., Yu L.D. // Radiat. Phys. Chem. 2010. V. 79. № 3. P. 214.
 - Inthanon K., Saranwong N., Wongkham W., Wanichapichart P., Prakrajang K., Suwannakachorn D., Yu L.D. // Surf. Coat. Tech. 2012. V. 229. P. 112.

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-7

УДК 597.58:57.017.645:639.3.04+57.044

Влияние минерализации воды и растворенных главных катионов на выживаемость, размеры и сейсмочувствительные признаки молоди речного окуня (*Perca fluviatilis* L.)



Котегов Б.Г.
Kotegov B.G.

Котегов Б.Г., к. б. н., зав. лаб. санитарии, ВНИТИ биологической промышленности, пос. Биокомбината, Московская обл., rutilus@yandex.ru

Ключевые слова: речной окунь, ранний онтогенез, выживаемость, размеры, сейсмочувствительные каналы, кальций, магний, натрий.

Резюме. В течение двух месяцев проводилось выращивание молоди речного окуня *Perca fluviatilis* L. в аквариумном эксперименте. Оплодотворенная икра этого вида рыб взята с нерестилища небольшого и незагрязненного природного водоема и помещена в лабораторные условия для последующей инкубации в различных гидрохимических условиях. Созданы экспериментальные группы окуня в двух повторностях, развивавшиеся в контрольных условиях с минерализацией воды 160 мг/л, в условиях разбавленной до 100 мг/л пресной воды и в условиях с водой, минерализация которой была повышена относительно контроля до 400 мг/л тремя разными способами – добавлением хлоридных солей кальция, магния или натрия. Температурные, световые и кислородные условия выращивания мальков во всех группах были одинаковыми. Выкармливание личинок окуня производили сначала мелким природным зоопланктоном, затем искусственно выращенными науплиями артемий; мальков – олигохетами сем. Tubificidae из вермикультуры. Средние показатели выживаемости поздних личинок и ранних мальков речного окуня во второй половине эксперимента оказались максимальными в группах, развивавшихся в гидрохимических условиях с добавлением Na^+ и Mg^{2+} (73% и 67%), минимальными – в группах, развивавшихся в наименее минерализованной воде (46%). По окончании эксперимента выжившие мальки из групп, подверженных влиянию повышенного содержания хлорида натрия, имели статистически значимо ($p < 0,05$) большие линейные размеры, чем мальки из контрольных групп и групп, развивавшихся в наименее минерализованной воде. Мальки окуня из групп, подверженных влиянию повышенных концентраций Ca^{2+} , характеризовались статистически значимо ($p < 0,05$) меньшим числом отверстий в подглазничных и нижнечелюстных сейсмо-

Influence of water mineralization and dissolved main cations on survival, size and seismosensory characteristics of perch fry (*Perca fluviatilis* L.)

Kotegov B.G., All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry, Biokombinat, Moscow region, rutilus@yandex.ru

Keywords: perch, early ontogenesis, survival, size, seismosensory canals, calcium, magnesium, sodium.

Abstract. Within two months the growing of the perch fry *Perca fluviatilis* L. carried out in the aquarium experiment. Fertilized eggs of this fish species were taken from the spawning ground of a small and unpolluted natural reservoir and placed in laboratory conditions for subsequent incubation under different hydrochemical conditions. Experimental groups of perch were created in two replicates that developed under control conditions with a water salinity of 160 mg/l, under conditions of fresh water diluted to 100 mg/l, and under conditions with water whose salinity was increased relative to the control to 400 mg/l in three different ways - by adding calcium, magnesium or sodium chloride salts. Temperature, light, and oxygen conditions for growing fry in all groups were the same. The perch larvae were fed first with small natural zooplankton, then with artificially grown nauplia of *Artemia*; perch fry - with tubificid from vermiculture.

The average survival rates of late larvae and early fry of perch in the second half of the experiment were maximal in the groups that developed under hydrochemical conditions with the addition of Na^+ and Mg^{2+} (73% and 67%), and minimal in the groups that developed in the least mineralized water (46%). At the end of the experiment, the surviving fry from the groups affected by the increased content of sodium chloride had statistically significantly ($p < 0.05$) larger linear sizes than the fry from the control groups and groups that developed in the least mineralized water. Perch fry from the groups affected by increased concentrations of Ca^{2+} were characterized by a statistically significant ($p < 0.05$) smaller number of pores in the infraorbital and mandibular seismosensory canals of the head, compared with fry formed in conditions of least water mineralization and the minimal content of this main cation in it. Thus, salinity values and features of the ionic composition of fresh water can significantly affect the development of perch fry, which should be taken into account when breeding it in aquaculture.

сенсорных каналах головы, по сравнению с мальками, сформированными в условиях наименьшей минерализации воды и минимального содержания в ней этого главного катиона. Таким образом, величины минерализации и особенности ионного состава пресной воды могут влиять на развитие молоди речного окуня, что следует учитывать при его разведении в условиях аквакультуры.

Введение

Речной окунь *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758 – один из наиболее распространенных, морфологически изменчивых и экологически пластичных видов пресноводных рыб, оби-

Для цитирования / For citation

Котегов, Б.Г. Влияние минерализации воды и растворенных главных катионов на выживаемость, размеры и сейсмочувствительные признаки молоди речного окуня (*Perca fluviatilis* L.) / Б.Г. Котегов // Ветеринария и кормление. - 2021. - № 1- С. 23-26.

Kotegov, B.G. Influence of water mineralization and dissolved main cations on survival, size and seismosensory characteristics of perch fry (*Perca fluviatilis* L.) / B.G. Kotegov // Veterinaria i kormlenie. - 2021. - No.1.- P. 23-26.

тающих в умеренной зоне Евразии [1-4]. В ряде европейских стран этот вид введен в аквакультуру на базе различных технологий прудового и индустриального выращивания его товарных особей [5]. Проблемы получения большого количества жизнестойкой молоди речного окуня в искусственных условиях в основном связаны с уязвимостью эмбриональных стадий его развития к воздействию некоторых инфекций и с особенностями его пищевого поведения на личиночных стадиях онтогенеза. Внутривидовая пищевая конкуренция в условиях выращивания при повышенной плотности посадки и ограниченности кормовых ресурсов, как правило, сопровождается агрессивным подавлением мелких особей окуня крупными вплоть до проявления каннибализма, что приводит к уменьшению количества и увеличению размерно-весовой гетерогенности подрастающей молоди [6]. Ранее экспериментально было показано [7], что важную роль в поиске пищи у личинок и мальков этого вида рыб играет и сейсмочувствительная система головы, поэтому при питании они отдают предпочтение живым и подвижным кормовым объектам. Количественное развитие сейсмочувствительных органов, а именно краниальных каналов боковой линии у речного окуня может зависеть от гидрохимических условий протекания его раннего онтогенеза, в частности от содержания в воде ионов магния [8]. Есть данные [9], что увеличение минерализации пресной воды до 0,6–1,2 ‰ может также способствовать повышению выживаемости личинок окуня в экспериментальных условиях, однако неизвестно, связаны ли показатели выживаемости и роста его молоди со степенью развития сенсорных органов, участвующих в поиске пищи.

Цель настоящей работы – изучить особенности влияния различных гидрохимических условий выращивания (в части общей минерализации пресной воды и содержания в ней Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+) на выживаемость, линейные размеры и количественное развитие краниальных каналов боковой линии у мальков речного окуня.

Материал и методы исследований

Отобранная с естественного нерестилища икра окуня в емкостях с природной водой транспортирована в лабораторию для последующей инкубации. В течение суток развивающаяся икра прошла акклимацию в аэрируемых кюве-

тах с водой контрольного химического состава. В качестве контроля использована бутилированная питьевая вода высшей категории с общей минерализацией 160–170 мг/л, содержанием Ca^{2+} – 42,1–50,1 мг/л, Mg^{2+} – 6,7–12,2 мг/л, Na^+ – около 30 мг/л. После акклимации "ленты" икры были фрагментированы и размещены случайным образом в десяти пластиковых квадратных 32-литровых контейнерах-аквариумах с начальным объемом воды – 4 л. Исходное количество икринок речного окуня в каждом аквариуме – в среднем 5–7 тысяч. В два аквариума налита вода контрольного гидрохимического состава, соответственно, в них созданы экспериментальные группы Con160 (1) и Con160 (2). Еще в два аквариума налита контрольная вода, разбавленная дистиллятом до значения минерализации 100 мг/л с уменьшением концентраций Ca^{2+} до 30,1 мг/л, Mg^{2+} – до 4,9 мг/л, Na^+ – до 19,0 мг/л (экспериментальные группы Dis100 (1) и Dis100 (2)). В остальные шесть аквариумов налита вода с общей минерализацией, повышенной до значения 400 мг/л за счет добавления в контрольную воду хлоридных солей кальция, магния или натрия в двух повторностях. Таким образом, создано еще шесть экспериментальных групп: Ca400 (1) и Ca400 (2) с увеличением содержания Ca^{2+} в воде до 130 мг/л, Mg400 (1) и Mg400 (2) (Mg^{2+} более 50 мг/л), Na400 (1) и Na400 (2) (Na^+ более 170 мг/л).

Далее через сутки в каждый из аквариумов добавляли еще по 2 л воды с заданным гидрохимическим составом, доведя в конечном итоге через 4 недели эксперимента объемы воды в них до максимальных значений в 30 л. В последующий период (5–8 недели эксперимента) объемы воды в аквариумах более не изменяли. Содержание растворенного кислорода в воде аквариумов поддерживали в пределах 9–11 мг/л за счет принудительной аэрации, температура воды изменялась от 20–22 °С днем до 16–18 °С ночью, основное освещение было естественным с затенением и нормальным суточным ритмом. Аквариумы каждый день очищали от органических остатков и удаляли из воды мертвых особей рыб. Начиная с 5-ой недели эксперимента, проводили подсчет погибших поздних личинок и ранних мальков окуня из разных групп.

Живой пелагический корм стали добавлять в аквариумы сразу после начала выхода ранних личинок окуня из яйцевых оболочек: сначала в виде мелкого природного зоопланктона, отловленного в том же водоеме, где ранее была собрана икра. На 4-е сутки после начала кормления личинок окуня вместе с мелким природным зоопланктоном стали добавлять более крупных по размеру науплий артемий. Спустя 3 недели после появления первых личинок окуня в живой корм к артемиям стали добавлять олигохеттрубочников (сем. Tubificidae) из вермиккультуры. Олигохетами продолжали кормить мальков окуня 2 раза в день до конца эксперимента.

По окончании эксперимента проведен подсчет оставшихся в живых особей рыб в каждой из десяти групп. Выживаемость молоди окуня в течение последних четырех недель эксперимента оценена по следующей формуле:

$V = [NV / (NV + ND)] \times 100\%$, где NV – число выживших особей, ND – число погибших особей.

У выживших мальков была измерена стандартная длина тела SL с расчетом средних значений и коэффициентов вариации, а также подсчитано число отверстий сейсмочувствительных каналов в некоторых парных покровных костях головы: надглазничных в лобных костях CSO_{fro} , подглазничных в слезных костях CSO_{lac} , предкрышечных в жаберных крышках CPM_{pre} и нижнечелюстных в зубных костях CPM_{den} . Морфологический анализ костей проводился под бинокулярным микроскопом МБС-9 после непродолжительного выдерживания отдельных экземпляров окуня в горячей воде с температурой 60–80 °С, аккуратного освобождения скелета головы от мягких тканей препаративными иглами и высушивания фильтровальной бумагой.

Таблица 1. Показатели выживаемости молоди окуня из разных групп на 5–8 неделях эксперимента
Table 1. Survival rates of perch fry from different groups at 5–8 weeks of the experiment

Группа	N_V , экз.	N_D , экз.	$N_V + N_D$, экз.	V , %	t
Con160(1)	8	9	17	47,1±12,1	1,67
Con160(2)	16	6	22	72,7±9,5	
Con160(1+2)	24	15	39	61,5±7,8	-
Dis100(1)	12	7	19	63,2±11,1	2,08*
Dis100(2)	9	18	27	33,3±9,1	
Dis100(1+2)	21	25	46	45,7±7,3	1,48 -
Ca400(1)	2	0	2	100,0±0,0	4,81*
Ca400(2)	10	11	21	47,6±10,9	
Ca400(1+2)	12	11	23	52,2±10,4	0,72 0,51
Mg400(1)	16	4	20	80,0±8,9	2,06*
Mg400(2)	6	7	13	46,2±13,8	
Mg400(1+2)	22	11	33	66,7±8,2	0,45 1,91
Na400(1)	6	4	10	60,0±15,5	1,16
Na400(2)	13	3	16	81,3±9,8	
Na400(1+2)	19	7	26	73,1±8,7	0,99 2,41*

Примечание. Над чертой указаны значения критерия Стьюдента (t) при сравнении с группой Con160(1+2), под чертой – с группой Dis100 (1+2); * – значения, соответствующие уровню значимости $p < 0,05$.

Сравнительный анализ количественных результатов эксперимента проведен общепринятыми методами математической статистики с расчетом параметрического критерия Стьюдента (t) и рангового критерия Манна-Уитни (U) [10]. Для первичной обработки числовых данных и последующих расчетов использованы пакеты компьютерных программ MS Excel и Statistica.

Результаты исследований и их обсуждение

Вылупление личинок речного окуня из икры во всех аквариумах началось на четвертый день после начала эксперимента и продолжалось в течение пяти суток. В конечном итоге в каждом из аквариумов появилось по несколько сотен подвижных ранних личинок, находящихся на этапе смешанного питания. На следующий этап облигатного экзогенного питания после наполнения плавательного пузыря, полного рассасывания желточного мешка и удлинения челюстей перешло в течение недели в среднем 1–2 десятка личинок окуня из каждой экспериментальной группы, за исключением Ca400(1), где осталось только две особи (табл. 1). Две "волны" массовой гибели личинок на критических этапах вылупления и перехода на экзогенное питание весьма характерны для этого вида рыб [11]. Анализируя данные табл. 1, можно предположить, что повышение минерализации воды в 2,5 раза, особенно за счет добавления хлорида кальция, оказало определенное негативное влияние на выживаемость ранних личинок окуня в первые две недели эксперимента, однако эта тенденция могла быть вызвана и другими, не регулируемые в эксперименте факторами.

В течение последующих двух недель у оставшихся в живых личинок окуня наблюдался активный линейный рост, гетерогенность которого была наиболее выражена в экспериментальных группах, развивавшихся в гидрохими-

ческих условиях с добавлением солей натрия и магния. В этих группах самые крупные особи уже на четвертой неделе эксперимента достигали размеров SL 18–20 мм, характерных для первого малькового этапа [7], и в периоды кормления начинали демонстрировать доминантное поведение, проявляя агрессию в отношении наименьших по размеру особей. Как следствие, последние находились в угнетенном состоянии, некоторые из них поднимались к поверхности воды, утрачивали пищевую активность и в конечном итоге погибали. Реализованных актов каннибализма в экспериментальных группах не зафиксировано.

В то же время средние показатели выживаемости у поздних личинок и мальков в объединенных экспериментальных группах Na400(1+2) и Mg400(1+2) в последние четыре недели эксперимента оказались несколько выше, чем в объединенной контрольной группе Con160(1+2), и существенно выше, чем в объединенной группе Dis100(1+2), где раннее развитие окуня происходило в условиях наименее минерализованной пресной воды (табл. 1). При этом группа Na400(1+2) статистически значимо отличалась по выживаемости от группы Dis100(1+2). Внутри некоторых парных повторностей между группами молоди окуня, развивавшихся в одинаковых гидрохимических условиях, также отмечены статистически значимые различия по показателям выживаемости (табл. 1). Не выявлено достоверных различий по величине V при сравнении двух контрольных групп, а также между двумя группами, развивавшимися в воде с добавлением хлорида натрия.

В объединенной группе Na400(1+2) оказался максимальным не только средний показатель выживаемости поздних личинок и мальков окуня. Как видно из табл. 2, к концу эксперимента здесь наблюдались наибольшие линейные размеры молоди, статистически значимо отличав-

Таблица 2. Линейные размеры и число отверстий в сейсмочувствительных каналах головы у выживших мальков окуня из разных групп по окончании эксперимента

Table 2. Linear sizes and number of pores in the head seismosensory canals of surviving perch fry from different groups at the end of the experiment

Группа	SL, мм	U	CSO _{fro}	U	ClO _{lac}	U	CPM _{pre}	U	CPM _{den}	U
Con160(1)	<u>31,1±1,7</u> 23–37	61	<u>3,0±0,0</u> 3	224	<u>3,4±0,2</u> 3–4	145*	<u>3,6±0,2</u> 3–4	170	<u>4,0±0,1</u> 3–5	204
Con160(2)	<u>31,1±0,8</u> 27–38		<u>3,0±0,0</u> 3		<u>3,8±0,1</u> 3–4		<u>3,8±0,1</u> 3–4		<u>3,9±0,1</u> 3–5	
Con160(1+2)	31,1±0,7	-	3,0±0,0	-	3,7±0,1	-	3,7±0,1	-	3,9±0,1	-
Dis100(1)	<u>29,3±1,0</u> 24–34	42	<u>3,0±0,0</u> 3	190	<u>4,0±0,1</u> 3–5	196	<u>3,8±0,1</u> 3–4	124*	<u>4,1±0,1</u> 3–5	193
Dis100(2)	<u>30,8±1,2</u> 26–36		<u>3,1±0,1</u> 3–4		<u>4,1±0,2</u> 3–5		<u>3,4±0,2</u> 3–4		<u>4,1±0,1</u> 3–5	
Dis100(1+2)	30,0±0,8	206	3,0±0,0	897	4,1±0,1	619*	3,7±0,1	838	4,1±0,1	789
Ca400(1)	<u>30,5±0,5</u> 30–31	8	<u>3,3±0,4</u> 3–4	29	<u>3,8±0,4</u> 3–5	36	<u>3,8±0,4</u> 3–4	36	<u>4,0±0,6</u> 3–5	28
Ca400(2)	<u>29,6±1,6</u> 20–39		<u>3,0±0,1</u> 2–3		<u>3,7±0,2</u> 3–4		<u>3,9±0,1</u> 3–4		<u>3,6±0,2</u> 3–4	
Ca400(1+2)	29,8±1,4	<u>121</u> 126	3,0±0,1	<u>552</u> 468	3,7±0,1	<u>548</u> 320*	3,8±0,1	<u>500</u> 392	3,7±0,2	<u>411*</u> 318*
Mg400(1)	<u>31,2±1,0</u> 25–40	45	<u>2,9±0,1</u> 2–3	166	<u>3,3±0,1</u> 3–4	66*	<u>3,8±0,1</u> 3–4	150	<u>3,9±0,1</u> 3–5	141
Mg400(2)	<u>32,5±2,3</u> 29–44		<u>2,8±0,2</u> 2–3		<u>4,0±0,2</u> 3–5		<u>4,0±0,0</u> 4		<u>3,6±0,2</u> 3–4	
Mg400(1+2)	31,5±0,9	<u>263</u> 192	2,9±0,1	<u>920</u> 780	3,5±0,1	<u>805</u> 446*	3,8±0,1	<u>909</u> 712	3,8±0,1	<u>877</u> 665*
Na400(1)	<u>33,8±2,8</u> 27–45	55	<u>3,0±0,0</u> 3	144	<u>3,9±0,1</u> 3–4	156	<u>3,7±0,2</u> 3–4	122	<u>3,5±0,2</u> 3–4	90*
Na400(2)	<u>34,5±1,4</u> 27–43		<u>2,9±0,1</u> 2–4		<u>3,9±0,1</u> 3–5		<u>3,9±0,1</u> 3–4		<u>4,0±0,1</u> 3–5	
Na400(1+2)	34,3±1,3	<u>155*</u> 112*	2,9±0,1	<u>828</u> 703	3,9±0,1	<u>673*</u> 673	3,8±0,1	<u>807</u> 634	3,8±0,1	<u>774</u> 587*

Примечание. В строках с обычным шрифтом над чертой указаны средние значения со стандартной ошибкой, под чертой – минимальные и максимальные значения; в строках с полужирным шрифтом над чертой указаны значения критерия Манна-Уитни (U) при сравнении с группой Con160(1+2), под чертой – с группой Dis100(1+2); * – значения, соответствующие уровню значимости $p < 0,05$.

шиеся от аналогичных параметров в объединенных группах Con160(1+2) и Dis100 (1+2). Коэффициент вариации длин SL у мальков окуня в группе Na400 (1+2) также был наибольшим (15,9%), тогда как в группах Con160 (1+2) и Dis100(1+2) – наименьший (11,4–11,5%). Статистически значимых различий по линейным размерам мальков между группами окуня внутри парных повторностей не выявлено, тогда как по коэффициентам вариации такие различия зарегистрированы между группами Ca400 (1) и Ca400 (2). Максимальная длина SL (45 мм) зарегистрирована к концу эксперимента у одной особи из группы Na400 (1), минимальная (20 мм) – у одной особи из группы Ca400(2).

Таким образом, повышение минерализации пресной воды за счет добавления хлорида натрия привело по окончании эксперимента к появлению в среднем более крупных мальков речного окуня. Это было связано с ускорением линейного роста у части их особей в группах Na400(1) и Na400(2) и сопровождалось увеличением разнокачественности мальков по размерам длины SL. Подобные положительные ростовые эффекты у молоди разных видов пресноводных рыб наблюдались ранее в экспериментальных исследованиях других авторов при повышении минерализации пресной воды до 1–2 ‰ с добавлением NaCl [12].

Мальки окуня из объединенных групп Ca400 (1+2) и Mg400 (1+2) по окончании эксперимента характеризовались статистически значимым уменьшением числа отверстий сейсмоденситивных каналов в слезных (ClO_{lac}) и зубных костях (CPM_{den}), по сравнению с мальками из объединенной группы Dis100 (1+2), которые развивались в воде с минимальным содержанием Ca^{2+} и Mg^{2+} (табл. 2). Объединенная группа Na400(1+2) также статистически значимо отличалась по признаку CPM_{den} в меньшую сторону от объединенной группы Dis100 (1+2), а по признаку ClO_{lac} – наоборот, в большую сторону от объединенных групп Con160 (1+2) и Mg400 (1+2). В свою очередь внутри повторностей между группами Con160 (1) и Con160 (2), а также между группами Mg400 (1) и Mg400 (2) отмечены достоверные различия по признаку ClO_{lac} , кроме того, между группами Na400 (1) и Na400 (2) – по признаку CPM_{den} (табл. 2).

Таким образом, по результатам проведенного эксперимента однозначно можно судить лишь о влиянии Ca^{2+} на изменение количественных характеристик краниальных каналов боковой линии у мальков окуня. Это влияние проявилось в уменьшении числа отверстий сейсмоденситивных каналов, расположенных в покровных костях передней части головы у особей данного вида рыб, развивавшихся в условиях повышенного содержания ионов кальция в водной среде. Аналогичная тенденция направленной межгрупповой изменчивости счетных признаков сейсмоденситивной системы головы у речного окуня была отмечена нами ранее в его природных популяциях, обитающих в малых пресноводных прудах с разным содержанием главных катионов [9]. Однако прямой и однозначной связи пониженных показателей выживаемости и линейных размеров у мальков окуня из объединенной группы Ca400 (1+2) с недоразвитием на передней части их головы сейсмоденситивных органов, участвовавших в реализации пищевого поведения, в проведенном эксперименте не отмечено. Например, из табл. 1–2 видно, что близкие по значениям показатели выживаемости и линейные размеры имела также молодь окуня из объединенной группы Dis100 (1+2), которая развивалась в альтернативных гидрохимических условиях.

Заключение

Результаты проведенного эксперимента показали, что минерализация и ионный состав пресной воды могут влиять на особенности развития молоди речного окуня. Растворенные в воде хлоридные соли натрия в определенном диапазоне их концентраций оказывают положительное

влияние на выживаемость и линейный рост особей этого вида, находящихся на поздне-личиночных и мальковых этапах онтогенеза. Тогда как увеличение содержания в воде ионов кальция в период раннего развития речного окуня в большей степени отражается на некоторых особенностях его морфогенеза, в частности, приводит к уменьшению числа отверстий в краниальных каналах боковой линии, формирующихся у его мальков.

Литература

1. Попова О.А. Изменчивость морфометрических показателей у речного окуня (*Perca fluviatilis* L.) в пределах ареала / О.А. Попова, В.Л. Андреев, Н.П. Макарова и др. // Биология речного окуня. - М.: Наука, 1993. - С. 4-55.
2. Атлас пресноводных рыб России / Под ред. Ю.С. Решетникова. В 2-х т. - М.: Наука, 2003. - Т. 2. - 253 с.
3. Бобырев А.Е. К вопросу о формировании экологических группировок в популяциях речного окуня *Perca fluviatilis* / А.Е. Бобырев // Вопросы ихтиологии. - 2013. - Т. 53, № 6. - С. 699-706.
4. Eklov P. Effects of resource level and habitat type on behavioral and morphological plasticity in Eurasian perch / P. Eklov, R. Svanback, J. Olsson // Oecologia. - 2007. - Vol. 152, iss. 1. - P. 48-56.
5. Biology and culture of percid fishes: principles and practices / Ed. by P. Kestemont, K. Debrowski, R.C. Summerfelt. - Dordrecht: Springer Science + Business Media, 2015. - 901 p.
6. Kestemont P. Size heterogeneity, cannibalism and competition in cultured predatory fish larvae: biotic and abiotic influences / P. Kestemont, S. Jourdan, M. Houbart et al. // Aquaculture. - 2003. - Vol. 227. - P. 336-356.
7. Дислер Н.Н. Органы чувств системы боковой линии и их значение в поведении рыб. - М.: Изд-во АН СССР, 1960. - 310 с.
8. Котегов Б.Г. Изменчивость счетных признаков сейсмоденситивной системы головы у разных видов пресноводных рыб и её связь с гидрохимическими факторами / Б.Г. Котегов // Морской биологический журнал. - 2018. - Т. 3, № 3. - С. 22-34.
9. Bein R. Effects of larval density and salinity on the development of perch larvae (*Perca fluviatilis* L.) / R. Bein, G. Ribi // Aquatic Sciences. - 1994. - Vol. 56, iss. 2. - P. 97-105.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. - М.: Высшая школа, 1990. - 352 с.
11. Жукинский В.И. Влияние абиотических факторов на разнокачественность и жизнеспособность рыб в раннем онтогенезе. - М.: Агропромиздат, 1986. - 248 с.
12. Мартынова В.В. Влияние колебаний солености на рост, энергетику и рыбоводные качества молоди рыб / Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. - Саранск: МордГУ, 2003. - 22 с.
13. Мартымянов В.И. Влияние солености на пресноводных рыб / В.И. Мартымянов // Зоологический журнал. - 1989. - Т. 68, № 5. - С. 72-81.

References

1. Popova O.A. Variability of morphometric parameters in perch (*Perca fluviatilis* L.) within the areal / O.A. Popov, V.L. Andreev, N.P. Makarov et al. // Biology of the perch. M.: Nauka, 1993. P. 4-55.
2. Atlas of freshwater fishes of Russia / Ed. by Yu.S. Reshetnikov. In 2 vols. - M.: Nauka, 2003. - Vol. 2. - 253 p.
3. Bobyrev A.E. On the formation of ecological groups in populations of perch *Perca fluviatilis* / A.E. Bobyrev // Journal of ichthyology. - 2013. - Vol. 53, No. 6. - P. 699-706.
4. Eklov P. Effects of resource level and habitat type on behavioral and morphological plasticity in Eurasian perch / P. Eklov, R. Svanback, J. Olsson // Oecologia. - 2007. -Vol. 152, iss. 1. - P. 48-56.
5. Biology and culture of percid fishes: principles and practices / Ed. by P. Kestemont, K. Debrowski, R.C. Summerfelt. - Dordrecht: Springer Science + Business Media, 2015. - 901 p.
6. Kestemont P. Size heterogeneity, cannibalism and competition in cultured predatory fish larvae: biotic and abiotic influences / P. Kestemont, S. Jourdan, M. Houbart et al. // Aquaculture. - 2003. - Vol. 227. - P. 336-356.
7. Disler N.N. The sense organs of the lateral line system and their importance in fishes behavior. - M.: Academy of Sciences of USSR Publ., 1960. - 310 p.
8. Kotegov B G. Variability of the countable features of head seismosensory system in different species of freshwater fishes and their dependence on hydrochemical factors / B.G. Kotegov // Marine biological journal. - 2018. - Vol. 3, No. 3. - P. 22-34.
9. Bein R. Effects of larval density and salinity on the development of perch larvae (*Perca fluviatilis* L.) / R. Bein, G. Ribi // Aquatic Sciences. - 1994. - Vol. 56, iss. 2. - P. 97-105.
10. Lakin G.F. Biometrics. - M.: Higher School Publ., 1990. - 352 p.
11. Zhukinsky V.I. Influence of abiotic factors on different quality and survival of fishes in early ontogenesis. - M.: Agropromizdat, 1986. - 248 p.
12. Martynova V.V. Influence of salinity fluctuations on growth, energy and fish-breeding qualities of fishes fry / Abstract of the Dissertation ... Candidate of Biology. - Saransk: Mordovian State University, 2003. - 22 p.
13. Martemyanov V.I. Influence of salinity on freshwater fish / V.I. Martemyanov // Zoological journal. - 1989. - Vol. 68, No. 5. - P. 72-81.

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-8
УДК 620.3:619

Спектроскопические характеристики коллоидных растворов наночастиц металлов



Красочко П.А.
Krasochko P.A.

¹Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой эпизоотологии и инфекционных болезней животных ORCID ID: 0000-0002-4641-4757

¹Корочкин Р.Б., кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии;

¹Красочко П.П., доктор биологических наук, доцент, заведующий отраслевой лабораторией ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных;

¹Гвоздев С.Н., магистр ветеринарных наук, ассистент кафедры микробиологии и вирусологии;

¹Понаськов М.А., магистр ветеринарных наук, аспирант кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней животных;

²Еремец В.И., доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела обеспечения качества лекарственных средств для животных;

²Неминушая Л.А., доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела обеспечения качества лекарственных средств для животных

¹УО "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", Витебск, Республика Беларусь, e-mail: krasochko@mail.ru

²ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности" г.Щелково, email: vnitibp@mail.ru

Ключевые слова: наночастицы, спектроскопия, абсорбция света, плазмон, плазмонный резонанс.

Резюме: Наночастицы находят все большее практическое применение в различных областях человеческой деятельности, в том числе в ветеринарии и медицине. В связи с тем, что эффективность активности коллоидных растворов наночастиц напрямую связана с состоянием агрегации наноразмерных частиц, актуальным является использование быстрых и удобных методов оценки физико-химических характеристик таких препаратов. Наночастицы обладают уникальными оптическими свойствами, которые зависят от их размера и формы. Они могут быть определены по показателю преломления света на поверхности наночастиц в явлении, известном как плазмонный резонанс, что делает УФ-спектроскопию ценным инструментом для изучения и

Spectroscopic characteristics of colloidal solutions of metal nanoparticles

¹Krasochko P.A., ¹Korachkin R.B., ¹Krasochko P.P., ¹Gvozdev S.N., ¹Ponaskov M.A., ²Eremets V.M., ²Neminuschaya L.A.

¹Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

e-mail: krasochko@mail.ru

²FSBSI All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry, Shchelkovo, vnitibp@mail.ru

Key words: nanoparticles, spectroscopy, light absorption, plasmon, plasmon resonance.

Abstract. Nanoparticles are finding more and more practical applications in various fields of human activity, including veterinary and medicine. Due to the fact that the effectiveness of activity of colloidal solutions of nanoparticles is directly related to the state of aggregation of nanosized particles, it is urgent to use fast and convenient methods for assessing the physicochemical characteristics of such preparations. Nanoparticles have unique optical properties that depend on their size and shape. They can be determined by the refractive index of the light on the surface of the nanoparticles in a phenomenon known as plasmon resonance, which makes UV-Vis spectroscopy a valuable tool for studying and evaluating the characteristics of nanomaterials.

Goal of the study is to study the optical characteristics of several samples of colloids of nanoparticles of noble metals (silver) and bioelements (copper, silicon dioxide) in order to determine the possibility of further application of UV-Vis spectroscopy for evaluation of activity and stability of colloidal solutions of nanoparticles.

Commercial preparations based on nanoparticles of noble metals (silver) or bioelements (copper, silicon dioxide) in working dilutions recommended by manufacturers were used to study optical characteristics of the colloidal solutions. Optical density and absorption spectra were determined at the wavelengths (nm): 300-800 nm.

The f plasmon surface resonance has been found in all test preparations, while all of them exhibited obvious nonlinear optical properties. The most pronounced plasma resonance peak is found in the colloidal solution of silver nanoparticles within a wavelength of 420 nm. In the case of a colloidal solution of copper nanoparticles, the peak of plasmon resonance was less pronounced and had a red shift (peak at 560 nm). In the colloidal solution of silicon silica, the plasmon resonance was less pronounced than other test preparations, being shifted to the blue side of the spectrum (360 nm).

Для цитирования / For citation

Спектроскопические характеристики коллоидных растворов наночастиц металлов / П.А.Красочко [и др.] // Ветеринария и кормление - 2021. - №1. - С. 27-30.

Spectroscopic characteristics of colloidal solutions of metal nanoparticles /P.A.Krasochko [et. al.] // Veterinaria I kormlenie. - 2021 - #1- P. 27-30.

оценки характеристик наноматериалов. Целью работы явилось изучение оптические характеристики нескольких образцов коллоидов наночастиц благородных металлов (серебра) и биоэлементов (медь, кремния диоксид) с целью определения возможности дальнейшего применения УФ-ВС спектроскопии для оценки активности и стабильности коллоидных растворов наночастиц. Для исследования оптических характеристик коллоидных растворов использовали коммерческие препараты на основе наночастиц благородных металлов (серебра) или биоэлементов (меди, диоксида кремния) в рабочих разведениях, рекомендованных производителями. Оптическая плотность и спектры поглощения определялись на длинах волн (Нм): 300–800 Нм.

Установлено, что поверхностный плазмонный резонанс был обнаружен во всех тестовых препаратах, в то время как все они демонстрировали очевидные нелинейно – оптические свойства. Наиболее выраженный пик плазмонного резонанса обнаружен в коллоидном растворе наночастиц серебра в пределах длины волны 420 Нм. В случае коллоидного раствора наночастиц меди пик плазмонного резонанса был менее выражен и имел красное смещение (пик при 560 Нм). В коллоидном растворе кремнезема плазмонный резонанс был менее выражен, чем в других тест-препаратах, смешаясь в синюю сторону спектра (360 Нм).

Введение.

Профилактика и лечение инфекционных болезней у животных до сих пор представляет собой серьезную проблему, несмотря на очевидные достижения ветеринарной фармакологии. Практические ветеринарные врачи все чаще сталкиваются в полевых условиях с патогенами, имеющими множественную лекарственную устойчивость. Лечение таких патологий требует применения антибиотиков широкого спектра действия, которые являются более токсичными, более дорогими и зачастую менее эффективными, чем препараты узкой направленности. Кроме того, участие в патогенезе возбудителей с множественной лекарственной устойчивостью увеличивают срок выздоровления больного животного либо курс его лечения. Одним из действенных альтернатив применения классических антибиотиков является внедрение в лечебную практику препаратов на основе коллоидных растворов наночастиц металлов. Их терапевтический эффект всегда многосторонен, но чаще в его основе лежит высвобождение свободных ионов, которые, как известно, обладают бактерицидными свойствами в отношении широкой группы разноименных патогенов, включая вирусы и бактерии. Так, наночастицы серебра, которые считаются наиболее эффективными среди препаратов данной группы, активны в отношении более чем 150 видов бактерий, включая метициллин-устойчивые штаммы *Staphylococcus aureus*, бактерии родов *Acinetobacter*, *Klebsiella* и *Pseudomonas*, составляющих группу микроорганизмов ESKAPE с выраженной антибактериальной резистентностью.

С другой стороны, наноструктуры также значительно

прочнее объемных материалов и поэтому широко используются в таких областях, как структурная инженерия, энергетика и химия [5]. Наночастицы серебра представляют особый интерес из-за множества полезных свойств. Они обладают высокой проводимостью, высокой теплопроводностью и имеют высокую оптическую отражающую способность [2]. Помимо коммерческого использования, благодаря своим оптическим свойствам, наночастицы также имеют отношение к популярной области исследований в области плазмоники. Наночастицы серебра демонстрируют сильные и широкие поверхностные плазмонные резонансы в ультрафиолетовом и видимом свете из-за сильного когерентного колебания свободных поверхностных электронов в наночастицах, что приводит к сильному поглощению и рассеянию падающего света. Уникальные резонансные плазмонные характеристики в наночастицах даже способствовали их внедрению в различные отрасли химии и органического синтеза, например, в реакциях эпоксидирования этилена и окисления угарного газа [1].

Спектроскопия УФ-ВС (Ультрафиолет/Видимый свет) является мощным аналитическим инструментом исследования по нескольким причинам. Она позволяет быстро и качественно сравнивать свойства большого числа образцов без предварительного знания об их специфике. Сравнительная спектроскопические характеристики нескольких образцов, легко определить, отличаются ли их электронные структуры. В связи с тем, что спектроскопические свойства коллоидных растворов наночастиц в очень значительной степени зависят от их однородности, УФ-ВС спектроскопией можно быстро и достоверно судить об их качественных характеристиках [4].

По сути, в основе УФ-ВС спектроскопии лежит измерение количества ультрафиолетового и видимого света, который поглощается образцом. С физической точки зрения, после поглощения фотонов исследуемым образцом происходит возбуждение электронов в материале и их переход в состояние с более высокой энергией, создавая спектральную характеристику на соответствующей длине волны. УФ-ВС спектроскопия является признанным методом оценки коллоидной агрегации веществ, особенно для систем частиц микроскопического размера. Несмотря на неоспоримые преимущества, этот аналитический метод имеет определенные ограничения, в частности, связанные с тем, что измеряемый световой сигнал изменяется как в зависимости от объемной доли частиц, так и от их размера, причем только при условии одновременного изменения обоих параметров можно достоверно судить о качественных характеристиках самого образца. Для плазмонных наночастиц, демонстрирующих сильное поглощение света, УФ-ВС абсорбционная спектроскопия преодолевает это ограничение, так как поглощение тесно связано с физическими свойствами самой наночастицы [3].

Целью работы явилось изучение оптические характеристики нескольких образцов коллоидов наночастиц благородных металлов (серебра) и биоэлементов (медь, кремния диоксид) с целью определения возможности дальнейшего применения УФ-ВС спектроскопии для оценки активности и стабильности коллоидных растворов наночастиц.

Материалы и методы исследований.

Оптические характеристики коллоидных растворов наночастиц металлов и биоэлементов оценивали по наличию пиков плазмонного резонанса в спектрах поглощения коллоидов. Плазмонный резонанс представляет собой резонансное колебание свободных электронов на поверхности наночастиц под воздействием изменяющегося во времени внешнего электромагнитного поля, создаваемого электромагнит-

Таблица 1. Зависимости показателей абсорбции света от оптических характеристик образца
Tabl. 1. Dependencies of light absorption indices on optical characteristics of the sample

Показатель абсорбции света (α)	Интенсивность поглощения света образцом (%)	Интенсивность прошедшего через образец света (%)	Показатель I_0/I_1
0	0	100	1
0,25	43,7	56,23	1.778410101
0,5	68,38	31,62	3.162555345
1	90	10	10
2	99	1	100
3	99,9	0,1	1000
4	99,99	0,01	10000

Таблица 2. Значения показателей абсорбции света коллоидных растворов наночастиц
Tabl. 2. Values of light absorption indices of colloidal solutions of nanoparticles

Длина света (λ)	Показатель абсорбции света (α)		
	Наночастицы серебра	Наночастицы меди	Наночастицы кремния диоксид
300	0.548	1.297	0.475
320	0.344	1.262	0.398
340	0.669	1.237	0.407
360	1.42	1.221	0.380
380	2.284	1.199	0.360
400	2.722	1.182	0.348
405	2.725	1.175	0.341
410	2.728	1.168	0.335
415	2.735	1.164	0.330
420	2.756	1.156	0.324
425	2.655	1.148	0.321
430	2.616	1.137	0.316
440	2.261	1.126	0.311
460	1.108	1.101	0.306
480	0.574	1.072	0.289
500	0.345	0.962	0.280
520	0.287	0.934	0.271
540	0.247	0.915	0.263
560	0.220	0.952	0.256
580	0.154	0.827	0.248
600	0.089	0.742	0.243
650	0.064	0.347	0.231
700	0.045	0.213	0.224
750	0.036	0.178	0.219
800	0.026	0.073	0.209

ными волнами. Данный феномен является сильным индикатором того, что исследуемый материал по своим физическим параметрам является наноразмерным металлом. Считается, что ширина пика плазмонного резонанса указывает на большую неоднородность размеров наночастиц в исследуемом образце, а интенсивность поглощения плазмонного резонанса (величина пика) снижается с уменьшением размера наночастиц [4]. В отдельных публикациях [6] показано, что положение полосы плазмонного резонанса демонстрирует исключительную зависимость от размера наночастиц.

Показатель абсорбции (поглощения) света на определенной длине волны (λ), определяется по формуле (1):

$$\alpha\lambda = \log_{10} (I_0/I_1), \text{ где}$$

I_0 – интенсивность падающего света

I_1 – интенсивность света, прошедшего через образец

В таблице отражено соответствие показателя абсорбции числовым значениям процента поглощения света образцом.

Для исследования оптических характеристик коллоидных растворов использовали коммерческие препараты на основе наночастиц благородных металлов (серебро) или биоэлементов (медь, кремния диоксид) в рабочих разведениях, рекомендуемых производителями. Размер наночастиц, согласно заявлению производителя, лежал в пределах 10–40 нм. На момент проведения опыта все препараты имели неистекший срок годности (давность производства в пределах 2–4 мес.), отвечали заявляемым изготовителям физико-химическим параметрам. После внесения растворов в кюветы образцы выдерживали 10 минут при комнатной температуре для освобождения их от пузырьков газа.

Оптическую плотность и спектры поглощения определяли на спектрофотометре Nanon I3 (производство Китай) на следующих длинах волн (нм): 300, 320, 340, 360, 380, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 440, 460, 480, 500, 520, 540,

560, 580, 600, 650, 700, 750, 800. Неравномерность распределения порядка снятия показателей абсорбции ($\alpha\lambda$) определялась ожиданием пика плазмонного резонанса коллоидов в диапазоне длин электромагнитных волн 300–600 нм. Перед анализом образцов были записаны базовые измерения растворителя (дистиллированной воды), использованного в качестве нулевого образца.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе проведения спектрофотометрического анализа тестируемых образцов коллоидов наночастицы были получены показатели абсорбции света при разных длинах волн, которые внесены в таблицу 2.

Числовые данные из таблицы 2 были использованы для построения графиков с целью визуального обнаружения пиков плазмонного резонанса исследуемых образцов коллоидных растворов наночастиц (рис. 1-3).

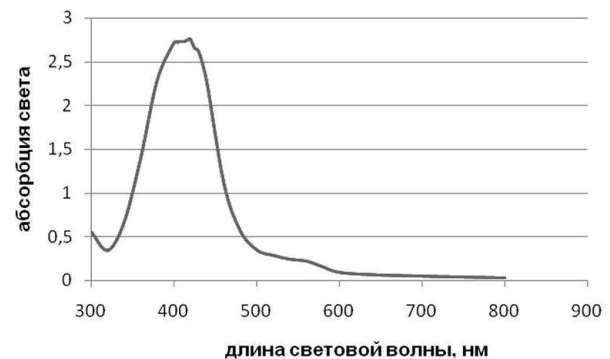


Рис. 1. Спектрофотометрические характеристики коллоидного раствора наночастиц серебра

Fig. 1. Spectrophotometric characteristics of a colloidal solution of silver nanoparticles

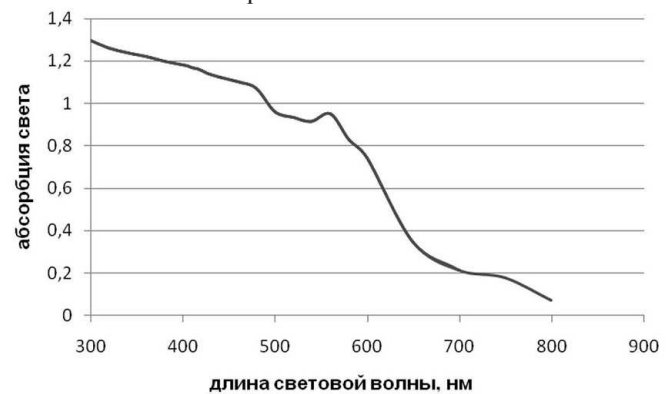


Рис. 2. Спектрофотометрические характеристики коллоидного раствора наночастиц меди

Fig. 2. Spectrophotometric characteristics of a colloidal solution of copper nanoparticles

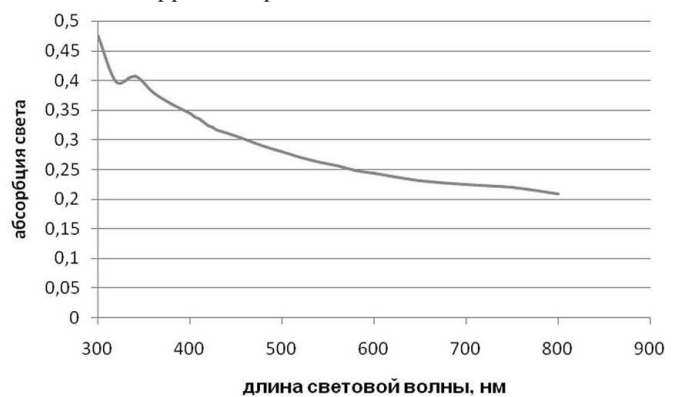


Рис. 3. Спектрофотометрические характеристики коллоидного раствора наночастиц кремния диоксида

Fig. 3. Spectrophotometric characteristics of a colloidal solution of silicon dioxide nanoparticles

Построенные графики (рис. 1-3) демонстрируют наличие у всех тестированных препаратов наличие плазмонного поверхностного резонанса, благодаря которому все они проявляют очевидные нелинейные оптические свойства. Наиболее выраженный пик плазмонного резонанса присутствует у коллоидного раствора наночастиц серебра, находящийся в пределах длины волны 420 нм. В случае коллоидного раствора наночастиц меди пик плазмонного резонанса оказался менее выраженным и, к тому же, смещенным в красную сторону (его пик приходится на длину 560 нм). У коллоидного раствора кремния диоксида плазмонный резонанс оказался менее выраженным по сравнению с другими тестируемыми препаратами, будучи смещенным в голубую сторону спектра (360 нм).

В связи с вышеотмеченным, среди исследуемых образцов гораздо более выраженный характер плазмонного резонанса отмечается у коллоидного раствора наночастиц благородного металла (серебра), так как сильное поглощение света обусловлено его поверхностно-плазмонными резонансными свойствами. Кроме того, по утверждениям некоторых авторов [7], наночастицы благородных металлов демонстрируют пики поглощения света, сильно зависящие от размера, формы, соотношения и состава наночастиц, что дает нам возможность в последующем провести ряд дополнительных опытов для оценки стабильности и активности коллоидных растворов наночастиц путем их спектrophотометрического анализа.

Выводы и перспективы дальнейших исследований

Проведенные нами исследования позволяют сделать следующие выводы и наметить следующие перспективы дальнейших изысканий:

1. Коллоидные растворы наноразмерных частиц металлов обладают стабильно однородными оптическими

характеристиками, что в доступном виде может быть определено проведением их УФ-ВС спектроскопии.

2. Пики интенсивности поглощения света, обусловленные явлением плазмонного резонанса на поверхности наночастиц металлов, имеют наиболее выраженные характеристики у наночастиц благородного металла (серебра) по сравнению с наночастицами биоэлементов (меди и кремния диоксида).

3. Методика УФ-ВС спектроскопии наноразмерных частиц благородных металлов и биоэлементов требует дальнейших исследований на предмет оценки их стабильности, сохранности и влияния на их активность различных внешних факторов.

Литература / References

1. Christopher, P. Visiblelightenhanced catalytic oxidation reactions on plasmonic silver nanostructures / P. Cristopher, H. Xin, S. Linc // Nature Chemistry - Nature Publishing Group, 2011. - N. 3(6). - P. 467-72.
2. Enhanced Electrical Conductivity of Silver Nanoparticles for High Frequency Electronic Applications / A. H. Alsheri [et al.] // ACS Applied Materials & Interfaces. - American Chemical Society, 2012. - N. 4(12). - P. 7007-7010.
3. Gambinossi, F. Aggregation Kinetics and Colloidal Stability of Functionalized Nanoparticles / F. Gambinossi, S. E. Mylon, J. K. Ferri // Advances in Colloid and Interface Science. - 2015. Vol. 222. - P. 332-349.
4. Kreibig, U. Optical absorption of small metallic particles / U. Kreibig, L. Genzel // Surface Science - Elsevier, 1985. - Vol. 156. - P. 678-700.
5. Properties and Applications of Colloidal Nonspherical Noble Metal Nanoparticles / T. K. Sau [et al.] // Advanced Materials. - Wiley-VCH, 2010. - N. 22(16). - P. 1805-1825.
6. Reversing the size-dependence of surface plasmon resonances / S. Peng [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - National Academy of Sciences, 2010. - Vol. 107(33). P.14530-14534.
7. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment / K. L. Kelly [et al.] // Journal of Physical Chemistry B. - 2003. - Vol. 107. - P. 668-677.

Пресс-релиз/ Press-release

Мясная продукция под видом товара прикрытия

В Смоленской области пресечена попытка нелегального ввоза из Республики Беларусь готовой мясной продукции под видом товара прикрытия

21 января в ППУ "Красная Горка" в рамках совместных мероприятий по усилению контроля за ввозом продукции сотрудниками Смоленской таможни было приостановлено движение грузового автомобиля под управлением гражданина Республики Беларусь, осуществлявшего перевозку готовой мясной продукции под видом товара прикрытия, неподконтрольного госветнадзору.

В рамках межведомственного взаимодействия данное транспортное средство было передано Управлению Россельхознадзора по Брянской, Смоленской и Калужской областям для проведения дальнейшего контроля в рамках имеющихся полномочий и принятия соответствующего решения.

Специалисты ведомства установили, что, согласно международной товарно-транспортной накладной CMR от 21.01.2021, в транспортном средстве должны были перевозиться бывшие в употреблении поддоны. Отправителем данного груза значилась ИП Леонова Е.П. (Витебская область, г. Орша), а получателем – ИП Алексеева М.А. (г. Смоленск).

В ходе последующего досмотра ветеринарные инспекторы Управления Россельхознадзора выяснили, что под верхними рядами загрузки из поддонов были скрыты упаковки с готовой мясной продукцией общим весом около 4 тонн. Согласно имеющейся маркировке, ее производителями являлись ОАО "Гродненский мясокомбинат" и ООО "Мясокомбинат Славянский". При этом у перевозчика также отсутствовали какие-либо ветеринарные сопроводительные документы, в том числе в электронном виде, подтверждающие качество и безопасность груза, которыми должна была сопровождаться их легальная поставка.

В то же время транспортировка осуществлялась в антисанитарных условиях, в автомобиле, не предназначенном для перевозки пищевой продукции, с существенным нарушением температурных режимов, указанных непосредственно изготовителями на упаковке товаров.

В настоящее время груз задержан. Для установления всех обстоятельств данного факта Управлением Россельхознадзора проводятся необходимые проверочные мероприятия.

После завершения административного расследования в соответствии с действующим ветеринарным законодательством будет принято решение о привлечении виновного лица к административной ответственности и возврате нелегально ввезенного груза на сопредельную территорию в присутствии представителей белорусской ветеринарной службы для дальнейшего разбирательства.

По материалам Россельхознадзора

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-9
УДК: 576.524

Сравнительная оценка эффективности методов паспортизации перевиваемых линий клеток



Маркова Е.В.
Markova E. V.

¹Маркова Е.В. – кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной биологии и вирусологии

²Ночевный В.Т. – научный сотрудник, доктор биологических наук

³Манин Б.Л. – научный сотрудник

⁴Матвеева И.Н. – доктор биологических наук, заместитель директора по бионанотехнологиям

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности (141142, Московская область, пос. Биокомбината, ВНИТИБП, vnitibp@mail.ru)

²Федеральное государственное бюджетное учреждение "Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов" (ФГБУ "ВГНКИ")

³Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных"

Ключевые слова: цитометрия, культура клеток, апоптоз, репродукция, инфекционная активность вируса

Резюме. В статье представлены результаты паспортизации двух трюфовариантов линий клеток MDBK традиционным методом и проточной цитометрией. Объектом исследования являлись тест-культуры MDBK-E и MDBK-B, прошедшие соответственно 30 и 43 пассажа после криоконсервирования. Широко используемый на практике традиционный метод аттестации перевиваемых линий клеток достаточно трудоёмок и требует значительных затрат труда, средств и времени. Метод проточной цитометрии базируется на широком спектре цитохимических и флуоресцентных способов анализа размеров, гранулярности, фаз клеточного цикла, структурных компонентов (ДНК, РНК, белка), апоптоза клеток и ряда других показателей. Экспериментально установлено, что сублинии клеток MDBK-E и MDBK-B различались по культуральным, цитоморфологическим и кариологическим показателям, а также по контаминации посторонними агентами и чувствительности к вирусам парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Анализ гистограмм распределения клеток в зависимости от содержания ДНК свидетельствовал о том, что по показателю апоптоза исследуемые линии MDBK-E и MDBK-B не превышали нормативного показателя и находились на уровне 3,9 и 6,8% соответственно. Клетки линии MDBK-E не содержали вирусной и микоплазменной контаминации, характеризовались выраженным ростовым потенциалом, сохраняли исходную морфологию клеток и являлись наиболее перспективным субстратом для производства антигенов парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Анализ результатов распределения гранулярности свидетельствовал о нарушении процессов деления и появлении в популяции сублинии MDBK-B аномальных клеток, а также о неадекватных условиях поддержания тест-культуры.

Comparative evaluation of the effectiveness of methods for certification of transplanted cell lines

Markova E. V., Nochevny V. T.,
Manin B. L., Matveeva I. N.

Key words: cytometry, cell culture, apoptosis, reproduction, infectious activity of the virus

Abstract. The article presents the results of certification of two trofovvariants of MDVK cell lines with the help of traditional method and flow cytometry. Research object was the test cultures MDBK-E and MDBK-B, which passed 30 and 43 passages, respectively, after cryopreservation. The traditional method of attestation of transplanted cell lines, widely used in practice, is rather laborious and requires significant expenditures of labor, money and time. The flow cytometry method is based on a wide range of cytochemical and fluorescent methods for the analysis of sizes, granularity, phases of the cell cycle, structural components (DNA, RNA, protein), cell apoptosis and a number of other indicators. It was experimentally established that the sublines of MDBK-E and MDBK-B cells differed in cultural, cytomorphological and karyological parameters, as well as in contamination by foreign agents and sensitivity to parainfluenza-3 viruses and infectious rhinotracheitis in cattle. Analysis of histograms of cell distribution depending on the DNA content showed that the studied lines MDBK-E and MDBK-B did not exceed the standard indicator in terms of apoptosis and were at the level of 3,9 and 6,8%, respectively. Cells of the MDBK-E line did not contain viral and mycoplasma contamination, were characterized by a pronounced growth potential, retained the original cell morphology and were the most promising substrate for the production of antigens of parainfluenza-3, infectious rhinotracheitis in cattle. Analysis of granularity distribution results testified to the violation of the division processes and the appearance in the population of the subline MDBK-B of abnormal cells, as well as inadequate conditions for maintaining the test culture. It has been established that the flow cytometry method is objective and quite promising in the selection of culture models that meet the requirements of domestic and international standards. The revealed correlation between the magnitude of apoptosis, cultural properties and parameters of the cell cycle makes it possible to assess the biological properties of the producer culture as one of the leading factors in the change in programmed cell death. Changes the index of programmed cell death underlies a number of important pathological conditions and degenerative processes.

Установлено, что метод проточной цитометрии является объективным и достаточно перспективным при выборе культуральных моделей, отвечающих требованиям отечественных и международных стандартов. Выявленная корреляция между величиной апоптоза, культуральными свойствами и показателями клеточного цикла позволяют расценивать биологические свойства культуры-производителя как один

Для цитирования / For citation

Сравнительная оценка эффективности методов паспортизации перевиваемых линий клеток / Е.В. Маркова и [др.]// Ветеринария и кормление.- 2021.-№1. -С.31-34.

Comparative evaluation of the effectiveness of methods for certification of trans-planted cell lines/ E. V. Markova [et al.]// Veterinaria I kormlenie. -2021.-№1.-P.31-34.

из ведущих факторов изменения программированной клеточной гибели. Изменение показателя программированной клеточной гибели лежит в основе ряда важнейших патологических состояний и дегенеративных процессов.

В последние годы для производства противовирусных препаратов широко используются культуральные модели (КМ) различного происхождения. При этом выбор и паспортизация тест-культур, отвечающих требованиям ВОЗ и РД 42-28-10-89, является основой для серийного производства высокоактивных противовирусных препаратов в соответствии с требованиями GMP [1,2]. Наиболее перспективным субстратом для изготовления вирусных антигенов в больших объёмах считаются перевиваемые линии клеток. Следует, однако, отметить, что большинство из них существенно различаются по культурным и морфологическим показателям, росту потенциалу, уровню контаминации и чувствительности к модельным вирусам, что не гарантирует эффективности и стандартности результатов вирусологических исследований и требует обязательной паспортизации культуральных моделей. Широко используемый на практике традиционный метод аттестации перевиваемых линий клеток достаточно трудоёмок и требует значительных затрат труда, средств и времени [3]. Для аттестации перевиваемых линий клеток апробирован метод проточной цитометрии (ПЦ), который базируется на широком спектре цитохимических и флуоресцентных способов анализа размеров, гранулярности, фаз клеточного цикла, структурных компонентов (ДНК, РНК, белка), апоптоза клеток и ряда других показателей. При этом измеряются и анализируются параметры не всей популяции, а каждой клетки в отдельности в больших выборках 10^3 – 10^6 в течение 1–2-х секунд [4,5,6]. Программированная клеточная гибель (ПКГ) – апоптоз играет определяющую роль в поддержании клеточного гомеостаза в тканях и органах человека и животных, в том числе в клеточных культурах. Изменение показателя программированной клеточной гибели лежит в осно-

ве ряда важнейших патологических состояний и дегенеративных процессов "in-vivo" и "in-vitro" [7,8,9,10].

В данной работе представлены результаты паспортизации двух трюфовариантов линий клеток MDBK традиционным методом и проточной цитометрией (ПЦ).

Материалы и методы

Клеточные культуры. Изучали перевиваемые линии клеток почки телят, "MDBK-E", полученные из Англии ("ЕСАСС") и из ФГБУ ВНИИЗЖ "MDBK-B" на уровне 30 и 43 пассажей соответственно. Тест-культуры поддерживали в монослое в течение 48–72 ч при температуре 37°C. Оценивали культуральные, морфологические и кариологические показатели, пригодность для репродукции и степени накопления инфекционной активности вирусов парагриппа-3 (ПГ-3, штамм "45/86") и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (ИРТ, штамм "ТК-А/ВИЭВ").

Методы аттестации перевиваемых линий клеток проточной цитометрией. Фиксация и окрашивание клеток. Клетки 2-3 суточных культур MDBK отделяли от субстрата диспергентом на основе химопсина, трижды отмывали охлаждённым фосфатно-буферным раствором (ФБР), содержащим 0,15 М NaCl при pH 7,2. Осадок клеток фиксировали 70% этанолом в течение 3 ч при 4 °С. Фиксированные клетки трижды отмывали от фиксатива центрифугированием (7 мин, 450 g) в 3 см³ охлажденного ФБР. Осадок клеток ресуспендировали в 0,5 см³ ФБР, содержащем 40 мг/см³ иодида пропидия ("Calbiochem") и 0,5 мг/см³ рибонуклеазы ("Sigma", США), выдерживали 60 мин и анализировали на лазерном проточном цитофлуориметре-сортере "EPICS® Elite" ("Coulter", США), оборудованном аргоновым лазером CYONICS ("Uniphase") с длиной возбуждения 488 нм и мощностью луча 15 мВт. [1,2,3]

Среднестатистические размеры интактных клеток оценивали по рассеиванию света под углами от (0–10°) в сравнении со стандартными микросферами ("Flow & Check", Beckman-Coulter, США) диаметром 10 мкм.

Гранулярность неокрашенных клеток (МЕАМ) определяли по рассеиванию света, под углом 90 °С. Образцы культур анализировали с использованием барьерных фильтров 488ВК, 488ВЗ и 488DL. Для дискриминации частиц, не соответствующих по размерам и гранулярности живым клеткам, в программу анализа вводим логические ограничения.

Распределение ДНК по фазам клеточного цикла апоптозу. Исследовали линии клеток MDBK-E и MDBK-B за 24 ч до образования монослоя. Популяцию клеток, окрашенных иодидом пропидия, исследовали в интегральном канале флуоресценции с использованием барьерных фильтров 488ВК, 488ВР и 625ВР. Для удаления из популяции агрегатов клеток в программу вводили логические ограничения. Клетки, содержащие ДНК меньше 2n, считали апоптотическими. Полученные гистограммы подвергали математической обработке с использованием программ EXPO-32 ("Beckman-Coulter", США) и Multi Cycle ("Phoenix Flow & Systems", США).

Контроль чувствительности культур клеток к вирусам ПГ-3, ИРТ крупного рогатого скота. Инфекционную активность штаммов

Таблица - Сравнительная характеристика культуральных, кариологических и цитометрических показателей сублиний клеток MDBK методом проточной цитометрии					
Table - Comparative characteristics of cultural, karyological and cytometric parameters of MDBK cell sublines by flow cytometry					
Показатели	Значение показателей				
	Наименование тест-культур				
	MDBK-E	MDBK-B			
Источник получения	Англия ЕСАСС (E)	ВНИИЗЖ (B)			
Культуральные свойства					
Пассаж	30	43			
Сроки образования монослоя	48	48-72			
Индекс пролиферации (ИП)	3-5	2-3			
Морфология	Клетки мелкие, эпителиоподобные с четкими границами. Цитоплазма не зернистая. Яда округлой формы с 1-4 ядрышками.	Клетки более крупные эпителиоподобные, зернистые со слабо выраженными границами. Незначительная вакуолизация цитоплазмы.			
Контаминация: -PPLO -BVD	- -	+ +			
Кариологические показатели					
Пределы изменчивости числа хромосом в клетках	43-58	49-104			
Модальное число хромосом: -количество, шт. -процент, %	51 30	52 58			
Цитометрический анализ					
Размеры клеток, мкм	18,6±3,65	21,3±4,53			
Гранулярность, (МЕАМ)	387	444			
Апоптоз, %	3,9	6,8			
Фазы клеточного цикла	S	46,3	44,4		
	G2/61	1,96	1,96		
	S+G2+M, %	63,8	52,6		
	Показатели	PC, %	CV	PC, %	CV
	G1+GO	36,1	5,0	47,4	5,4
G2+M	17,5	3,5	8,2	3,6	
Чувствительность к вирусам					
Накопление вирусов (Lg ТЦД ₅₀ /см ³)	ПГ-3	7,47±0,06	7,10±0,14		
	ИРТ	7,60±0,04	7,23±0,10		

вирусов ПГ-3, ИРТ оценивали титрованием по ЦПД на монослойных пробирочных культурах MDBK-E и MDBK-B соответственно через 72–96 ч и 40–48 ч инкубирования.

Результаты и обсуждения

Экспериментально установлено, что сублинии клеток MDBK-E и MDBK-B различаются по культуральным, цитоморфологическим и кариологическим показателям, а также по контаминации посторонними агентами и чувствительности к вирусам ПГ-3 и ИРТ.

Тест-культура MDBK-E представлена мелкими эпителиоподобными клетками с чётко выраженными границами (рис. 1). Цитоплазма клеток не зернистая, интерфазные ядра округлой формы содержат 1–4 ядрышка. Напротив, клетки сублинии MDBK-B были более крупными, зернистыми с незначительной вакуолизацией цитоплазмы (рис. 1). Цитопатических изменений в монослойных культурах клеток на протяжении 10 суток наблюдения не установлено. При анализе метафазных пластинок достоверно установлено, что число хромосом в клетках MDBK-E и MDBK-B колеблется соответственно на уровне от 43 до 58 и от 49 до 104, а модальное число хромосом представлено 51 и 52 хромосомами, составляющими в популяции 30 и 58 %. В кариотипе сублинии клеток MDBK-E, кроме того, выявлены 2 маркерные хромосомы – большой мегацентрик и большая субметацентрическая хромосома, характерные для линии MDBK-NBL1 из американской коллекции ATCC клеточных культур (рис. 2).

Инфицированность культур клеток микоплазмами оценивали микробиологическим (ММ), цитохимическим (ЦХМ) методами и в ПЦР в соответствии с требованиями "Методических рекомендаций по способу выявления микоплазм в культурах перевиваемых клеток (М., 1983). Цитохимическим методом и в ПЦР микоплазменная инфекция была выявлена в клетках сублинии MDBK-B. Контаминация указанной культуры клеток MDBK-B вирусом BVD (нецитопатогенный) была также подтверждена. Напротив клетки линии MDBK-E не содержали вирусной и микоплазменной контаминации, характеризовались выраженным ростовым потенциалом, сохраняли исходную морфологию клеток и являлись наиболее перспективным субстратом для производства антигенов ПГ-3 ИРТ (рис. 1,2).

В целях оптимизации и стандартизации производства антигенов ПГ-3 и ИРТ и снижения апоптоза клеток в куль-

туре были изготовлены эталонный ("Master seed") и рабочий банки ("Working seed") сублинии клеток MDBK-E в соответствии с требованиями стандарта по 20 и 150 ампул [1,2].

Объектами аттестованных клеток рабочего банка обеспечивают серийное производство и контроль активности антигенов ПГ-3 и ИРТ стандартным клеточным субстратом в течении 10–15 лет.

Параллельно тест-культуры MDBK-E и MDBK-B, прошедшие соответственно 30 и 43 пассажа после криоконсервирования, были изучены методом проточной цитометрии по размерам клеток, гранулярности, распределению ДНК по фазам клеточного цикла и программированной клеточной гибели-апоптозу [1,2,3].

Среднестатистические размеры клеток. Данный показатель характеризует изменение размера не окрашенных клеток в процессе длительного культивирования. Увеличение или уменьшение размера клеток свидетельствует о нарушении процессов деления и появлении в образцах аномальной популяции клеток в культуре. В результате цитометрического анализа показано, что интактные клетки сублиний MDBK-E и MDBK-B варьируют по величине на уровне 30 и 43 пассажей после криоконсервирования в пределах $18 \pm 3,65$ и $21,3 \pm 4,53$ мкм соответственно, что характерно для перевиваемой линии клеток почек телят на стадии становления.

Гранулярность. Показатель гранулярности (MEAM) характеризует состояние внутренней структуры клеток, соотношение ядра и цитоплазмы, а также свидетельствует о наличии аномальных и апоптотических клеток.

Анализ результатов распределения гранулярности свидетельствует о том, что изолированные клетки сублиний MDBK также существенно различались. В частности более гранулярными были клетки сублинии MDBK-B (444). В тоже время показатель MEAM линии клеток MDBK-E не превышал 387. Отмеченные факты свидетельствуют о нарушении процессов деления и появлении в популяции сублинии MDBK-B аномальных клеток, а также о неадекватных условиях поддержания тест-культуры.

На следующем этапе исследований оценивали перспективность метода проточной цитометрии для аттестации сублиний клеток MDBK в качестве субстрата для производства вирусных антигенов. Результаты сравнительного изучения фаз клеточного цикла MDBK-E и MDBK-B на уровне 32 и 45 пассажей методом проточной цитометрии представлены в таблице (рис.3)

Анализ гистограмм распределения клеток по фазам клеточного цикла показывает, что сублиния клеток MDBK-E является наиболее перспективным субстратом для культивирования и контроля активности вирусов ПГ-3 и ИРТ. Это обусловлено, как относительно низкими значениями размеров и гранулярности, так и более высокими показателями пролиферирующих клеток, в том числе и в фазах G2+M (17,5%), и S+G2+M (63,8%), и оптимальным соотношением G2/G1 равным 1,96, что указывает на практическое отсутствие в популяции аномальных клеток с изменённым количеством ДНК. Напротив, количество пролиферирующих клеток сублинии MDBK-B было несколько ниже и не превышало на стадиях G2+M (8,2%) и S+G2+M (52,6%) при аналогичном соотношении G2/G1 (1,96). Следует также отметить, что при сопоставимых показателях клеточного цикла сублиния клеток MDBK-B морфологически изменена, состоит из более крупных, зернистых и вакуолизованных клеток с чрезвычайно высокой (MEAM-444) гранулярностью и контаминирована вирусом диареи (BVD) и микоплазмами.

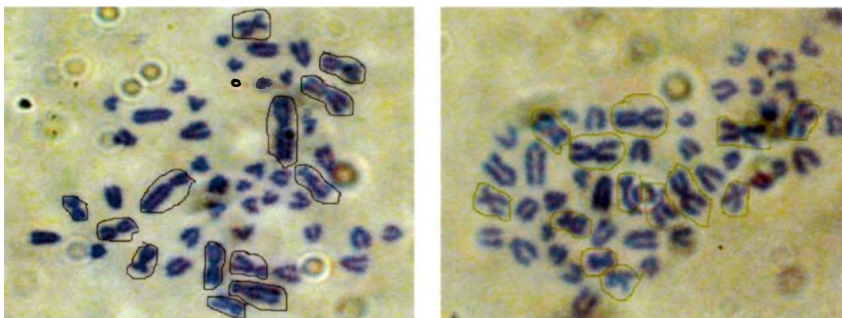


Рис. 1 - Цитоморфологическая характеристика сублиний клеток MDBK-ECACC (А) и MDBK-ВНИИЗЖ (В): микрофото, ок.х10, об.х90, нативные препараты

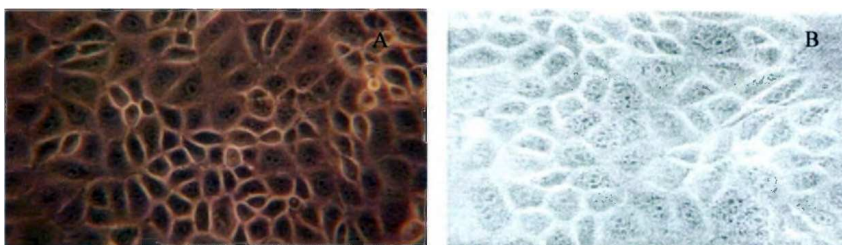


Рис. 2 - Кариотипы сублиний клеток MDBK-ECACC (А) и MDBK-ВНИИЗЖ (В)

Fig. 2 - Karyotypes of cell sublines MDBK-ECACC (A) and MDBK-ARRIAH (B)

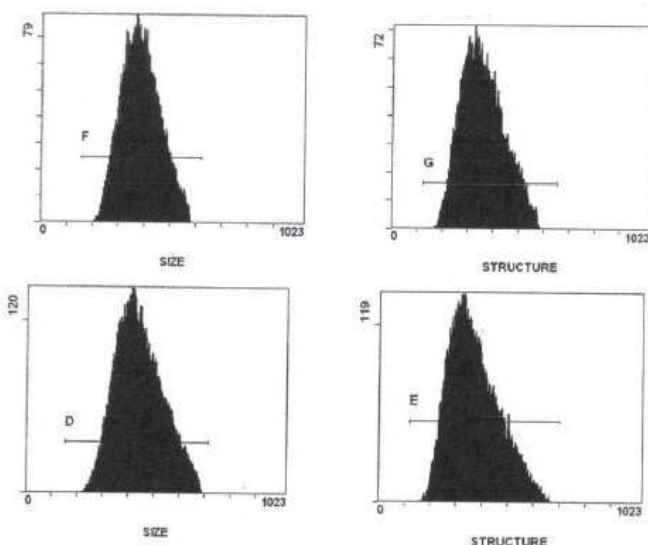


Рис. 3 Гистограммы распределения клеток сублиний MDBK-E и MDBK-B по размерам и гранулярности
Fig. 3 Histograms of the distribution of cells of sublines MDBK-E and MDBK-B in size and granularity

Полученные факты свидетельствуют о том, что MDBK-B не отвечает требованиям отечественных и международных стандартов и не приемлема, в качестве субстрата, для производства антигенов ПГ-3 и ИРТ. С учётом полученных результатов можно констатировать, что экспресс-метод проточной цитометрии является объективным и достаточно перспективным для паспортизации и аттестации культур клеток по размерам, гранулярности, фазам клеточного цикла, апоптозу и ростовому потенциалу. Определяющим показателем перспективности применения перевиваемых линий клеток на практике является апоптоз. Этот показатель характеризуется сморщиванием клеток, фрагментацией ДНК, дезинтеграцией клеточной мембраны и образованием апоптотических телец. Клетки, содержащие ДНК меньше $2n$, считали апоптотическими. Этот показатель отражает состояние клеточной популяции. В период исследования при оптимальных условиях культивирования и в качественной линии клеток количество клеток, находящихся в состоянии спонтанного апоптоза не превышает 14–19%. При ухудшении условий пассирования или в результате воздействия цитостатиков количество апоптотических клеток существенно возрастает [9].

Анализ гистограмм распределения клеток в зависимости от содержания ДНК свидетельствует о том, что по показателю апоптоза исследуемые линии MDBK-E и MDBK-B не превышают нормативного показателя и находятся на уровне 3,9 и 6,8% соответственно. В тоже время высокие ростовые свойства, отсутствие контаминации и удовлетворительные показатели фаз клеточного цикла и апоптоза дают основание рекомендовать сублинию клеток MDBK-E для производства антигенов ПГ-3 и ИРТ. Напротив, контаминация микоплазмами и вирусом BVD, более низкие показатели ростового потенциала и чувствительности к вирусам, а также менее стандартные значения показателей клеточного цикла свидетельствуют о несоответствии сублинии клеток MDBK-B требованиям отечественных и международных стандартов и непригодности данной культуры для практических целей [7,8,9].

Чувствительность культуральной модели является определяющим фактором для максимального накопления вирусов. Установлено, что сублиния клеток MDBK-E характеризуется более высокой чувствительностью и обеспечивает стационарным способом максимальное накопление вирусов ПГ-3 и ИРТ на уровне $7,17 \pm 0,12$ и $7,43 \pm 0,08$ lg ТЦД₅₀/см³. В сублинии клеток MDBK-B накопление вирусов было несколько ниже. Напротив, роллерной метод культивирования оказался производительным и более эффективным способом культивирования вирусов и обеспе-

чил максимальное накопление вирусов ИРТ ($7,60 \pm 0,04$ lg ТЦД₅₀/см³) и ПГ-3 ($7,47 \pm 0,06$ lg ТЦД₅₀/см³). Отмеченные преимущества роллерного метода культивирования и постоянное использование стандартных по качеству питательных сред, растворов и аттестованного клеточного субстрата MDBK-E послужило основой эффективного производства антигенов ПГ-3 и ИРТ крупного рогатого скота с активностью в пределах 6,67–7,5 и 7,0–8,0 lg ТЦД₅₀/см³.

Сравнительный анализ результатов паспортизации культуральных моделей показал, что экспресс-метод проточной цитометрии является объективным и требует минимальных затрат труда, средств, времени при оценке и выборе наиболее перспективной тест-культуры. При 1000 раз большей выборки клеток метод проточной цитометрии позволяет в 15–20 раз ускорить получение достоверных результатов контроля жизнеспособности, размеров, гранулярности, фаз клеточного цикла и апоптоза тест-культуры MDBK-E. Выявленная корреляция между величиной апоптоза, культуральными свойствами и показателями клеточного цикла позволяют расценивать биологические свойства культуры-производителя как один из ведущих факторов изменения программируемой клеточной гибели. Существенное увеличение или снижение программируемой клеточной гибели можно рассматривать как один из объективных и практически значимых маркеров при выборе культуральной модели для изготовления иммунобиологических препаратов и контроля активности вирусных антигенов.

Литература

1. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение/Под ред. С.В. Хайдукова, А.В. Зурочки - Челябинск, С. 195, 2008
2. Колышкин В.М., Ночевный В.Т., Новохатский А.С. Апоптоз клеток в культуре: особенности проявления и влияние на эффективность биотехнологического производства (Обзор)// ЖМЭИ, №6. С. 99-105, 2005
3. Методические указания (РД 42-28-10-89) по аттестации перевиваемых клеточных линий-субстратов производства и контроля медицинских иммунобиологических препаратов.-М., 1989.
4. Методические рекомендации о порядке аттестации и поддержания перевиваемых линий клеток, используемых для культивирования вирусов производства иммунобиологических препаратов ветеринарного назначения/Новые методы исследований по проблемам ветеринарной медицины (РАСХН).-М., 4.4. С. 422-438, 2008
5. Мораска Л., Эрба Э., Проточная цитометрия, Культура животных клеток. Методы. М.: Мир, С. 182-213, 1989
6. Ночевный В.Т., Колышкин В.М., Попов В.Ф., Перспективы использования метода проточной цитометрии для стандартизации перевиваемых линий клеток, Международная научная конференция, Владимир, С. 498, 2003
7. Полетаев А.И. Проточная цитометрия и сортировка в цитологии, молекулярной биологии и медицине, Общие проблемы физико-химической биологии. Итоги науки и техники ВИНТИ. М., Т. 12. С. 3-87, 1989
8. Требования к перевиваемым линиям клеток, используемым для производства биологических препаратов, Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов, М., С. 85-89, 1988
9. Шалунова Н.В., Ломанова Г.А., Принципы стандартизации клеточных линий, применяемых в биотехнологии, Актуальные проблемы медицинской вирусологии, М., С. 223-224, 1985
10. Абастадо Дж. П. Апоптоз: функция и регуляция клеточной гибели, Иммунол. Т. 147. С. 443-456, 1996

References

1. Questions of modern flow cytometry. Clinical application/ Ed. by S. V. Khaydukov, A.V. Zurochki-Chelyabinsk, P.195, 2008
2. Kolyshkin V. M., Nochevny V. T., Novokhatsky A. S. Cell apoptosis in culture: features of manifestation and influence on the efficiency of biotechnological production (Review), Journal of Microbiology, epidemiology and Immunobiology, №6. P. 99-105, 2005
3. Guidelines (RD 42-28-10-89) for certification of transplanted cell lines-substrates for production and control of medical immunobiol. preparations, M., 1989
4. Methodological recommendations on the procedure for certification and maintenance of transplanted cell lines used for the cultivation of viruses for the production of veterinary immunobiological preparations, New research methods for veterinary medicine, M., 4.4. С. 422-438, 2008
5. Moraska L., Erba E., Flow cytometry, Animal cell culture. Methods. M.: Mir, P. 182-213, 1989
6. Nochevny V. T., kolyshkin V. M., Popov V. F., Prospects of using the flow cytometry method for standardization of transplanted cell lines, International scientific conference, Vladimir, P. 498, 2003
7. Poletaev A. I. Flow cytometry and sorting in Cytology, molecular biology and medicine, General problems of physical and chemical biology. Results of science and technology VINITI. M., V. 12. P. 3-87, 1989
8. Requirements for transferable cell lines used for the production of biologics, world health organization Committee of experts on standardization of biologics, M., P. 85-89, 1988
9. Shalunova N. V., Lomanova G. A., Principles of standardization of cell lines used in biotechnology, Actual problems of medical Virology, M, P. 223-224, 1985
10. Abastado J.P. Apoptosis: function and regulation of cell death, Res. Immunol. V. 147. P. 443-456, 1996

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-10
УДК 619:615.37.012

Требования к стандартным образцам вирусных вакцин для ветеринарии



Матвеева И.Н.
Matveeva I.N.

¹Матвеева И.Н., доктор биологических наук, профессор, зам. директора по бионанотехнологиям
¹Скотникова Т.А., доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела обеспечения качества лекарственных средств для животноводства и ветеринарии
¹Неминушая Л.А., доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела обеспечения качества лекарственных средств для животноводства и ветеринарии;
¹Еремец Н.К., кандидат биологических наук, доцент, заведующий отделом обеспечения качества лекарственных средств для животноводства и ветеринарии
¹Еремец В.И., доктор биологических наук, профессор, зам. директора по научной работе
¹Маркова Е.В., кандидат сельскохозяйственных наук, ученый секретарь ВНИТИБП, научный сотрудник отдела иммунологии;
²Красочко П.П., доктор биологических наук, доцент, заведующий отраслевой лабораторией ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных
¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский технологический институт биологической промышленности". Московская обл., Щелковский р-н, п. Биокомбината, стр. 17., e-mail: vnitibp@mail.ru
²УО "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", ул.Доватора 7/11, г. Витебск, 210026, Республика Беларусь

Ключевые слова: стандартный образец, иммунобиологические препараты, аттестуемые характеристики, вспомогательные вещества, срок годности

Резюме. Одной из отраслей отечественной биотехнологии является производство иммунобиологических препаратов, в том числе вакцин медицинского и ветеринарного назначения. Несмотря на общий спад, наблюдающийся в мировой экономике последних лет, фармацевтический рынок развивается. В 2020 году рынок биологических лекарственных средств может превысить 250 млрд. долларов. В Российской Федерации и странах Евразийского экономического Союза, предпринимаются серьезные действия

Requirements for standard viral vaccine samples for veterinary medicine

¹Matveeva I.N. vnitibp@mail.ru
¹Skotnikova T.A., ¹Neminushchaia L.A.,
¹Eremets N.K., ¹Eremets V.I., ¹Markova E.V.
²Krasochko P.P.

¹"All-Russian Scientific Research Technological Institution of Biological Industry" (VNITIBP) Ministry of Education, Schelkovo, e-mail: vnitibp@mail.ru
²"Vitebsk Order" Badge of Honor "State Academy of Veterinary Medicine," Vitebsk, Republic of Belarus,

Key words: standard sample, immunobiological preparations, certified characteristics, auxiliary substances, shelf life

Abstract. One of the branches of domestic biotechnology is the production of immunobiological drugs, including vaccines for medical and veterinary purposes. Despite the general decline observed in the global economy in recent years, the pharmaceutical market is developing. In 2020, the biological drug market could exceed \$250 billion. In the Russian Federation and the countries of the Eurasian Economic Union, serious actions are being taken to harmonize national regulatory requirements with international rules and foreign control systems in the field of the production of immunobiological drugs and quality control. It should be noted the price availability of domestic vaccines, their high adaptation to the Russian epizootic situation, since they were created on the basis of strains characteristic of the territory of the country and the Eurasian continent. For the prevention of diseases such as foot-and-mouth disease, anthrax, trichophytia, microsporia, brucellosis, domestic vaccines are used in Russia. The main component of the strategy for the production of veterinary vaccines to increase competition of products is ensuring their quality. Products of Russian companies that do not have the practice of applying international standards cannot be competitive. This leads to the loss of the domestic market. Currently, regulatory documents of the Russian Federation and the Eurasian Economic Union have established uniform requirements for the organization of the production and quality control of medicines for medical and veterinary use. Within the framework of these documents, areas related to the development and certification of standard samples of various levels are actively developing, the purpose of which is to quantify the specific activity of drugs and the metrological characteristics of the methods used to evaluate quality, stability indicators, as well as control of auxiliary substances. The use of auxiliary substances and pharmaceutical substances is regulated by regulatory documentation: GF, FFS, FS, FSP or industry standards. This is necessary, since heterogeneity of drug quality parameters is possible due to various factors, including uncontrolled and uncontrolled.

по гармонизации национальных нормативных требований с международными правилами и зарубежными контрольными системами в сфере производства иммунобиологических препаратов и контроля качества. Следует отметить ценовую доступность отечественных вакцин, их высокую адаптацию к российской эпизоотической ситуации, поскольку они создавались на основе штаммов, характерных для территории страны и Евразийского континента. Для

Для цитирования / For citation

Требования к стандартным образцам вирусных вакцин для ветеринарии/ Матвеева И.Н. [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2021. - № 1 – С. 35-37.

Requirements for standard viral vaccine samples for veterinary medicine/ Matveeva I.N. [et al.] // Veterinaria i kormlenie. – 2021. – #1. – P. – 35-37.

профилактики таких заболеваний, как ящур, сибирская язва, трихофития, микроспория, бруцеллез, в России применяются отечественные вакцины. Главной составляющей стратегии производства ветеринарных вакцин для повышения конкурентности продукции является обеспечение их качества. Продукция российских компаний, не владеющих практикой применения международных стандартов, не может быть конкурентоспособной. Это приводит к потере внутреннего рынка. В настоящее время нормативные документы Российской Федерации Евразийского экономического союза установили единые требования к организации производства и контроля качества лекарственных средств для медицинского и ветеринарного применения. В рамках этих документов активно развиваются направления, связанные с разработкой и аттестацией стандартных образцов различного уровня, целью применения которых является количественное определение специфической активности препаратов и метрологических характеристик применяемых методов оценки показателей качества, стабильности, а также контроль вспомогательных веществ. Применение вспомогательных веществ и фармацевтических субстанций регламентируется нормативной документацией: ГФ, ОФС, ФС, ФСП или отраслевыми стандартами. Это необходимо, поскольку возможна неоднородность параметров качества препарата из-за различных факторов, в том числе неконтролируемых и неуправляемых.

Введение

По прогнозам ведущих международных организаций – Всемирного банка, ОЭСР, Еврокомиссии и др., – темпы роста рынков биотехнологической продукции будут неуклонно возрастать [1]. Несмотря на общий спад, наблюдающийся в мировой экономике последних лет, фармацевтический рынок развивается. В 2020 году рынок биологических лекарственных средств может превысить 250 млрд. долларов [2].

Одной из отраслей отечественной биотехнологии является производство иммунобиологических препаратов, в том числе вакцин медицинского и ветеринарного назначения [3]. Следует отметить ценовую доступность отечественных вакцин для ветеринарии и животноводства, их высокую адаптацию к российской эпизоотической ситуации, поскольку они создавались на основе штаммов, характерных для территории страны и Евразийского континента. Для профилактики таких заболеваний, как ящур, сибирская язва, трихофития, микроспория, бруцеллез, в России применяются отечественные вакцины.

Главной составляющей стратегии производства ветеринарных вакцин для повышения конкурентности продукции является обеспечение их качества. Продукция российских компаний, не владеющих практикой применения международных стандартов, не может быть конкурентоспособной. Это приводит к потере внутреннего рынка.

В Российской Федерации и странах Евразийского экономического Союза, предпринимаются серьезные действия по гармонизации национальных нормативных требований с международными правилами и зарубежными контрольными системами в сфере производства иммунобиологических препаратов и контроля качества. В настоящее время нормативные документы Российской Федерации и Евразийского экономического союза установили единые требования к организации производства и контроля качества лекарственных средств для медицинского и ветеринарного применения. Требования GMP, предъявляемые к производству ветеринарных лекарственных препаратов, совпадают с таковыми, предъявляемыми к препаратам для медицинского применения (Директива 91/412/ЕЕС от 12.06.2013 г.). "Правила – 2013" (национальные правила GMP РФ) обязательны для выполнения содержащихся в них требований отечественными фармацевтическими, медицинскими и биологическими предприятиями. Это зафиксировано ФЗ-140 "О внесении изменений в Федеральный закон "Об

обращении лекарственных средств" от 4.06. 2018 г.

Утверждены 3.11.2016 г. "Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза" (№77), касающиеся требований к производству ветеринарных лекарственных средств, которые вводятся с 1 января 2021 г. Знаковыми являются решения о введении в действие Правил GDP (№ 80), а также принятие курса на выравнивание Фармакопеи Евразийского экономического союза с Фармакопеей ЕС [4].

В рамках этих документов активно развиваются направления, связанные с терминологией, разработкой и аттестацией стандартных образцов различного уровня, целью применения которых является количественное определение специфической активности препаратов и метрологических характеристик применяемых методов оценки показателей качества, стабильности, а также контроль вспомогательных веществ. Применение вспомогательных веществ и фармацевтических субстанций также регламентируется нормативной документацией: ГФ, ОФС, ФС, ФСП или отраслевыми стандартами [5].

В РФ стандартизация лекарственных средств, в том числе, биологических лекарственных препаратов основывается на Государственной Фармакопее (ГФ РФ), XIV издание которой, решает стратегические задачи обеспечения качества лекарственных средств, находящихся в обращении на отечественном фармацевтическом рынке, и их соответствия требованиям как российских, так и мировых стандартов.

Разработаны и введены в ГФ РФ XIV издания новые фармакопейные статьи, что связано с изменениями в 61-ФЗ "Об обращении лекарственных средств" (изменения к ФЗ от 22.12.2014 № 429), а ОФС 1.8.1.0002.15 "Имунобиологические лекарственные препараты" гармонизирована в связи с этими изменениями.

Стандартные образцы условно подразделяют на биологические и химические. Один и тот же стандартный образец в соответствии с указаниями фармакопейной статьи (или иной нормативной документации) может быть использован для физико-химических и для биологических анализов. Описание государственных стандартных образцов, использование которых предусмотрено в Российской Федерации, приведено в Государственной фармакопее РФ (раздел "Общие методы анализа"). Фармакопейным стандартным образцом является стандартный образец, произведенный в соответствии с фармакопейной статьей.

Более широкое родовое понятие "средство измерений" для стандартного образца сохранилось до настоящего времени в последней редакции ГОСТ 8.315-2019 [6].

Поскольку на настоящий момент существуют некоторые разночтения в терминологии, в практике предпочтительнее пользоваться Межгосударственным стандартом ГОСТ 8.315-2019. ВОЗ учреждает международные биологические стандарты для определения единиц активности биологических препаратов, обеспечивает биологические справочные материалы, с активностью в МЕ. Национальный институт стандартов и контроля биопрепаратов (NIBSC) является основной лабораторией сотрудничающей в этой области, производит >95% международно-признанных стандартов на биопрепараты.

Дальнейшее совершенствование и развитие различных направлений в иммунобиологии, иммунобиологических технологиях, базирующихся на стыке иммунологии и молекулярной биологии, а также генной инженерии и, как следствие этого, разработка новых ИБЛП требует развития и стандартизации этих лекарственных средств, гарантирующих их качество на всех этапах жизненного цикла.

Результаты

Работа выполнена в отделе обеспечения качества лекарственных средств для ветеринарии и животноводства ФГБНУ ВНИТИБП. В качестве предполагаемого кандидата в отраслевой стандартный образец (ОСО) выбрана эталонная (ретроспективная) серия сухой вакцины против Ньюкаслской болезни (НБ) штамма Ла-Сота. Для статисти-

ческого анализа результатов применены программные пакеты StatPlus/SPSS. Аттестация стандартного образца предусматривает установление значения аттестуемой характеристики стандартного образца и его неопределенности, оформление паспорта. Аттестуемой характеристикой СО вакцины может служить специфическая активность: антигенная активность (титр или концентрация вирусов) и показатели иммуногенных свойств, стабильность, содержание вспомогательных веществ, микробиологическая чистота и др. При разработке и аттестации СО должны быть показаны однородность материала – кандидата в СО, установленные условия хранения и срок годности.

Неопределенность аттестованной характеристики стандартного образца связана с результатом испытания и характеризует дисперсию значений, которые обоснованно могли бы быть приписаны измеряемой величине. Для эмпирических методов, которыми являются практически все методы испытаний биологических лекарственных средств, показана целесообразность оценки неопределенности методов испытаний биологических/иммунобиологических лекарственных средств по стандартному отклонению при оценке воспроизводимости методики [6, 7].

Получены следующие результаты:

1. Стандартизован метод определения антигенной активности вируса НБ эталонной серии. Рассчитана величина среднего значения титра вируса и среднеквадратичного отклонения, которая составила $(9,00 \pm 0,36) \text{ IgЭИД}_{50}/\text{мл}$.

2. Разработан алгоритм статистического анализа результатов определения иммуногенных свойств эталонной серии вакцины:

– обосновано необходимое и достаточное количество объектов (голов птицы) в группе – не менее 10;

– подтверждена взаимосвязь между величиной прививной дозы вакцины и показателями иммуногенности: уровнем специфических антител в сыворотке крови вакцинированной птицы ($r=0,948$) и степенью её защиты после контрольного заражения ($r=0,989$);

– статистически подтвержден линейный характер зависимости степени защиты вакцинированной птицы после контрольного заражения от уровня антител ($K3=21,4312+0,6732xAT$);

– с применением пробит-анализа рассчитаны величины ЭД_{50} и ЭД_{95} :

$\text{ЭД}_{50} = (4,146 \pm 0,189) \text{ Ig ЭИД}_{50}$ (StatPlus)

$\text{ЭД}_{50} = (4,158 \pm 0,187) \text{ Ig ЭИД}_{50}$ (SPSS)

$\text{ЭД}_{95} = (6,055 \pm 0,274) \text{ Ig ЭИД}_{50}$ (SPSS).

3. С применением программы StatPlus:

– разработана математическая модель процесса термоинактивации вируса НБ в вакцине, высушенной с различными стабилизаторами, которая показала, что величина константы скорости инактивации является количественной оценкой стабильности вакцины, а для ее расчета применимо уравнение Аррениуса;

– подтверждена адекватность модели по результатам ретроспективного анализа констант скоростей инактивации вируса в шести промышленных и двадцати шести опытно-промышленных сериях вакцины;

– разработанная модель применена для статистического обоснования характеристик вакцины: тест ускоренного старения "7 суток – 37°C"; оценка эффекта защиты стабилизатора; термодинамические параметры вакцины.

4. Статистически подтверждена правомерность использования теста ускоренного старения "7 суток – 37°C" для прогноза длительного хранения вакцины при 4–8°C в течение 12 мес. независимо от используемого стабилизатора.

5. Для сравнительной оценки эффекта защиты (Эз) различных стабилизаторов предложена формула $\text{Эз} = \Delta_{3C1} / \Delta_{3C2}$, где Δ_{3C1} и Δ_{3C2} – снижение титра активности вируса, высушенного в средах $3C_1$ и $3C_2$, соответственно. Рассчитан эффект защиты стабилизатора на основе гидролизата белка – ГБЛФ (по сравнению с обезжиренным молоком – ОМ), величина которого – 2,1 при 37°C.

6. Показана применимость уравнения Аррениуса для расчета термодинамических характеристик вакцины – энтальпия (ΔH), энтропия (ΔS) и свободная энергия (ΔG). Установлено, что введение стабилизатора в состав вакцины увеличивает (одинаково для ОМ и ГБЛФ) упорядоченность системы (уменьшение энтропийного фактора), не изменяя значений энтальпии и свободной энергии.

7. С использованием эталонной серии вакцины оценены неопределенности четырех методов: определения титра антигенной активности вируса НБ (8%); определения иммуногенных свойств вирусвакцины против НБ по титрам антител (22,6%) и результатам контрольного заражения (13,3%); исследования кинетики термоинактивации антигенной активности вируса НБ (17,6%).

8. Исследование однородности предполагаемого стандартного образца проведено в соответствии с Общей Фармакопейной Статьей "Однородность дозирования" – ОФС.1.4.2.0008.15 [5].

Установлено, что коэффициент вариации массы сухого вещества, по которому оценивали точность розлива, не превышал 2%, уровень остаточной влажности (не менее 3%), что является приемлемым для длительно хранящихся стандартных образцов.

Заключение

Работа посвящена решению важной научно-практической проблемы, направленной на развитие научных основ и прикладных аспектов биотехнологии. Определены и аттестованы показатели качества предполагаемого отраслевого стандартного образца (ОСО) вирусной вакцины ветеринарного назначения против ньюкаслской болезни, определены их метрологические характеристики. Для обеспечения эффективной работы на всех этапах аттестации характеристик и их неопределенностей применена программа StatPlus. В методическом плане результаты исследований могут быть полезны для разработчиков и производителей лекарственных средств для ветеринарии, а также использованы в образовательном процессе для студентов, обучающихся по специальности "Биотехнология".

Литература

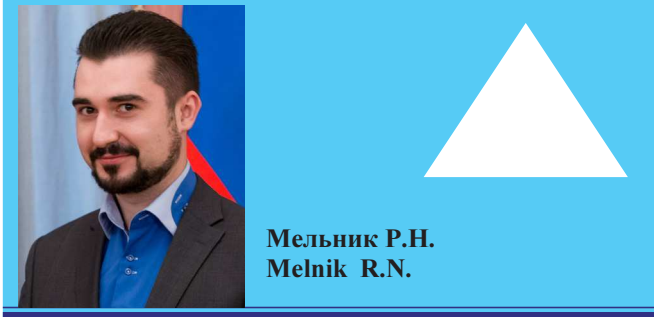
1. Гринь С.А., Пухова Н.М., Еремец В.И. и др. Вклад ФГБНУ ВНИТИБП в развитие отечественной биотехнологии и обеспечение ветеринарного благополучия // Ветеринария и кормление - 2020.-2. - С.4-8. DOI CrossRef: 10/30917/ATT-VK-1814-9588-2020-2-1.
2. http://pharmapf.ru/wp-content/uploads/2017/04/Osipova_1_G.pdf.
3. Биотехнология. Учебник. /А.Я. Самуйленко, Ф.И. Василевич, Е.С. Воронин, И.В. Тихонов и др. под ред. А.Я. Самуйленко. - М., 2013 - 746 с.
4. О Концепции гармонизации фармакопей государств - членов экономической комиссии. Коллегия Евразийской экономической комиссии. Решение от 22 сентября 2015 года N 119
5. ГФ РФ - XIV издание <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
6. ГОСТ 8.315-2019 Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения. Межгосударственный стандарт. 7. Волкова, Р.А. Проблемы оценки неопределенности методик испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов / Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина // Стандартные образцы в измерениях и технологиях: Сборник трудов II Междун. научн. конф., Екатеринбург, 2015. - Изд-во: ФГУП "Уральский научно-исследовательский институт метрологии" - 2015. - С.106-107.

References

1. Grin S.A., Pukhova N.M., Eremets V.I. and others. Contribution of FSBNU VNITIBP to the development of domestic biotechnology and ensuring veterinary well-being/Vetkorm.- 2020.-2. - С.4-8. 2. http://pharmapf.ru/wp-content/uploads/2017/04/Osipova_1_G.pdf.
3. Biotechnology Textbook. /A.Ya. Samuilenko, F.I. Vasilevich, E.S. Voronin, I.V. Tikhonov and others under the editorship A.Ya. Samuilenko. - M., 2013 - 746 c.
4. On the concept of harmonization of pharmacopoeia of the member states of the Eurasian Economic Union. Board of the evrasian economic commission. Decision of 22 September 2015 N 119
5. GF of the Russian Federation - XIV edition <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
6. Gost 8.315-2019 State system for ensuring uniformity of measurements. Standard samples of composition and properties of substances and materials. Main provisions. Interstate standard.
7. Volkova, R.A. Problems of assessing the uncertainty of immunobiological drug testing methods/R.A. Volkova, O.V. Fadeikin//Standard samples in measurements and technologies: Collection of works II Mezhdun. научн. conf., Yekaterinburg, 2015. - Publishing House: FSUE Ural research institute of metrology - 2015. - С.106-107.

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-11
УДК 619:636.5:616.9

Разработка и изготовление пуллорозного эритроцитарного диагностикума для диагностики пуллороза-тифа птиц



Мельник Р.Н.
Melnik R.N.

Мельник Р.Н. – кандидат биологических наук, заместитель директора, mromanos@mail.ru
Клюшенцева Н.С. – соискатель, nc-bond@mail.ru
Мельник Н.В. – доктор ветеринарных наук, профессор, ведущий научный сотрудник, mromanos@mail.ru
ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности" (141142, Московская область, городской округ Лосино-Петровский, пос. Биокомбината, vnitibp@mail.ru)

Ключевые слова: пуллороз-тифа птиц, эритроциты, фосфатно-буферный раствор, антиген, сенситин, осаждение, декантация.

Резюме. Статья посвящена проблемам диагностики пуллороза-тифа птиц и разработки технологии изготовления диагностикума против данного заболевания. Показан способ изготовления эритроцитарного диагностикума для диагностики пуллороза-тифа птиц, включающий получение бактериальной массы *Salmonella pullorum-gallinarum*, выделение из нее антигенной фракции обработкой бактериальной массы поверхностно-активным веществом с добавлением соды или щелочи в дистиллированной воде при 93–96 °С с последующей сенсibilизацией формализированных эритроцитов, их очисткой и получением целевого продукта в виде 10%-ной суспензии, отличающийся тем, что в качестве поверхностно-активного вещества для выделения антигенной фракции используют 1–1,5%-ный водный раствор Дезмола, взятого в конечной весовой концентрации 0,1–0,3%, а сенсibilизацию формализированных эритроцитов проводят в присутствии натриевой соли сукцината хитозана, взятой в конечной весовой концентрации 0,5–1,5%. При промышленном изготовлении диагностикума в начальной стадии бактериальную суспензию обязательно перемешивали и измеряли оптическую концентрацию фотометрически. Доводили концентрацию раствором ПАВ до 25 млрд микробных клеток в 1 мл. На второй стадии получали антиген-сенситин и хранили при 4 °С. Использовали для сенсibilизации эритроциты барана.

На третьей стадии получали 20% формализованные эритроциты барана. Формализованные эритроциты отмывали пять раз до полного просветления надосадочной

Development and manufacture of erythrocyte pullorosis diagnosticum for the diagnosis of avian pullorosis typhoid

R.N. Melnik, N.S. Klyushentseva, N.V. Melnik
FSBSI All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry (141142, Moscow Region, Losino-Petrovsky district, Biokombinata, tel.: +7 (496) 567-32-63, e-mail: vnitibp@mail.ru)

Key words: avian pullorosis typhoid, erythrocytes, phosphate-buffered saline, antigen, sensitin, sedimentation, decantation.

Abstract. The article is devoted to the problems of diagnostics of poultry typhoid fever and the development of a technology for the manufacture of diagnosticum against this disease. A method of making erythrocyte diagnosticum for the diagnosis of poultry typhoid fever is shown, including obtaining the bacterial mass of *Salmonella pullorum-gallinarum*, isolating the antigenic fraction from it by treating the bacterial mass with a surfactant with the addition of soda or alkali in distilled water at 93–96 °C, followed by sensitization of formalinized erythrocytes, their purification and obtaining the target product in the form of 10% suspension, characterized in that 1–1.5% aqueous solution of Desmol is used as a surfactant to isolate the antigenic fraction, taken in a final weight concentration of 0, 1–0.3%, and the sensitization of formalinized erythrocytes is carried out in the presence of the sodium salt of chitosan succinate taken in a final weight concentration of 0.5–1.5%.

In the industrial production of the diagnosticum at the initial stage, the bacterial suspension was necessarily mixed and the optical concentration was measured photometrically. The concentration of the surfactant solution was adjusted to 25 ml of microbial cells in 1 ml. At the second stage, antigen-sensitin was obtained and stored at 4 °C. Sheep erythrocytes were used for sensitization. At the third stage, 20% formalized ram erythrocytes were obtained. Formalized erythrocytes were washed five times until the supernatant was completely cleared and sensitized.

At the fourth stage, 300–500 ml was added to 1 liter of erythrocyte suspension for sensitization. sensitin and kept in a water bath at a temperature of 60 °C.

At the fifth stage, the sensitized erythrocytes were washed to remove residual sensitin not associated with erythrocytes.

Obtaining highly effective erythrocyte diagnostics for the diagnosis of avian pullorosis typhoid is an urgent problem. We have produced, improved and optimized the technology of industrial production of erythrocyte pullor antigen from the *Salmonella pullorum-gallinarum* strain for the diagnosis of avian pullorosis-typhus. We have theoretically substantiated and tested in production conditions a new method of resuspension, extraction, clarification of the bacterial mass. Used surfactants (surfactants) to obtain sensitin.

жидкостью и подвергали сенсibilизации.

На четвертой стадии для сенсibilизации к 1 литру взвеси эритроцитов добавляли 300–500 мл. сенситина и выдерживали в водяной бане при температуре 60 °С.

На пятой стадии – проводили промывку сенсibilизированных эритроцитов от остаточного сенситина не связанного с эритроцитами.

Для цитирования / For citation

Мельник Р.Н. Разработка и изготовление пуллорозного эритроцитарного диагностикума для диагностики пуллороза-тифа птиц // Ветеринария и кормление. - 2021. - № - С.38–41.

Development and manufacture of erythrocyte pullorosis diagnosticum for the diagnosis of avian pullorosis typhoid / R.N. Melnik // Veterinaria i kormlenie. - 2021. - No. - P.38–41.

Получение высокоэффективных эритроцитарных диагностикумов для диагностики пуллороза-тифа птиц является актуальной проблемой. Нами произведена, усовершенствована и оптимизирована технология промышленного производства пуллорного эритроцитарного антигена из штамма *Salmonella pullorum-gallinarum* для диагностики пуллороза-тифа птиц. Нами теоретически обоснован и опробирован в условиях производства новый метод ресуспендирования, экстрагирования, осветления бактериальной массы. Использовали поверхностно-активные вещества (ПАВ) для получения сенситина.

Введение

эритроциты млекопитающих и птиц широко используются в вирусологических, иммунологических исследованиях для постановки РСК, РГА, РТГА в качестве основы для создания эритроцитарных диагностикумов (антительных и антигенных) и для других целей в частности, к способам получения диагностических препаратов, используемых для массовой прижизненной диагностики пуллороза тифа птиц.

Пуллороз – инфекционное заболевание птиц, вызываемое *Salmonella pullorum-gallinarum*.

Методы диагностики

Диагноз устанавливают на основании эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений, результатов лабораторных исследований. Получение клеток крови является несложным процессом. Однако, срок хранения нативных эритроцитов очень мал (3–7 дней), что приводит к необходимости постоянно содержать животных-доноров крови, а также – к получению нестандартных, нестабильных результатов при учете реакции.

Существуют методы, позволяющие стабилизировать и длительное время сохранять необходимые для исследователей свойства эритроцитов: агглютинирующие и поверхностно-адсорбционные способности клеток. Одним из возможных методов для достижения данной цели является фиксация эритроцита, его мембраны различными реагентами, чаще всего альдегидами алифатического ряда: формальдегид, глутаровый и акриловый альдегиды и др. Возможность применения для постановки РГА эритроцитов, фиксированных формальдегидом. Срок хранения которых достигает до 1 года, показал Flick J.A. (1948). В дальнейшем работы в этом направлении были продолжены рядом авторов, которыми показано, что фиксирование клеток по-разному влияет на рецепторы одних и тех же эритроцитов к различным вирусам. При этом была выявлена избирательная специфичность рецепторов красных клеток к вирусам и бактериям. Это потребовало отработки метода фиксации в каждом конкретном случае диагностики. Так для постановки РГА с вирусом инфекционной анемии (ИНАН) или парагриппа крупного рогатого скота используют эритроциты морской свинки и лошади, бешенства – гуся; ньюкаслской болезни – петуха, некробактериоз животных – эритроциты барана (эритроциты этих животных могут со-

храняться при +4°C в течении 7–10 дней в физиологическом растворе и до 25 дней в специальных растворах. Однако, существующие методы получения стандартных, стабильных препаратов жидких фиксированных эритроцитов отработаны недостаточно полно, требуют усовершенствования и унификации. Кроме того, более перспективным и прогрессивным является приготовление сухих препаратов эритроцитов. [1,2]

Целью данного исследования являлось усовершенствование производственной технологии изготовления эритроцитарного диагностикума для прижизненной диагностики пуллороза-тифа птиц.

Материалы и методы

Работа выполняется в отделении противобактериальных препаратов в ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности" и ФКП "Щелковский биокомбинат" в рамках задания Российской научно-технологической программы фундаментальных и приоритетных и прикладных исследований по научному обеспечению АПК РФ по теме "Разработать технологии изготовления и применения новых диагностических тест-систем, средств профилактики и иммунокоррекции наиболее распространенных и экономически значимых инфекционных болезней животных на основе современного оборудования и биотехнологических процессов".

В процессе работы изготовлено 34 опытно-промышленных серии сухих эритроцитов животных (барана, лошади, морской свинки, белой мыши, гуся, петуха), которые испытывались на стабильность при повышенных температурах (тест повышенного старения при 37°C) и в процессе длительного хранения при +4°C. Установлено, что большинство образцов серий сухих препаратов эритроцитов сохраняли активность и специфичность на протяжении 12–27 месяцев хранения при +4°C. Более стабильными являлись эритроциты фиксированные формальдегидом. Стабильность эритроцитов также варьировала в зависимости от вида животного – донора. Так более стабильными являлись эритроциты барана (срок годности 2,5 и более лет) и менее стабильными были эритроциты морской свинки и петуха (срок годности от 12 до 18 месяцев).

В таблице 1 показан оптимальный режим фиксации эритроцитов различных видов животных. (Морских свинок, лошадей, баранов, белых мышей, гусей, кур).

Нами произведена, усовершенствована и оптимизирована технология промышленного производства пуллорного эритроцитарного антигена из штамма *Salmonella pullorum-gallinarum* для диагностики пуллороза-тифа птиц. Был теоретически обоснован и апробирован в условиях производства новый метод ресуспендирования, экстрагирования, осветления бактериальной массы *Salmonella pullorum-gallinarum* при производстве пуллорного эритроцитарного антигена с использованием поверхностно-активного вещества (ПАВ). [4]

Таблица 1 Оптимальный режим фиксации эритроцитов различных видов животных

Table 1 Optimal mode of fixation of red blood cells of various animal species

№	Животные доноры	Фиксирующий реагент	Оптимальный режим фиксации		
			Концентрация % (конечная)	Время, час	Температура
1	Морская свинка	Формальдегид ИГЛА	2,5	48	+20
			0,75-1,1	24-48	+20
2	Лошадь	Формальдегид ИГЛА	1,26	24-48	+20
			0,3	16-32	+20
3	Баран	ИГЛА	0,5-0,75	24-48	+20
4	Белая мышь	Формальдегид ИГЛА	2,5	48	+20
			0,1-0,2	2-4	+20
5	Гусь	Формальдегид	1,5-2,5	18-20	+37,5
6	Петух		1,5-2,5	18-20	+37,5

Результаты исследования

Получение высоко эффективных эритроцитарных диагностикомов для диагностики пуллороза-тифа птиц является актуальной проблемой.

Промышленное производство диагностикума по его изготовлению подразделяется на стадии: ресуспендирование бактериальной массы; получение антигена-сенситина; получение 20% формализованных эритроцитов барана; сенсibilизация 20% эритроцитов барана; приготовление промышленных серий пуллорного эритроцитарного антигена; фасовка. [3]

Ресуспендирование. В стерильном боксе при соблюдении условий стерильности производили съем бактериальной массы с ротора центрифуги в стерильную металлическую емкость гомогенизатора. Собранную бактериальную массу ресуспендировали с помощью 0,1% раствора поверхностно-активного вещества (ПАВ). Для этого в емкость добавляли небольшое количество ПАВ, устанавливали на мешалку гомогенизатора. Бакмассу гомогенизировали в течение 2–3 минут при скорости вращения 3–8 тысяч оборотов в минуту.

Гомогенизованную бактериальную суспензию перекачивали в бутыль с 10 дм³ раствора ПАВ.

Получение антигена-сенситина. Полученную бактериальную суспензию тщательно перемешивали, измеряли оптическую концентрацию фотометрически. Доводили концентрацию раствором ПАВ до 25 млрд, микробных клеток в 1 мл. С соблюдением условий стерильности перекачивали в стерильные конические колбы. Экстрагировали в водяной бане в течение 1 часа при температуре 93–96°C. Охлаждали, сливали в чистый стерильный реактор с соблюдением стерильности и подвергали центрифугированию на центрифуге. Фугат собирали в стерильные конические колбы, прогревали в водяной бане в течение 1 часа при температуре 93–96°C. Охлаждали и фильтровали через марлевый фильтр с соблюдением условий стерильности в бутыли емкостью 18 дм³, закрывали резиновыми стерильными пробками. Хранили при 4°C, использовали для сенсibilизации эритроциты баранов.

Клеточный дейтрит, собранный в ротор центрифуги заливали 6%-ным раствором перекиси водорода и утилизировали.

Получение 20%-ных формализованных эритроцитов баранов. Кровь брали из яремной вены баранов-доноров с живой массой 40–60 кг 1 раз в месяц по 500 мл от каждого барана в литровые флаконы со стерильным формализованным раствором Олсвера. Соотношение крови и раствора Олсвера должно быть 1:1. Тщательно перемешивали, охлаждали, транспортировали с соблюдением осторожности.

В стерильном боксе полученную кровь фильтровали через стерильный марлевый фильтр с соблюдением условий стерильности в стерильные стеклянные бутыли, емкостью 18 дм³, закрывали резиновой пробкой. Оставляли на отстаивание в течение 10 дней. Далее с соблюдением условий стерильности, надосадочную жидкость откачивали с помощью стерильных силиконовых трубочек (стерилизованных при 1 атм 40 минут.) К осадку эритроцитов приливали небольшое количество формализованного буферного раствора, ресуспендировали, доводили объем формализованным буферным раствором до первоначального. Оставляли на отстаивание в течение 10 дней. Отмывку повторяли пять раз до полного просветления надосадочной жидкости. Полученные формализованные эритроциты доводили до концентрации 20% и подвергали сенсibilизации.

Сенсibilизация 20% эритроцитов барана. 20% взвесь формализованных эритроцитов барана отмывали от остаточного формалина фосфатно-буферным раствором с рН 7,0–7,4. Для сенсibilизации к 1 литру взвеси эритроцитов добавляли по 300–350 мл сенситина. Смесь тщательно

перемешивали и выдерживали в водяной бане в течении 60 минут при температуре 55–60 °С, а затем еще в течении 2 часов при температуре 40–42 °С. После окончания процесса сенсibilизации проводили отмывку эритроцитов от сенситина, несвязанного с эритроцитами. Отмывку проводили формализованным фосфатно-буферным раствором методом отстаивания до полного просветления надосадочной жидкости.

Приготовление серии пуллорного эритроцитарного антигена. 20%-ные формализованные сенсibilизированные эритроциты барана ресуспендировали через стерильный марлево-бязевый фильтр с соблюдением условий стерильности в стерильные бутыли емкостью 18 дм³, АБ 2, закрывали резиновыми пробками. Отбирали пробы из каждой бутыли для определения концентрации эритроцитов. Для этого в центрифужные пробирки вносили по 10 мл антигена. Пробирки уравнивали, центрифугировали в течении 5 минут при 2000 об/мин на центрифуге Ц 1. Надосадочную жидкость аккуратно переливали в мерный цилиндр 10 см³, определяли количество. Концентрацию эритроцитов в процентах вычисляли по формуле:

$$K = \frac{V - VI}{V} * 100\%$$

K – концентрация эритроцитов;

V – количество антигена, налитое в центрифужную пробирку, см³;

VI – количество надосадочной жидкости, см;

Далее профильтрованный антиген доводили формализованным буферным раствором до концентрации эритроцитов 10+1% с соблюдением условий стерильности. Отбирали пробу из каждой бутыли для определения концентрации эритроцитов. Приготовленный антиген выдерживали в термостате при 37 °С 24 часа. Далее антиген с соблюдением условий стерильности перекачивали в стерильные бутыли емкостью 18 дм³ и передавали на расфасовку в цех сублимационной сушки. [5,6]

Заключение

1. В результате проведенных исследований, лабораторных и производственных испытаний разработана технология изготовления лиофилизированных препаратов эритроцитов различных видов животных.

2. Установлено, что изготовленные по разработанной технологии сухие препараты эритроцитов животных сохраняют активность и специфичность в течении 12–30 месяцев хранения при +4°C.

3. Усовершенствована технология изготовления эритроцитарного диагностикума для диагностики пуллороза-тифа птиц, включающая получение бактериальной массы *Salmonella pullorum-gallinarum*, выделение из нее антигенной фракции обработкой бактериальной массы поверхностно-активным веществом с добавлением соды или щелочи в дистиллированной воде при 93–96°C с последующей сенсibilизацией формализованных эритроцитов, их очисткой и получением целевого продукта в виде 10%-ной суспензии, отличающийся тем, что в качестве поверхностно-активного вещества для выделения антигенной фракции используют 1–1,5%-ный водный раствор Дезмола, взятого в конечной весовой концентрации 0,1–0,3%, а сенсibilизацию формализованных эритроцитов проводят в присутствии натриевой соли сукцината хитозана, взятой в конечной весовой концентрации 0,5–1,5%.

4. По результатам исследования получен патент на изобретение №2685413 от 18.04.2019г. "Способ изготовления эритроцитарного диагностикума для диагностики пуллороза-тифа птиц".

Литература

1. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: учеб. для студентов вузов, обучающихся по мед. специальностям / Л. Б. Борисов. - изд. 4-е, доп. и переработ. - М.: Мед. информ. агентство (МИА), 2005 (ОАО Тип. Новости). - 734 с.: ил., портр.; 21 см. -

(Учебная литература для студентов медицинских вузов); ISBN 5-89481-278-X.

2. Медицинская вирусология: руководство / [Д. К. Львов]; под ред. Д. К. Львова: Гос. учреждение "Научно-исследовательский ин-т вирусологии им. Д. И. Иванковского" РАМН, Московская мед. акад. им. И. М. Сеченова, Медико-профилактический фак. последипломного проф. образования. - Москва: Мед. информ. агентство (МИА), 2008. - 655 с. : ил., табл.; 24 см.; ISBN 5-89481-564-9.

3. Медицинская и санитарная микробиология: учебное пособие по микробиологии, вирусологии, иммунологии для студентов медицинских вузов / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Ширококов. - 3-е изд., стер. - Москва: Академия, 2008. - 461, [1] с., [8] л. цв. ил. : ил., табл.; 21 см. - (Высшее профессиональное образование. Медицина) (Учебное пособие); ISBN 978-5-7695-5081-2.

4. Основы биотехнологии ветеринарных препаратов: Учеб. пособие: [Для вузов по специальности 310800 "Ветеринария"] / И. К. Тутов, В. И. Ситков. - Ставрополь: Ставроп. госсельхозакадемия, 1997. - 250, [1] с.: ил.; 20 см.

5. Биотехнология [Текст]: учебник для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям 310700 - Зоотехния и 310800 - Ветеринария / [А. Я. Самуйленко и др.]; под ред. А. Я. Самуйленко. - 2-е изд., перераб. - Москва: [б. и.], 2013. - 746 с. : ил., табл.; 25 см.; ISBN 978-5-89904-017-7

6. Самуйленко А.Я., Гринь С.А., Мельник Н.В., Мельник Р.Н., Ключкина В.И., Майстренко Е.С., Суский Е.В., Литенкова И.Ю., Ключинцева Н.С., Ярцев С.Н. Способ изготовления эритроцитарного диагностикума для диагностики пуллороза-тифа птиц // Патент на изобретение RU 2685413, 18.04.2019. Заявка № 2018113403, 13.04.2018.

References

1. Medical microbiology, virology, immunology: textbook. for university students enrolled in med. specialties / LB Borisov. - ed. 4th, additional and revised. - M.: Med. inform. agency (MIA), 2005 (JSC Type. News). - 734 p. : ill., portr. ; 21 cm. - (Educational literature for medical students) ; ISBN 5-89481-278-X.

2. Medical virology: manual / [D. K. Lvov]; ed. D.K. Lvova: State. DI Ivanovsky Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow med. acad. I. M. Sechenov, Medical and preventive faculty. postgraduate prof. education. - Moscow: Med. inform. agency (MIA), 2008. -- 655 p. : ill., table; 24 cm; ISBN 5-89481-564-9.

3. Medical and sanitary microbiology: a textbook on microbiology, virology, immunology for students of medical universities / A. A. Vorobiev, Yu. S. Krivoshein, V. P. Shirobokov. - 3rd ed., Erased. - Moscow: Academy, 2008. - 461, [1] p., [8] p. color silt : ill., table; 21 cm - (Higher professional education. Medicine) (textbook) ; ISBN 978-5-7695-5081-2.

4. Fundamentals of biotechnology of veterinary drugs: Textbook. allowance: [For universities in the specialty 310800 "Veterinary medicine"] / IK Tutov, VI Sitkov. - Stavropol: Stavropol. State Agricultural Academy, 1997. - 250, [1] p. : ill. ; 20 cm.

5. Biotechnology [Text]: a textbook for students of higher educational institutions studying in the specialties 310700 - Zootechnics and 310800 - Veterinary medicine / [A. Ya. Samuilenko and others]; ed. A. Ya. Samuilenko. - 2nd ed., Rev. - Moscow: [b. and.], 2013. - 746 p. : ill., table; 25 cm; ISBN 978-5-89904-017-7

6. Samuilenko A.Ya., Grin S.A., Melnik N.V., Melnik R.N., Klyukina V.I., Maistrenko E.S., Suskiy E.V., Litenkova I.Yu., Klyushintseva N.S., Yartsev S.N. Method for the manufacture of erythrocyte diagnosticum for the diagnosis of poultry typhoid fever // Patent for invention RU 2685413, 18.04.2019. Application No. 2018113403, 13.04.2018.

Пресс-релиз/ Press-release

К ответственности привлечены молокоперерабатывающие предприятия

В Московской области за нарушения требований ветеринарного законодательства РФ к ответственности привлечены молокоперерабатывающие предприятия

В декабре 2020 года Управлением Россельхознадзора по городу Москва, Московской и Тульской областям по результатам мониторинга событий, размещенных в системе раннего оповещения "Сирано", проведены проверки молокоперерабатывающих предприятий Московской области (ООО "Айсберг Плюс", ООО "Модус", АО "Озерецкий молочный комбинат", ООО "АМК", ООО "Лав Продукт").

В результате проверок Управлением Россельхознадзора выявлены нарушения требований закона РФ "О ветеринарии", технических регламентов "О безопасности пищевой продукции" и "О безопасности молока и молочной продукции", действующих на территории ЕАЭС, Ветеринарных правил организации работы по оформлению ветеринарных сопроводительных документов, порядка оформления ветеринарных сопроводительных документов в электронной форме и порядка оформления ветеринарных сопроводительных документов на бумажных носителях:

- обнаружение в продукции данных производителей антибиотиков, консервантов микробиологической контаминации;
- несоблюдение ветеринарно-санитарных требований, предъявляемых к производственным помещениям, оборудованию и инвентарю, используемым в производстве, исключаящих загрязнение пищевой продукции.

Кроме того, при анализе в системе "Меркурий" Управлением Россельхознадзора установлено, что ООО "Лав Продукт" путем оформления актов о расхождении по количеству и качеству товарно-материальных ценностей ввело в оборот свыше 4,5 тыс. тонн продукции неизвестного происхождения. ООО "АМК" путем переработки продукции других производителей, расфасованной в потребительскую упаковку, увеличивало срок годности выпускаемого масла сливочного на несколько месяцев.

В январе 2021 года Управлением Россельхознадзора молокоперерабатывающие предприятия Московской области привлечены к административной ответственности по ч. 1 и ч. 2 ст. 14.43, ч. 1 ст. 10.6 КоАП РФ в виде наложения административных штрафов на сумму 12,1 млн рублей.

Содержание в молоке остаточных антибиотиков

В Тамбовской области Управлением Россельхознадзора оштрафован недобросовестный производитель за содержание в молоке остаточных антибиотиков

Управлением Россельхознадзора по Рязанской и Тамбовской областям в рамках пищевого мониторинга, а также в целях контроля безопасности пищевой продукции в социальных учреждениях Тамбовской области в августе 2020 года был осуществлен отбор проб молочной продукции в ТОГБУ «Центр поддержки семьи и помощи детям им. Г.В. Чичерина» в Инжавинском районе Тамбовской области.

В соответствии с поступившим протоколом испытаний подведомственного Службе ФГБУ «Белгородская МВЛ» в молоке производства ООО «ЛЕБЕДЯНЬМОЛОКО» (Липецкая область) обнаружено остаточное содержание антибиотика – спирамицина.

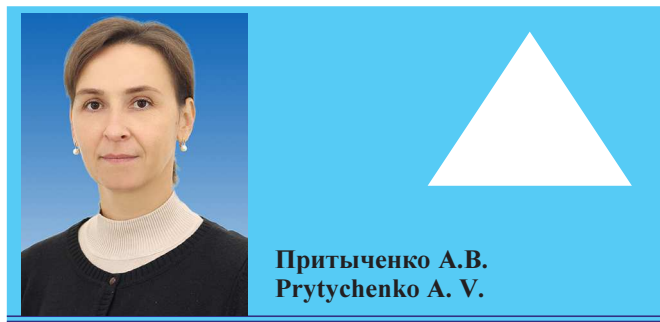
ООО «ЛЕБЕДЯНЬМОЛОКО» допустило нарушения требований технических регламентов ЕАЭС «О безопасности пищевой продукции» и «О безопасности молока и молочной продукции».

В январе 2021 года недобросовестный производитель привлечен Управлением Россельхознадзора к административной ответственности, предусмотренной ч. 2 ст. 14.43 КоАП РФ с назначением наказания в виде штрафа в размере 300 тыс. рублей.

По материалам Россельхознадзора

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-12
 УДК:619:616.98:[578.825.15+578.833.31+578.831.31+578.831.9]:615.371

Подбор адъювантов при конструировании инактивированной вакцины против респираторных инфекций КРС



Притыченко А.В.
Prytychenko A. V.

¹Притыченко А.В., кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры эпизоотологии

¹Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой эпизоотологии и инфекционных болезней животных
 ORCID ID: 0000-0002-4641-4757

²Еремец Н.К., кандидат биологических наук, доцент, заведующий отделом обеспечения качества лекарственных средств для животных;

²Провоторова О.В., кандидат технических наук, старший научный сотрудник отдела обеспечения качества лекарственных средств для животных

¹УО "Витебская ордена "Знак Почёта" государственная академия ветеринарной медицины", г. Витебск, e-mail: vit.nauka@gmail.com

²ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности" г.Щелково, email: vnitibp@mail.ru

Ключевые слова: респираторные болезни, коровы, вакцина, адъюванты, антигенная активность.

Резюме. Инфекционные болезни молодняка сельскохозяйственных животных представляют собой серьёзную проблему для животноводческой отрасли. Современная промышленная технология содержания животных, способствующая возникновению вирусных болезней, часто приводит к снижению иммунологической реактивности их организма, из-за недоразвитости иммунной системы молодняка (первичный иммунодефицит), пищевых токсикозов, недостаточного и несбалансированного по различным компонентам кормления, а также воздействия стресс-факторов присущих промышленной технологии – безвыгульного содержания животных, транспортировки, изменения микроклимата, формирования больших групп животных, малый фронт кормления, интенсивная эксплуатация. Эти факторы отрицательно воздействуют на иммунную систему и обменные процессы, что приводит к значительному снижению их устойчивости к инфекционным заболеваниям. В свою очередь возбудители вирусных респираторных

Selection of adjuvants in the design of an inactivated vaccine against respiratory infections of cattle

¹Prytychenko A. V., ¹Krasochko P.A.,
²Eremets N.K., ²Provotorova O.V.

¹Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus, e-mail: vit.nauka@gmail.com

²FSBSI All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry, Shchelkovo, email: vnitibp@mail.ru

Key words: respiratory diseases, cows, vaccine, adjuvants, antigenic activity.

Abstract. Infectious diseases of young farm animals are a serious problem for the livestock industry. Modern industrial technology of keeping animals, contributing to the emergence of viral diseases, often leads to a decrease in the immunological reactivity of their body, due to the underdevelopment of the immune system of young animals (primary immunodeficiency), food toxicosis, insufficient and unbalanced in various components feeding, as well as the impact of stress factors inherent in industrial technology – rearing animals, transportation, microclimate changing, forming large groups of animals, small feeding area, intensive exploitation. These factors negatively affect the immune system and metabolic processes, which leads to a significant decrease in their resistance to infectious diseases. In turn, the causative agents of viral respiratory diseases inhibit the cellular and humoral components of the immune system. Epizootological monitoring shows that viruses of infectious rhinotracheitis, viral diarrhea, parainfluenza-3 and respiratory syncytial infection in cattle are the main cause of pathological processes in respiratory diseases of young animals. Animal specific prophylactic methods are effective in preventing infectious diseases. Immunization of a pregnant herd promotes the birth of young animals with a full-fledged immune system. In mixed infections, it is difficult to determine the leading role of a particular infectious agent, therefore the most effective method for preventing such diseases is associated vaccines. In the process of designing a vaccine, the selection of antigens and an adjuvant is of great importance, contributing to the formation of a specific and long-term immunity. We studied the comparative efficacy of adjuvants and the antigenic activity of the selected viral strains of infectious rhinotracheitis, viral diarrhea, parainfluenza-3 and respiratory syncytial infection of cattle. The dynamics of biosynthesis of antiviral antibodies after immunization in cows were determined.

болезней угнетают клеточные и гуморальные звенья иммунной системы. Эпизоотологический мониторинг показывает, что вирусы инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота являются ведущими в развитии патологического процесса при респираторных заболеваниях молодняка. Специфическая профилактика животных является эффективным методом предотвращения инфекционных заболеваний. Иммунизация стельного стада способствует рождению молодняка с полноценной иммунной системой. При смешанных инфекциях трудно определить ведущую роль того или иного инфекционного

Для цитирования / For citation

Притыченко А.В. Подбор адъювантов при конструировании инактивированной вакцины против респираторных инфекций КРС / А.В. Притыченко // Ветеринария и кормление. - 2021. - №1 - С. 42-44.

Prytychenko A. V. Selection of adjuvants in the design of an inactivated vaccine against respiratory infections of cattle / +A.V. Prytychenko // Veterinaria i kormlenie. - 2021. - №1. - P. 42-44.

агента, поэтому наиболее эффективным средством профилактики таких болезней являются ассоциированные вакцины. В процессе конструирования вакцины важное значение приобретает подбор антигенов и адъюванта, способствующих формированию напряжённого и продолжительного иммунитета. Нами были проведены исследования по подбору адъюванта, определению антигенной активности вирусов инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и оптимальных доз при конструировании инактивированной ассоциированной вакцины. Исследования проводили на морских свинках и крупном рогатом скоте. Определена сравнительная эффективность адъювантов и изучена антигенная активность подобранных штаммов вирусов инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота, выявлена динамика биосинтеза противовирусных антител после иммунизации коров.

Введение

Проблема борьбы с респираторными болезнями молодняка крупного рогатого скота, вызываемыми вирусами инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и респираторно-синцитиальной инфекции и другими возбудителями остаётся актуальной. Наиболее эффективным методом защиты от инфекционных заболеваний является специфическая профилактика животных. Иммунизация стельного стада способствует рождению молодняка с полноценной иммунной системой. Новорождённый телёнок, полученный от вакцинированной матери, при условии своевременной выпойки ему молозива, приобретает колостральный иммунитет. Однако, количество колостральных антител к 2-х месячному возрасту значительно снижается, и телёнок подвергается риску заражения. Таким образом, наряду с вакцинацией стельных коров необходимо проводить иммунизацию молодняка [1, 2].

При конструировании вакцины важное значение приобретает подбор антигенов

и адъюванта, способствующего формированию напряжённого и продолжительного иммунитета. В этой связи нами были проведены исследования по подбору адъюванта, определению антигенной активности вирусов инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и оптимальных доз при конструировании инактивированной вакцины.

Материалы и методы исследования

Исследования были проведены в условиях клиники кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней и НИИ ПВМ и Б УО ВГАВМ, а также СРДУП "Улишицы-Агро" Городокского района Витебской области. На первом этапе исследований проводили подбор адъюванта. При конструировании вакцины были использованы 2 вида масляных адъювантов - Montanide ISA 15 и ISA 25 ("Seppic" Франция). Адъювант ISA 15 использован в дозе 15% от количества антигена, а ISA 25 - 25%. Для проведения исследований было сформировано 3 группы морских свинок по 4 головы в группе. Животным вводили внутримышечно двукратно с интервалом в 21 день по 0,5 см³ вакцины опытной группы №1 с адъювантом ISA 15, опытной группе № 2 с адъювантом ISA 25, третья группа - контроль. У морских свинок была взята кровь

Таблица 1. Титры антител у лабораторных животных после введения инактивированной вакцины против ИРТ, ВД, ПГ-3, РСИ с различными адъювантами
Table 1. Antibody titers in laboratory animals after administration of an inactivated vaccine against IBR, VD, PI-3-virus, RSI with various adjuvants

Вирус	Montanide ISA 15 (15%)		Montanide ISA 25 (25%)	
	До иммунизации	Через 21 день	До иммунизации	Через 21 день
ИРТ	1,0±0,1	5,2±0,2	1,0±0,1	4,8±0,2
ВД	1,0±0,1	5,6±0,3	1,0±0,1	5,0±0,3
ПГ-3	1,0±0,1	4,6±0,3	1,0±0,1	4,0±0,3
РСИ	1,0±0,1	3,6±0,3	1,0±0,1	3,0±0,3
Контроль	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1

Таблица 2. Результаты определения титров антител после введения различного объёма инактивированной вакцины против ИРТ, ВД, ПГ-3, РСИ
Table 2. Results of determining antibody titers after administration of various volumes of inactivated vaccines against IBR, VD, PI-3-virus, RSI

Группа №	Антиген	Объём вакцины, см ³	Титр антител (log ₂)		
			до введения вакцины	21 день после введения	45 день после введения
Опытная № 1	инфекционный ринотрахеит	2,5	2,1±0,2	2,9±0,2	5,4±0,6
Опытная № 2		5,0	2,0±0,1	3,2±0,3	5,6±0,4
Опытная № 3	вирусная диарея	2,5	2,0±0,2	3,1±0,4	4,6±0,2
Опытная № 4		5,0	2,1±0,1	3,3±0,4	4,9±0,4
Опытная №5	парагрипп-3	2,5	2,5±0,2	3,9±0,4	4,9±0,4
Опытная №6		5,0	2,4±0,1	4,3±0,2	5,1±0,1
Опытная №7	респираторно-синцитиальная инфекция	2,5	2,2±0,4	3,8±0,2	4,6±0,5
Опытная №8		5,0	2,5±0,4	3,9±0,4	4,7±0,6
Контрольная группа	инфекционный ринотрахеит	-	1,2±0,12	1,4±0,18	1,2±0,12
	вирусная диарея	-	1,4±0,23	1,6±0,18	1,6±0,12
	парагрипп-3	-	1,0±0	1,4±0,11	1,2±0,12
	респираторно-синцитиальная инфекция	-	0,8±0,1	1,0±0,23	1,2±0,06

Таблица 3. Динамика биосинтеза противовирусных антител коров после иммунизации коров
Table 3. Dynamics of antiviral antibodies biosynthesis in cows after immunization

Вирус	Дни исследования			
	до иммунизации	14 дней	21 день	60 дней
	коровы			
ИРТ	71,19±12,74	8,54±1,04	14,14±3,60	56,44±23,89
ВД	0,78±0,21	1,01±0,10	0,86±0,23	1,05±0,24
ПГ-3	57,72±4,38	86,37±1,92	94,20±4,83	58,90±8,08
РСИ	1,00±0,18	1,12±0,02	1,20±0,06	1,15±0,03

до введения вакцины и через 21 день. В сыворотке крови определён титр противовирусных антител в РНГА.

На втором этапе исследований изучали антигенную активность вирусов инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции на коровах. Титр компонентов ИРТ, ВД и ПГ-3 доводили до 5,0 lg ТЦД₅₀/мл, титр РСИ - до 4,5 lg ТЦД₅₀/мл. Сформировали 9 групп коров по 10 голов в каждой. Животным вакцину вводили внутримышечно в область крупы в объёме 5,0 и 2,5 см³ двукратно с интервалом 21 день. Контрольным животным биопрепараты не вводились. За животными вели наблюдение (термометрия, клинический осмотр, оценка продуктивности). У коров была взята кровь до иммунизации, через 21 и 45 дней после иммунизации. В сыворотках крови титр антител определяли в реакции РНГА, а также изучали динамику противовирусных антител.

Результаты и обсуждение

В предварительных опытах при подборе штаммов для конструирования вакцины поливалентной инактивированной культуральной против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции были использованы авирулентные вакцинные штаммы вирусов ИРТ (КМИЭВ V-123), ВД (КМИЭВ-V120), парагриппа-3 (КМИЭВ-V124), РС-вирус (РСВ+). Основанием для выбора штамма служила их инфекционная активность. Для накопления вирусной массы вакцинных штаммов использовали перевиваемую культуру клеток почки эмбриона телёнка MDBK. Оптимальным инактивантом является теоропин. В процессе подбора соотношений компонентов за основу были взяты ранее проведённые нами исследования, которые установили их равное соотношение 1:1:1:1. При этом титр вирусов ИРТ, ВД, ПГ-3 должен быть не менее 5,0 lg ТЦД₅₀/мл, вируса РС - не менее 4,5 lg ТЦД₅₀/мл.

Результаты подбора адьювантов при конструировании поливалентной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции представлены в таблице 1.

Итоги исследования свидетельствуют о том, что для изготовления вакцины целесообразно использовать адьювант Montanide ISA 15 в концентрации 15%. При конструировании поливалентной инактивированной культуральной вакцины против ИРТ, ВД, ПГ-3 и РСИ крупного рогатого скота были отработаны оптимальные дозы компонентов вирусов на коровах (таблица 2). Представленные данные демонстрируют максимальное возрастание титров антител после введения монокомпонентов вакцины в дозе 5 см³. После введения коровам экспериментального образца вакцины против респираторных вирусных инфекций не выявлено общих и местных изменений в клиническом состоянии животных, аллергических реакций не установлено. Аппетит был сохранён, продуктивность коров не снижалась. На месте введения компонентов болезненность и воспалительная реакция не определялась. Представленные в таблице 3 результаты показывают, что у иммунизированных животных отмечается выраженный иммунный ответ на введение вакцины ко всем вирусам, входящих в состав биопрепарата.

Выводы и перспектива дальнейших исследований

Таким образом, проведённые исследования по разработке поливалентной инактивированной культуральной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота показали, что введение препарата не вызывает общих и местных изменений в клиническом состоянии животных, аллергических реакций, не снижает продуктивности коров, способствует выработке противовирусных антител в достаточно высоких титрах, создавая напряжённый поствакцинальный иммунитет у иммунизированных животных.

Литература

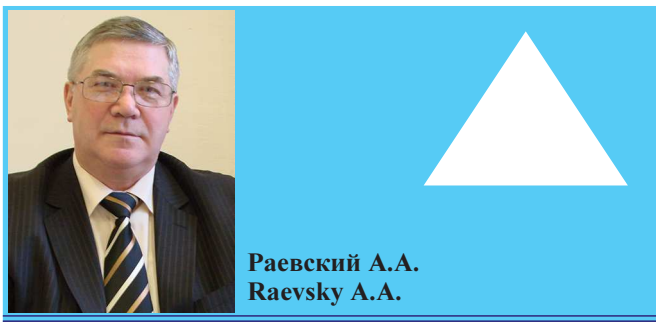
1. Ветеринарные и технологические мероприятия при содержании крупного рогатого скота: монография. /П.А. Красочко [и др.]; под общ. ред. П.А.Красочко. - Смоленск: "Универсум", 2016. - 508 с.
2. Диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: вирусные заболевания: монография / А. А. Шевченко [и др.]. - Краснодар: КубГАУ, 2018. - 485 с.
3. Красочко, П.А. Научные основы изучения этиологии, патогенеза и разработка мер борьбы с вирусными инфекциями молодняка крупного рогатого скота / П.А.Красочко, А.М.Ламан //Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария. 2006. № 3. С. 3-8.
4. Красочко П.А. Современные подходы к специфической профилактике вирусных респираторных и желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота /П.А.Красочко, И.А.Красочко, С.Л.Борознов // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. 2008. Т. 6. С. 243-251
5. Машеро, В.А. Этиологическая структура возбудителей респираторных и желудочно-кишечных инфекций телят в Республике Беларусь / В.А. Машеро, П.А. Красочко //Ученые записки учреждения образования Витебская область Знак почёта государственная академия ветеринарной медицины. 2007. Т. 43. № 2. С. 83-86.
6. Оценка эпизоотической ситуации по инфекционным энтеритам телят в хозяйствах Витебской области / П.А. Красочко [и др.] // Ветеринарный журнал Беларуси. Выпуск 2(9), 2018. УО ВГАВМ, 2018. - С.35-39.
7. Физиологические основы проявления стрессов и пути их коррекции в промышленном животноводстве: монография. В 2 ч. Ч. 1 / Ф.И.Фурдуй [и др.] /Под ред. П.А.Красочко. - Горки: БГСХА, 2013. - 564 с.
8. Физиологические основы проявления стрессов и пути их коррекции в промышленном животноводстве: монография. В 2 ч. Ч. 2 / Ф.И.Фурдуй [и др.] /Под ред. П.А.Красочко. - Горки: БГСХА, 2013. - 492 с.
9. Эпизоотология и инфекционные болезни: учебник для студентов и магистрантов учреждений высшего образования по специальности "Ветеринарная медицина" /В.В.Максимович [и др.]. - 2 изд. переработанное и дополненное. - Минск: ИВЦ Минфина, 2017. - 824 с.
10. Средства специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота и свиней: прак. пособие / П. А. Красочко [и др.]. - Минск: ИВЦ Минфина, 2018. - 368 с.
11. Яромчик, Я. П. Анализ отчетности ветеринарных диагностических учреждений Республики Беларусь по инфекционным энтеритам телят / Я.П. Яромчик // материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых "Молодые ученые - науке и практике АПК", УО ВГАВМ, Витебск, 5-6 июня 2018 г. - Витебск: ВГАВМ, 2018 г. - С. 47-49.
12. Crouch C.F. Serological, colostral and milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus, coronavirus and Escherichia coli F5 (K99) / Crouch C.F., Oliver S., Francis M. J. - Veter. Rec. - 2001; Vol. 149, N 4. - P. 105-108.
13. Dobilas, J. Epizootic investigations of colibacteriosis on farms and development of vaccine / J. Dobilas, L. Barzelis // Vet. Med. and Zootech. (Lithuania) / Sc. Works. - 1997. - Vol. 4, № 26. - P. 22-24.

References

1. Veterinary and technological measures for the maintenance of cattle: monograph. /P. A. Krasochko [et al.]; under the general. Ed. P. A. Krasochko. - Smolensk: "University," 2016. - 508 p.
2. Diagnosis of infectious diseases of farm animals: viral diseases: monograph / A. A. Shevchenko [and others]. - Krasnodar: KubGAU, 2018. - 485 s.
3. Krasochko, P.A. Scientific foundations for the study of etiology, pathogenesis and the development of measures to combat viral infections of young cattle horns/P.A. Krasochko, A.M.Laman//Epizootology, immunobiology, pharmacology and sanitation. 2006. № 3. С. 3-8.
4. Krasochko, P.A. Modern approaches to the specific prevention of viral respiratory and gastrointestinal infections of cattle/P.A. Krasochko, I.A. Krasochko, S.L. Boroznov//Proceedings of the Federal Federal Center for Animal Health Protection. 2008. Т. 6. С. 243-251
5. Masherо, V.A. Etiological structure of pathological structure of respiratory and gastrointestinal infections of calves in the Republic of Belarus/V.A. Masherо, P.A. Krasochko//Scientific notes of the Viteb-Skkskaya educational institution of the Order of Honor of the State Academy of Veterinary Medicine. 2007. Т. 43. NO. 2. S. 83-86.
6. Assessment of the epizootic situation on the infectious enteritis of calves in the farms of the Vitebsk region/P.A. Krasochko [et al.]//Veterinary Journal of Belarus. Issue 2 (9), 2018. VGAVM UO, 2018. - С.35-39.
7. Physiological foundations of the manifestation of stresses and ways to correct them in industrial animal husbandry: monograph. At 2 h. Part 1/F.I. Furduy [et al.]/Ed. P.A. Krasochko. - Gorki: BGSXA, 2013. - 564 s.
8. The physiological foundations of the manifestation of stresses and the ways of their correction in industrial animal husbandry: monograph. At 2 h. Part 2/ F.I. Furduy [et al.]/Ed. P.A. Krasochko. - Gorki: BGSXA, 2013. - 492 s.
9. Epizootology and infectious diseases: a textbook for students and magisters of higher education institutions with a degree in Veteri-Narnaya Medicine/V.V. Maksimovich [and others]. - 2 ed. processed and completed. - Minsk: IVC of the Ministry of Finance, 2017. - 824 p.
10. Means for the specific prevention of infectious diseases of cattle and pigs: manual/P. A. Krasochko [et al.]. - Minsk: IVC of the Ministry of Finance, 2018. - 368 s.
11. Yaromchik, Ya.P. The analysis of the reporting of veterinary diagnostic institutions of Republic of Belarus on infectious enteritis of calfs / Ya.P. Yaromchik//materials of the International scientific and practical conference of young scientists "Young scientists - science and practice of agrarian and industrial complex", UO VGAVM, Vitebsk, June 5-6, 2018 - Vitebsk: VGAVM, 2018 - Page 47-49.
12. Crouch C.F. Serological, colostral and milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus, coronavirus and Escherichia coli F5 (K99) / Crouch C.F., Oliver S., Francis M. J. - Veter. Rec. - 2001; Vol. 149, No. 4. - P. 105-108.
13. Dobilas, J. Epizootic investigations of colibacteriosis on farms and development of vaccine / J. Dobilas, L. Barzelis // Vet. Med. and Zootech. (Lithuania) / Sc. Works. - 1997. - Vol. 4, no. 26. - P. 22-24.

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-13
УДК 57.083

Разработка математической модели непрерывного (хемостатного) процесса культивирования пастерелл



Раевский А.А.
Raevsky A.A.

Раевский А.А., кандидат биологических наук, заместитель директора по научно-техническим вопросам ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности", г. Щелково, raevskyaa@mail.ru

Ключевые слова: пастереллы, непрерывное культивирование, хемостат, математическая модель, удельная скорость роста, модель Моно.

Резюме: Одним из наиболее важных технологических этапов при производстве биологических препаратов, предназначенных для специфической профилактики инфекционных заболеваний, является культивирование микроорганизмов. Именно на этой технологической стадии производства вакцин происходит синтез антигенов, от которых зависит эффективность иммунопрепаратов. В процессе выращивания бактерий необходимо одновременно с увеличением выхода биомассы добиваться того, чтобы возбудитель не изменял свои биологические свойства. Для этого необходимо создавать оптимальные условия культивирования с учётом физиологического состояния микроорганизмов. Технология изготовления бактериальных вакцин многоаспектная проблема, ключевым направлением которой является разработка управляемых процессов культивирования микроорганизмов. В настоящее время получение бактериальной массы микроорганизмов для изготовления вакцин основано на периодическом способе культивирования, в течение которого свойства клеток и состав культуральной среды непредсказуемо изменяются.

Однако, по данным ряда исследователей наиболее эффективным по накоплению биомассы бактерий является хемостатное культивирование с лимитированием по источнику углерода [1, 2]. Продуктивность непрерывного (хемостатного) выращивания микроорганизмов значительно превышает продуктивность периодического метода.

Поэтому, весьма перспективны исследования, направленные на организацию процессов управляемого культивирования и, в частности, на непрерывные способы выращивания микроорганизмов, позволяющие создавать и длительное время поддерживать культуры с постоянной и точно определённой концентрацией биомассы, фазой и скоростью роста, а также с соотношением протективных антигенов [3, 4].

Development of a mathematical model of the continuous (chemostat) process of culturing pasteurilla

Raevsky A.A., Candidate of Biological Sciences, Deputy Director for Scientific and Technical Issues of the All-Russian Scientific Research and Technological Institute of Biological Industry, Shchelkovo, e-mail: raevskyaa@mail.ru

Key words: pasteurilla, continuous cultivation, chemostat, mathematical model, specific growth rate, Monod model.

Abstract. One of the most important technological stages in the production of biological preparations intended for the specific prevention of infectious diseases is the cultivation of microorganisms. The synthesis of antigens occurs precisely at this technological stage of vaccine production; the effectiveness of immunopreparations depends on them. In the process of growing bacteria, it is necessary, simultaneously with an increase in the biomass yield, to ensure that the pathogen does not change its biological properties. To do this, it is necessary to create optimal conditions for cultivation, taking into account the physiological state of microorganisms. The technology of manufacturing bacterial vaccines is a multifaceted problem, the key direction of which is the development of controlled processes for the cultivation of microorganisms. At present, obtaining a bacterial mass of microorganisms for the manufacture of vaccines is based on a periodic method of cultivation, during which the properties of cells and the composition of the culture medium change unpredictably. According to a number of researchers, the most efficient in terms of accumulation of bacterial biomass is chemostat cultivation with limitation by the carbon source [1, 2]. The productivity of continuous (chemostat) cultivation of microorganisms significantly exceeds the productivity of the batch method. Therefore, very promising research aimed at organizing the processes of controlled cultivation and, in particular, on continuous methods of growing microorganisms, allowing you to create and maintain for a long time cultures with a constant and precisely defined biomass concentration, phase and growth rate, as well as the ratio of protective antigens [3, 4]. The aim of this work is to build an adequate mathematical model of the process of chemostat cultivation of *Pasteurella* in the production of anti-*Pasteurella* vaccine in order to optimize it. As a result of the research, the structure of the mathematical model of continuous cultivation of *P. multocida* was developed, its coefficients were determined, the adequacy of the model to the real process was verified, the obtained mathematical description of the process makes it possible to calculate and select the modes of chemostatic cultivation - the dilution rate D and the initial glucose concentration S_0 - to obtain the optimal concentrations of viable pasteurilla, the specified productivity values, the degree of substrate conversion, etc. in the manufacture of antibacterial vaccines. In addition, the obtained mathematical dependences make it possible to make a proposal on the metabolic mechanism for increasing the concentration of pasteurilla at low dilution rates.

Цель работы – построение адекватной математической модели процесса хемостатного выращивания пастерелл при производстве противопастереллезной вакцины с целью его оптимизации.

В результате исследований разработана структура математической модели непрерывного культивирования *P.*

Для цитирования / For citation

Разработка математической модели непрерывного (хемостатного) процесса культивирования пастерелл / Раевский А.А. // Ветеринария и кормление. - 2021. - №1 - С. 45-48.

Development of a mathematical model of the continuous (chemostat) process of culturing pasteurilla / Raevsky A.A. // Veterinaria I kormlenie. - №1 - P. 45-48.

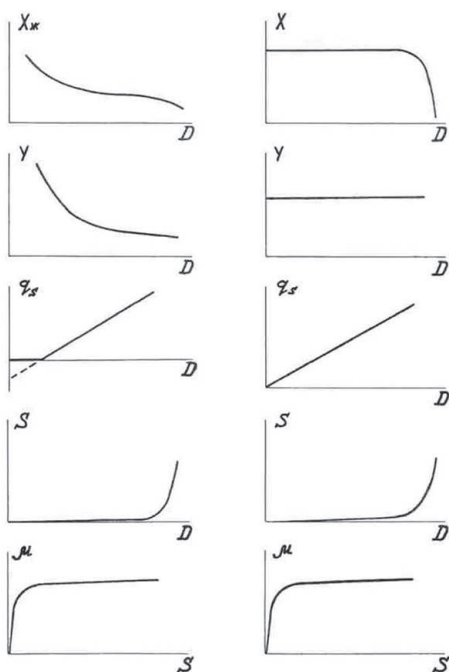


Рис. 1. Сопоставление закономерностей роста *P. multocida* штамм Пастеровский при хемостатном культивировании в условиях лимитирования роста глюкозой (левая половина рисунка) с закономерностями, соответствующими теории Моно (правая половина).

Figure 1. Comparison of the growth patterns of *P. multocida* strain Pasteur during chemostatic cultivation under conditions of growth limitation by glucose (left half of the figure) with the patterns corresponding to Monod's theory (right half)

multocida, определены ее коэффициенты, проверена адекватность модели реальному процессу, полученное математическое описание процесса дает возможность рассчитать и выбрать режимы хемостатного культивирования – скорость разбавления D и начальную концентрацию глюкозы S_0 – для получения оптимальных концентраций жизнеспособных пастерелл, заданных значений продуктивности, степени превращения субстрата и т.д. при изготовлении противобактериальных вакцин. Кроме того, полученные математические зависимости позволяют сделать предложение о метаболическом механизме повышения концентрации пастерелл при малых скоростях разбавления.

На рис. 1 приведены результаты изучения роста *P. multocida* в питательной среде на основе перевара Хоттингера при начальной концентрации глюкозы 1 – 3 мг/мл (левая половина рисунка) в сопоставлении с основными закономерностями теории Моно (правая половина). Данные получены в отделе противобактериальных препаратов ВНИТИБП [5, 6].

Последовательно сверху вниз представлены зависимости концентрации жизнеспособных пастерелл $X_{ж}$, экономического коэффициента Y , удельной скорости потребления глюкозы q_s , остаточной концентрации глюкозы S от скорости разбавления D , а также удельной скорости роста μ от концентрации глюкозы S .

Очевидно, что экспериментальные данные хемостатного культивирования пастерелл в условиях лимитирования их роста глюкозой ($S_0 < 3$ мг/мл) свидетельствуют о существенном противоречии с зависимостями, рассчитываемыми по теории Моно. Особенностью полученных экспериментальных данных является повышение концентрации пастерелл X и экономического коэффициента Y при уменьшении скорости разбавления D . Другим отклонением от теории является весьма малая (практически равная нулю) удельная скорость потребления глюкозы q_s при малых скоростях разбавления.

нулю) удельная скорость потребления глюкозы q_s при малых скоростях разбавления. Таким образом, для расчета процесса хемостатного культивирования пастерелл нельзя применить модель Моно, необходимо разработать математическую модель, учитывающую особенности полученных экспериментальных данных.

Цель исследований заключалась в анализе экспериментальных данных, поиске варианта уравнения кинетики потребления субстрата, который можно применить в модели, а также определении коэффициентов математической модели μ_m и K_s , т.е.

– K_s – константы насыщения – коэффициента, соответствующего тому значению концентрации лимитирующего субстрата, при котором удельная скорость роста равна половине максимальной величины ($\mu_m / 2$);

– μ_m – максимально возможного значения удельной скорости роста в данной среде выращивания, а так же расчет – коэффициента основного обмена (m), т.е. расхода питательного вещества на поддержание жизни единицы микробной популяции в течение 1 часа (трата на основной обмен);

– истинного экономического коэффициента (y').

Для разработки математической модели использовали экспериментальные данные хемостатного культивирования культуры *Pasteurella multocida* 2-ой авирулентный (пастеровский) штамм.

Для культивирования пастерелл в режиме непрерывного хемостатного выращивания использовали многофункциональный лабораторный комплекс приборов и устройств АНКУМ-2М, с помощью которого осуществляется задание и поддержание различных условий и режимов культивирования в биореакторах ёмкостью 3 или 10 литров

Биореактор оснащен перемешивающим устройством с магнитной муфтой и изменяемой скоростью перемешивания, барботером. В нём установлены датчики измерения температуры, pH, окислительно-восстановительного потенциала среды (Eh), датчик растворённого в культуральной жидкости кислорода (pO_2).

Физико-химические параметры культивирования пастерелл поддерживали на определённых ранее оптимальных уровнях в режиме периодического управляемого выращивания *Pasteurella multocida* – 37 °C, pH – 8 ед. pH, pO_2 – 35% от нас.

На каждой скорости разбавления после установления стационарного режима культуру выдерживали не менее 7 периодов генерации. Проверку типа лимитирования осуществляли путем определения концентрации глюкозы в культуральной жидкости. Значения коэффициентов математической модели определяли на основе экспериментальных данных методом наименьших квадратов, а также по двум установившимся режимам с использованием системы двух уравнений с двумя неизвестными. Оценку адекватности математического описания проводили по критерию Фишера F .

На рис. 2 и 3 представлены соответственно зависимости концентрации жизнеспособных пастерелл $X_{ж}$ от скорости разбавления D и начальной концентрации глюкозы S_0 и удельной скорости потребления глюкозы q_s от скорости разбавления D .

Особенностью полученных экспериментальных данных является повышение концентрации пастерелл X и экономического коэффициента Y при уменьшении скорости разбавления D . Другим отклонением от теории является весьма малая (практически равная нулю) удельная скорость потребления глюкозы q_s при малых скоростях разбавления.

Известно, что по теории Моно зависимость концентрации бактерий X от скорости разбавления D находится из выражения:

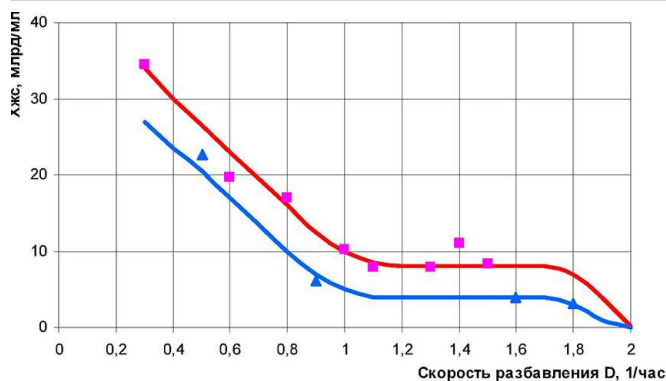


Рис. 2. Зависимость концентрации жизнеспособных пастерелл Xж от скорости разбавления D и начальной концентрации глюкозы S_0 . Верхняя кривая – при $S_0 = 3$ г/л, нижняя - $S_0 = 1$ г/л.
Figure 2. Dependence of the concentration of viable pasteurella Xg on the dilution rate D and the initial concentration of glucose S_0 . Upper curve at $S_0 = 3$ g / l, lower curve at $S_0 = 1$ g / l

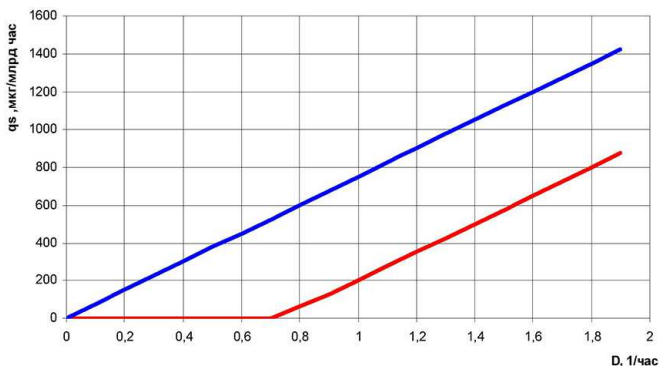


Рис. 3. Зависимость удельной скорости потребления глюкозы q_s хемостатной культурой пастерелл от скорости разбавления D. По теории Моно – верхняя прямая; экспериментальные значения для пастерелл – нижняя.
Figure 3. Dependence of the specific rate of glucose consumption q_s by a chemostat culture of Pasteurella on the rate of dilution D. According to the Monod's theory-upper straight line; experimental values for Pasteurella is at the bottom.

$$X = Y \left(S_0 - \frac{DK_s}{\mu_m - D} \right), (1a)$$

где, S_0 – начальная (исходная) концентрация субстрата в питательной среде;

K_s – константа насыщения – коэффициент, соответствующий тому начению концентрации лимитирующего субстрата, при котором удельная скорость роста равна половине максимальной величины ($\mu_m / 2$);

μ_m – максимально возможное значение удельной скорости роста в данной среде выращивания;

а удельная скорость потребления субстрата q_s определяется следующей зависимостью:

$$q_s = \frac{1}{Y} \mu + m,$$

где, m – коэффициент основного обмена, т.е. расход

питательного вещества на поддержание жизни единицы микробной популяции в течение 1 часа (трата на основной обмен). Согласно теории Моно m практически равен нулю.

Увеличение концентрации микроорганизмов при малых скоростях разбавления отмечено в ряде работ при лимите аммония, сульфата, магния, калия, фосфора. В условиях же лимита глюкозы подобную зависимость наблюдали у *Salmonella typhi* [3]. В этой работе в математическое выражение скорости потребления субстрата (глюкозы) q_s было предложено ввести коэффициент основного обмена m, имеющий отрицательное значение, а само выражение соответствует уравнению Пирта-Лейенбергера:

$$q_s = \frac{1}{y'} \mu + m, (1)$$

где: $\frac{1}{y'}$ – коэффициент, показывающий расход субстрата на рост популяции.

Это уравнение учитывает расход субстрата на поддержание жизни микробной клетки, т.е. на основной обмен, независящий от скорости роста. Биологическая сущность отрицательного значения коэффициента основного обмена m объясняется следующим образом. При малых скоростях разбавления, когда лимитирующий субстрат используется почти до нуля, вместо него микроорганизмы начинают потреблять продукты метаболизма, способные заменить данный субстрат. Это обеспечивает значительное увеличение концентрации микроорганизмов в указанном режиме. У *Salmonella typhi* таким метаболитом является пировиноградная кислота – основной продукт расщепления глюкозы.

Из уравнения математического баланса по субстрату следует, что выражение для пересчета удельной скорости потребления глюкозы q_s в установившихся режимах имеет вид:

$$q_s = \frac{S_0 - S}{X} D. (2)$$

Приравнивая правые части уравнений (1) и (2), характеризующих удельную скорость потребления субстрата, получим:

$$\frac{S_0 - S}{X} D = \frac{1}{y'} D + m.$$

Отсюда: $\frac{Dy'}{my' + D} = \frac{X}{S_0 - S} = Y, (3)$

где: y' – истинный экономический коэффициент.

Подставив это выражение для Y в известное уравнение теории Моно зависимости концентрация бактерий X от скорости разбавления D, получим зависимость для расчета концентрации бактерий

$$X_{ж} = \frac{Dy'}{my' + D} \left(S_0 - \frac{DK_s}{\mu_m - D} \right)$$

Значения коэффициентов μ_m и K_s для пастерелл определяются по данным двух установившихся режимов непрерывного культивирования.

Получим следующие значения коэффициентов $K_s = 0,133$ мг/мл и $\mu_m = 2,18$ 1/час, модель на данной стадии исследований имеет вид:

$$X_{ж} = \frac{Dy'}{my' + D} \left(S_0 - \frac{0,133 D}{2,18 - D} \right)$$

Расчет коэффициентов модели m и y' проводили мето-

дом наименьших квадратов по данным других установившихся режимов хемостатного культивирования в условиях лимитирования роста пастерелл глюкозой.

Опустив расчеты, приведем окончательные результаты вычислений:

$$m = 0,165, y' = 2,29.$$

После определения значений параметров уравнений кинетики, было исследовано соответствие полученного математического описания

$$X_{ж} = \frac{2,29D}{0,378 + D} \left(S_0 - \frac{0,133D}{2,18 - D} \right)$$

экспериментальным данным, полученным в новых (контрольных) экспериментах.

В результате расчетов установлено, что величина критерия Фишера по данным контрольных опытов, составляет 5,99, а критическое значение этого показателя равно 2,2, т.е. $F_{контр} > F_{кр}$. Следовательно, математическое описание адекватно описывает экспериментальные данные.

Для наглядного представления о соответствии полученного описания реальному процессу вновь обратимся к рис. 2, на котором сопоставлены расчетные значения концентрации жизнеспособных пастерелл $X_{ж}$ (линии) с данными контрольных опытов (маркеры) при начальной концентрации глюкозы $S_0 = 3,0$ (верхняя кривая) и 1,0 мг/мл (нижняя). Очевидно, что экспериментальные и расчетные зависимости концентрации $X_{ж}$ от скорости разбавления D носят аналогичный характер, кроме того экспериментально полученные точки лежат вблизи расчетных кривых.

Используя составленное математическое описание процесса культивирования рассчитан ряд показателей. Из уравнений (1а), (1) и (3) получены соответственно зависимости удельной скорости потребления глюкозы, экономического коэффициента и текущей концентрации глюкозы от скорости разбавления. По уравнению Моно определена зависимость удельной скорости роста пастерелл μ от концентрации глюкозы S .

Анализируя полученные математическое зависимости можно предложить по аналогии с $S.typhi$, что и пастереллы при малых скоростях роста, когда лимитирующая рост глюкоза используется почти до нуля, вместо нее начинают потреблять продукты своего метаболизма, способные заменить глюкозу.

Полученное математическое описание можно также использовать для расчета показателей, характеризующих эффективность процесса. Такими показателями являются: степень превращения субстрата (глюкозы) и продуктивность по выходу микроорганизмов Q_x . Степень превращения показывает соотношение между потребленным субстратом ($S_0 - S$) и начальной концентрацией субстрата S_0 и выражается в процентах. Продуктивность по выходу показывает количество микроорганизмов, которое можно получить с единицы объема ферментера за единицу времени.

Степень превращения глюкозы уменьшается с увеличением скорости роста и с уменьшением начальной концентрации субстрата. При малых скоростях разбавления степень превращения глюкозы приближается к ста процентам.

Продуктивность по выходу $Q_{ж}$ зависит от начальной концентрации глюкозы. Каждому значению S_0 соответствует своя кривая зависимости продуктивности по выходу жизнеспособных пастерелл от скорости разбавления. Причем величина продуктивности увеличивается по мере увеличения начальной концентрации глюкозы и неоднозначно зависит от скорости разбавления.

Таким образом, полученное математическое описание процесса:

$$X_{ж} = \frac{2,29D}{0,378 + D} \left(S_0 - \frac{0,133D}{2,18 - D} \right)$$

дает возможность рассчитать и выбрать режимы хемостатного (непрерывного) культивирования – скорость разбавления D и начальную концентрацию глюкозы S_0 – для получения оптимальных концентраций жизнеспособных пастерелл $X_{ж}$, заданных значений продуктивности, степени превращения субстрата и т.д. при производстве сухой живой вакцины против пастереллеза птиц. Кроме того, полученные математические зависимости позволяют сделать предложение о метаболическом механизме повышения концентрации пастерелл при малых скоростях разбавления.

Литература

1. Работнова И.Л. Тактика оптимизации микробиологических проектов // Антибиотики и медицинская биотехнология. - 1986. - №7. - С. 509.
2. Biotechnology / Ed. H.J. Rehm, G. Reed. Weinheim, 1983. - Vol.3.
3. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. - М: Медицина, 1992. - 192 с.
4. Раевский А.А. Перспективное технологическое направления культивирования бактерий при производстве вакцин // Материалы междунар. науч.- пр. конф. "Научные основы производства вет. биол. препаратов". - Щёлково, 2003. - С. 61-64.
5. Раевский А.А., Ярцев М.Я., Анисимова Л.В. Способ изготовления вакцины против пастереллеза сельскохозяйственных животных и птиц // Авт. свид. № 2129015. 19.05.1997. Бюл. № 11.
6. Хабаров А.К. Разработка процесса хемостатного культивирования пастерелл при производстве вакцин: Автореф.дисс... канд. биол. наук. - Щёлково, 2005.
7. Самуйленко А.Я., Раевский А.А., Школьников Е.Э., Павленко И.В., Анисимова Л.В., Меньшенин В.В. Перспективные направления в технологии культивирования бактерий пери производстве вакцин для ветеринарной медицины // Ветеринария и кормление. - 2011. - № 4. - С. 8-9.
8. Раевский А.А., Самуйленко А.Я. Разработка и моделирование управляемых процессов культивирования микроорганизмов при производстве биофармпрепаратов: мат. межд. научн.-практ. конф. "Фармацевтические и медицинские биотехнологии". - М., 2012. С. 291-292.
9. Раевский А.А. Математическая модель хемостатного культивирования пастерелл при производстве биопрепаратов: мат. межд. научн.-практ. конф. "Биотехнология и качество жизни". - М., 2014. - С. 301-302.
10. Раевский А.А. Оптимизация процесса культивирования и выбор ферментационного оборудования: мат. межд. научн.-практ. конф. "Актуальные проблемы биотехнологии в аграрно-промышленном комплексе". - Минск, 2015.

References

1. Rabotnova I.L. Optimization tactics for microbiological projects // Antibiotics and medical biotechnology. - 1986. - No. 7. - S. 509.
2. Biotechnology / Ed. H.J. Rehm, G. Reed. Weinheim, 1983. - Vol.3.
3. Basnakyan I.A. Cultivation of microorganisms with given properties. - M: Medicine, 1992. -- 192 p.
4. Raevsky A.A. Promising technological direction of bacterial cultivation in the production of vaccines // Materials of the international. scientific -pr. conf. "Scientific bases of production vet. biol. drugs". - Shchelkovo, 2003. - S. 61-64.
5. Raevsky A.A., Yartsev M.Ya., Anisimova L.V. A method of making a vaccine against pasteurellosis of farm animals and birds // copyright certificate No. 2129015.19.05.1997. Bul. No. 11.
6. Khabarov A.K. Development of the process of chemostat cultivation of pasteurella in the production of vaccines: Abstract of the thesis ... Candidate of Biological Sciences. - Shchelkovo, 2005.
7. Samuilenko A.Ya., Raevsky A.A., Shkolnikov E.E., Pavlenko I.V., Anisimova L.V., Menshenin V.V. Promising directions in the technology of bacterial cultivation during the production of vaccines for veterinary medicine // Vetkorm. - 2011. - No. 4. - S. 8-9.
8. Raevsky A.A., Samuilenko A.Ya. Development and modeling of controlled processes of microorganisms cultivations in the production of biopharmaceuticals: mat. int. scientific-practical. conf. "Pharmaceutical and Medical Biotechnologies". - M., 2012.S. 291-292.
9. Raevsky A.A. Mathematical model of pasteurella chemostat cultivation in the production of biological products: Mat. int. scientific-practical conference. Biotechnology and Quality of Life. - M., 2014. -- S. 301-302.
10. Raevsky A.A. Optimization of the cultivation process and selection of fermentation equipment: mat. int. scientific-practical conference. "Actual problems of biotechnology in the agro-industrial complex." - Minsk, 2015.

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-14
УДК. 636.087.8

Лиофилизация биопрепаратов. Оборудование. Технология. Валидация.



Сербис Е.С.
Serbis E. S.

Сербис Е.С. – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

Матвеева И.Н. – доктор биологических наук, профессор, зам. директора по бионанотехнологиям

Еремец В.И. – доктор биологических наук, профессор, зам. директора по научной работе

ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности", Щелково, Московской обл.
e-vnitibp@mail.ru

Ключевые слова: биопрепараты, сублимационная сушка, замораживание, сублимация, досушивание, влажность, валидация.

Резюме: Промышленное изготовление стерильных лиофилизированных биопрепаратов является многостадийным процессом. Сублимационное высушивание является критическим этапом, поскольку завершает асептические процедуры. В данной работе рассматриваются проблемы сублимационной сушки, с которыми сталкиваются инженеры, биологи, технологи цехов сушки, разработчики сухих препаратов, специалисты по качеству. Приведена схема валидации сублимационного оборудования и программного обеспечения. Оборудование, технология и нормативные документы рассмотрены в статье в качестве взаимозависимых элементов, составляющих сублимационную сушку как систему, включающую разработку режимов, эксплуатацию и текущий контроль работы оборудования, составление внутренней и внешней документации. В работе показано, что изучение физико-химических и биологических параметров как жидкого полуфабриката, так и сухого продукта, является базой для научно-обоснованного построения режимов сушки. Без определения входных и выходных параметров невозможно провести качественный контроль сушки, как процесса. В нашей работе определены ключевые характеристики сублимационной сушки при замораживании, сублимации, досушивании. Также показана целесообразность определения не только остаточной влажности, но и величины уменьшения массы высушиваемого материала, приведены формулы расчетов. Показаны примеры составления сопроводительных доку-

Lyophilization biologicals products. Equipment. Technology. Validation.

Serbis E. S., Matveeva I. N., Erements V. I.

Federal State Budgetary Institution All-Russian research and technological Institute of biological industry, Shchelkovo, Moscow region
e-vnitibp@mail.ru

Key words: biological product, freeze drying, primary drying, prefreezing, secondary drying, humidity, validation.

Abstract: The aseptic process of industrial production of sterile lyophilized biological products is completed by one of the critical stages of the technological process, the freeze-drying. GOST R ISO 13408-3-2011 defines the term lyophilization as a synonym for the sublimation. Sublimation - the physical process on which the freeze-drying method is based. This paper discusses the issues of freeze drying that engineers and biologists, production technologist, designers of dry preparations, and quality specialists face with. Freeze-drying consists of three stages: freezing, freeze-drying and drying. Each stage has its own critical points, input and output parameters. The task of the developer of freeze-drying technology is to determine the need for each parameter and the sufficiency of their quantity. Equipment, technology and regulatory documents are considered as interdependent elements that make up freeze drying as a system. An integrated approach to the freeze-drying process includes the development of modes, equipment control, and internal documentation. The key parameters of the process are the qualitative and quantitative characteristics (reference values, measurement procedures, acceptable range of values) of the semi-finished liquid product and the finished freeze-dried product. Characteristics of the semi-finished liquid product are the temperature of complete crystallization; upper and lower eutectic temperatures; maximum permissible heating temperature (thermo-lability); density; specific (biological) activity. Freeze-drying process characteristics are: at the freezing stage - reaching the temperature of complete crystallization in the entire volume of the material received for drying; at the sublimation stage - maintaining the temperature in the dried material in the range between the lower and upper eutectic temperatures (without going beyond the upper); at the drying stage - reaching the maximum temperature in the material. The duration of each stage depends on the vial in which the dried material is packed, the volume of packaging, and the features of heat, mass, and energy exchange in the sublimation plant. Standard operating procedures (SOPs) should be designed with these features in mind. For example, for different packages (2ml or 10ml) in vials of the same volume, or for the same packaging in vials of different volumes, for example, 2ml in vial of 10-ml or 20-ml, separate SOPs are required in each case. In the current practice of industrial production, the quality of the lyophilized product is evaluated by humidity (GOST 24061-2012). In our work, to assess the quality of the process, we measured the decrease in the mass of liquid material during drying. We recommend measure both indicators, since they complement each other.

Для цитирования / For citation

Лиофилизация биопрепаратов. Оборудование. Технология. Валидация / Сербис Е.С. [и др.] // Ветеринария и кормление. - 2021. - № 1 С.49-51.

Lyophilization biologicals products. Equipment. Technology. Validation. / Serbis E.S. [et al] // Veterinaria i kormlenie. - 2021. - № 1. P. 49-51.

ментов. Каждая стадия оформляется как Стандартная Операционная Процедура (СОП). При этом необходимо определять границы входных и выходных параметров каждой стадии производственного процесса. Определены величины опорных значений и границы допустимых интервалов этих величин. Научно-обоснованный подход к разработке процесса, процедурам входного и выходного контроля каждой стадии, соответствующее требованиям оформление документации позволяет добиться ритмичности и четкости в работе всех звеньев производственной цепи и гарантированной стандартности как готового продукта от серии к серии, так и процесса производства в целом.

Введение

Сушка продуктов и кормов используется с давних времен. Попытки лиофилизировать сыворотку крови, микроорганизмы и другие биологические объекты известны с начала прошлого века [1,2]. Лиофилизация термолabileльных биопрепаратов методом сублимационной сушки в настоящее время широко применяется, поскольку отрицательные температуры и глубокий вакуум создают щадящие условия, позволяющие сохранять структуру и функции нативных белков, вирусов, живых бактерий. Государственный отраслевой стандарт России (ГОСТ Р ИСО 13408 -3 - 2011) называет лиофилизацию синонимом термина возгонка.[3] Возгонка – это физический процесс, сущность которого заключается в превращении твердого вещества в пар, минуя жидкую фазу. Десублимация – это обратный процесс физического перехода парообразного вещества в твердое состояние, также без прохождения жидкой фазовой стадии.

Современная фармацевтическая промышленность оснащена достаточно большим спектром оборудования для сублимационной сушки. По способу размещения материала при высушивании различают коллекторные и камерные установки; по длительности технологического процесса – непрерывного и циклического действия; по объемам высушиваемого материала – лабораторные, полупромышленные и промышленные установки. Наличие низкотемпературной холодильной установки является обязательным в том случае, если плиты сублимационного аппарата, например сублиматоры ТГ-50, не позволяют заморозить жидкий материал до необходимой температуры. В некоторых случаях морозильники продаются изготовителем в комплекте с аппаратом для сушки. На современных высокотехнологичных установках различных фирм (Tofflon, Вос Edwards, Frigera и др.) можно замораживать материал непосредственно на плитах сублиматора. Производители различных фирм предлагают широкий выбор холодильников-морозильников, отличающихся объемами, расположением, ко-

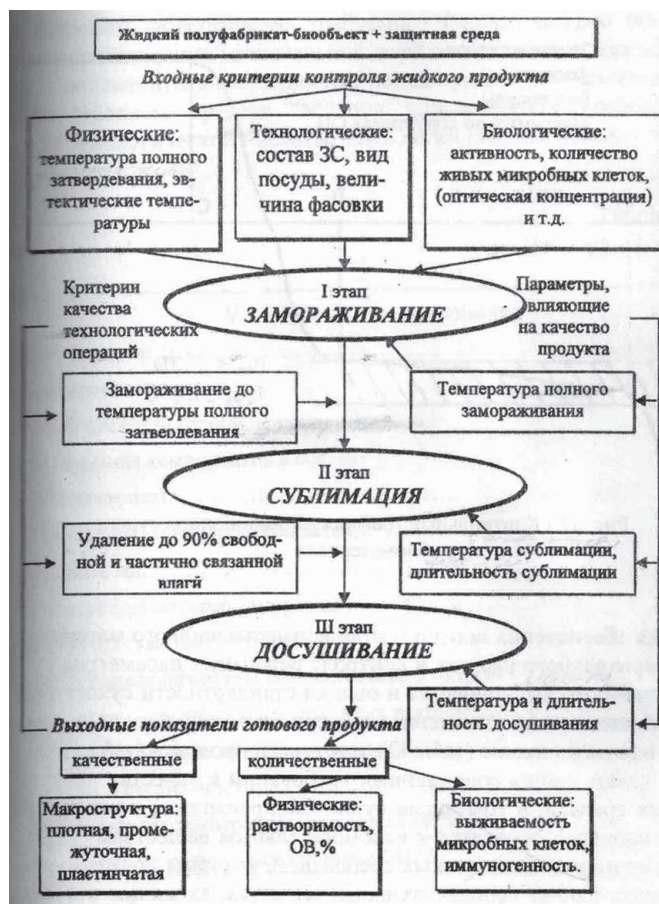


Рис. 2. Этапы сублимационного высушивания биопрепаратов.

Fig. 2 The stages freeze-drying biological products.

личеством камер. Диапазон температур от -60 до -85 С удовлетворяет требованиям для большинства выпускаемых промышленностью ветеринарных препаратов.

Создание комплексных технологических линий и систем, интеграция холодильного и сублимационного оборудования с цифровыми (компьютерными) системами – это мировая тенденция современного промышленного производства. Процесс валидации сублимационных установок и программного обеспечения при подборе и монтаже оборудования проходит в несколько стадий, показанных на рис. 1.

Квалифицированный подбор необходимого потребителю оборудования помогают осуществить семинары и выставки, регулярно проводимые в нашей стране и за рубежом. К сожалению, мировая пандемия коронавируса меняет формат общения.

Сублимационная сушка включает в себя три стадии – замораживание, сублимацию и досушивание. Каждая стадия имеет свои критические точки, входные и выходные параметры. Задача разработчика технологии сублимационного высушивания – определить необходимость каждого параметра и достаточность их количества. Нарботка биоматериала включает все предшествующие стадии получения материала от продуцентов, культивирование, очистку и многие другие стадии, вплоть до жидкого полуфабриката, поступающего на высушивание. Отдельные пункты имеют различную значимость для всего процесса изготовления сухого препарата. Степень критичности каждого из них должна быть исследована и подробно изложена в нормативно-технической документации по изготовлению каждого конкретного препарата. [4] Режимы высушивания составляют ключевую проблему технологии сушки., включая техническое обслуживание Выбор режимов сушки за-



Рис.1. Валидация лиофильного оборудования.
Fig. 1, Validation of freeze dryers

висит от биологических и физико-химических свойств высушиваемого объекта, от выбора посуды для сушки, от модели и индивидуальных особенностей конкретного сублимационного аппарата, от степени научной проработанности технологии сушки. Технологическая культура и дисциплина производства заключается в научной обоснованности технологии, в создании документооборота, сопровождающего весь производственный цикл, в планировании, учете и анализе всех процессов

Ключевыми параметрами процесса изготовления сухого биопрепарата являются качественные и количественные характеристики (опорные значения величин, процедуры их измерения, допустимый интервал значений) жидкого полуфабриката и готового сублимированного продукта. Характеристиками жидкого полуфабриката являются температура полной кристаллизации; верхняя и нижняя эвтектические температуры; максимально допустимая температура нагрева (термо-лабильность); плотность; специфическая (биологическая) активность биопрепарата.

Обсуждение результатов. В работе определены характеристики сублимационной сушки, как процесса. На этапе замораживания необходимо достижение температуры полной кристаллизации во всем объеме поступившего на сушку материала; на этапе сублимации – поддержание температуры в высушиваемом материале в диапазоне между нижней и верхней эвтектической температурами (не выходя за пределы верхней); на этапе досушивания – достижение максимальной температуры в материале. Длительность проведения каждого из этапов зависит от вида и объема посуды (поддоны, флаконы, ампулы), в которую наливают высушиваемый материал, от количества наливаемого полуфабриката, от особенностей тепло-, массо- и энергообмена в конкретной сублимационной установке. При валидации технологических процессов необходимо учитывать эти различия. Розлив при фасовании в одинаковые по объему флаконы разных объемов жидкого полуфабриката (например, по 2 мл или 4 мл во флаконы объемом 20 см³) или розлив одинакового объема жидкости в посуду разного объема (например, по 2 мл во флаконы объемом 20 см³ или объемом 10 см³), требует четырех отдельных Стандартных Операционных Процедур (СОП). Приведенные примеры составляют четыре разных варианта СОП. Качество лиофилизированного продукта в сложившейся практике промышленного производства оценивают по показателю остаточной влажности (ГОСТ 24061-2012). [5]

В нашей работе мы определяли физико-химические параметры процесса сушки не только по показателю остаточной влажности (ОВ). Этот унифицированный для всех биопрепаратов показатель не дает достоверной информации о количестве влаги, удаленной из жидкого биопрепарата во время сублимационной сушки. Нами была определе-

на зависимость, по которой следует вычислять величину изменения массы в процессе сушки.

$$X = (P2 - P3) / (P2 - P1) \times 100\%, \text{ где}$$

X – Величина изменения массы в %;

P1 – масса пустой посуды;

P2 – масса посуды с жидким полуфабрикатом;

P3 – масса посуды с сублимированным препаратом.

Общая формула для расчета доли остаточной влаги (ОВ) от первоначальной массы аналогична расчету процентов от процентов. Эта величина при значениях ОВ от 1 до 4% составляет сотые доли процента от первоначальной массы жидкого полуфабриката. Особенность нашего подхода заключается в том, что за 100 процентов нами взята масса всего жидкого полуфабриката, а не величины влаги или сухого вещества в жидком полуфабрикате. При розливе на автоматических линиях масса исходного полуфабриката контролируется автоматически. Однако, в промышленной практике это не учитывается, поскольку нет соответствующей нормативной документации.

Величина изменения массы в процессе сушки более полно характеризует особенности отдельных препаратов и их групп. Учет показателя изменения массы в процессе сушки и регулярный технологический мониторинг позволят повысить качество контроля стадии сублимационной сушки и всего производственного процесса изготовления сухих биопрепаратов в целом.

Литература

1. Shackell L.F. An improved method of desiccation, with some applications to biological problems. Am. J. Physiol. -1909. - 24. - P.325-340.
2. Flosdorf E.W. & Mudd S. Procedure and apparatus for preservation in "lyophile" from of serum and other biological substance // J. Immunol. - 1935. - 29 (5). - P. 389-425.
3. ГОСТ Р ИСО 13408-3 - 2011 Асептическое производство медицинской продукции Часть 3 Лиофилизация. Москва. Стандартиформ. 2012. 385 с.
4. Нежута А.А., Токарик Э.Ф., Самуйленко А.Я., Безгин В.М., Сербис Е.С. Теоретические и практические основы технологии сублимационного высушивания биопрепаратов. - Курск: КГСХА. - 2002. - 239 с.
5. ГОСТ 24061-2012 Препараты биологические сухие. Метод определения влажности

References

1. Shackell L.F. An improved method of desiccation, with some applications to biological problems. Am. J. Physiol. -1909. - 24. - P.325-340.
2. Flosdorf E.W. & Mudd S. Procedure and apparatus for preservation in "lyophile" from of serum and other biological substance // J. Immunol. - 1935. - 29 (5). - P. 389-425.
3. GOST R ISO 13408-3 - 2011 Aseptic manufacturing of medical products-Part 3 Lyophilization. Moscow. STANDARTINFORM. 2012. P. 385 p.
4. Nezhuta A. A., Tokarik E. F., Samuylenko A. Ya., Bezgin V. M., Serbis E. S. Theoretical and practical bases for freeze-drying biological products. - Kursk: KGSHA. - 2002. - P.239.
5. GOST 24061-2012 The dry biological Preparations. Method determining humidity.

Пресс-релиз/ Press-release

Молочная продукция из Удмуртии в США

Из Удмуртской Республики на экспорт в США направлено более 8 тонн молочной продукции

25 января 2021 года Управление Россельхознадзора по Кировской области и Удмуртской Республике проинспектировало отправку на экспорт в США первой партии молочной продукции (8,4 т) из Удмуртии.

На экспорт отправлена молочная продукция нескольких наименований (сливки питьевые, молоко питьевое цельное, молоко питьевое топленое и пр.).

Подконтрольные товары признаны безопасными в ветеринарно-санитарном отношении, соответствуют требованиям страны-импортера. Качество и безопасность молочных изделий подтверждены исследованиями подведомственного Службе ФГБУ "Татарская межрегиональная ветеринарная лаборатория" (город Казань).

Разрешение на вывоз выдано Россельхознадзором в автоматизированной информационной системе "Аргус".

По материалам Россельхознадзора

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-15
УДК 619:616.636:636.8

Вирус иммунодефицита кошки: характеристика и роль в патологии



Федоров Ю.Н.
Fedorov Yu.N.

Федоров Ю.Н., член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела иммунологии

Клюкина В.И., доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом иммунологии

Богомолова О.А., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунологии

Романенко М.Н., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунологии

Царькова К.Н., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности" (ФГБНУ ВНИТИБП), Московская обл./, Щелковский р-н, п. Биокombината, fun181@mail.ru

Ключевые слова: вирус иммунодефицита, кошки, структура, эпидемиология, патология, клиническое проявление, патогенез, иммунитет, диагностика, терапия, иммунопрофилактика

Резюме. Обзор описывает структуру и биологию вируса иммунодефицита кошки, эпидемиологию, клиническое проявление, иммунологическую и иммуногенетическую характеристику патогенеза, принципы диагностики терапии и профилактики. Это краткий обзор современных знаний об этом вирусе. Вирус иммунодефицита кошки является ретровирусом рода *Lentivirus*, семейства *Retroviridae*, впервые выделен в Калифорнии (США) в колонии домашних кошек в 1986 году. По структуре, жизненному циклу и патогенезу близок к вирусу иммунодефицита человека, инфицирует представителей семейства *Felidae* и является важным вирусным патогеном для домашних кошек во всем мире. Важно отметить, что человек не чувствителен к вирусу иммунодефицита кошки. Он широко изучается как важный ветеринарный патоген и как биологическая модель для HIV/AIDS. Главными мишенями вируса иммунодефицита кошки являются активированные CD4+Т-лимфоциты. Вирус иммунодефицита кошки является причиной болезни иммунной системы у кошек, вызывает истощение CD4+ популяции Т-лимфоцитов, повышает чувствительность к оппортунистическим инфекциям. Он имеет 7 генетически различных субтипов (A,B,C,D,E,F,U-Nzenv), распространение которых зависит от географических зон. Передача вируса происходит преимущественно парентерально через укусы со слюной при драках кошек. Большинство клинических признаков не вызываются непосредственно вирусом, а являются результатом вторичных инфекций. Вирус вызывает иммунодепрессию или иммуностимуляцию. Одним из наиболее презентующих клинических

Feline Immunodeficiency Virus: characteristics and role in pathology

Fedorov Yu.N., Klukina V.I., Bogomolova O.A., Romanenko M.N., Tsarykova K.N.

All-Russian Research and Technological Institute of the Biological Industry, Moscow Province, Shchelkovskij Region, pos. Biokombinata

Key words: immunodeficiency virus, structure, cat, pathology, diagnosis, immune system, immunity, immunoassay, immunodeficiencies, immunogenetics, therapy, immunoprophylactic

Abstract. The review describes structure and biology feline immunodeficiency virus, epidemiology, clinical manifestation, immunological and immunogenetic characteristics of the pathogenesis, principles of diagnosis, treatment and prophylactic. This is a brief overview of the current state of knowledge of this virus. The feline immunodeficiency virus (FIV) is a retrovirus of the *Lentivirus* genus (Family *Retroviridae*) was initially isolated from colony of domestic cats in California (USA) in 1986 and has now been recognized as a common feline pathogen worldwide. FIV closely related to HIV, which infect members of *Felidae* family and it is an important viral pathogen worldwide in the domestic cats. FIV these reasons has been studied widely as both an important veterinary pathogen and an animal model for HIV/AIDS. However, it is important to emphasize that humans are not susceptible to FIV infection. The main cellular target for FIV is the CD4+ T cell. FIV causes an immune system disease in domestic cats involving depletion of the CD4+ population of T lymphocytes, increased susceptibility to opportunistic infections, and sometimes death. Seven genetically distinct subtypes has been defined (A,B,C,D,E,F,U-Nzenv). The seroprevalence of feline immunodeficiency virus infection of cats varies markedly between geographic regions. Transmission of FIV is principally by parenteral inoculation of the virus in blood and saliva, presumably via biting during fighting. Most clinical signs are not directly caused by FIV, clinical signs will be the result of a secondary infection. The virus itself is responsible for immunodeficiency or immune stimulation. Chronic gingivostomatitis one of the most common presenting signs in FIV-infected cats. Methods of diagnosis are included virus isolation (not used routinely), polymerase chain reaction with sensitive and specificities ranging from 40-100%. These techniques result in relatively high numbers of false-positive and false-negative results. Routinely, FIV-infection is diagnosed by detecting antibodies using ELISA and immunochromatography methods. Western blot analysis is considered the "gold standart" for FIV serology to confirm questionable results. The most common drugs used for treatment of FIV-infection: reverse transcriptase inhibitors drugs, that inhibit viral enzymes, such as DNA or RNA polymerases, integrase inhibitors, protease inhibitors; and interferons. Development of an effective vaccine against FIV is difficult because of the high number and variations of the virus strains. Vaccines that only protect against a single virus variant, have already demonstrated a good efficacy against homologous FIV strains. This review summarizes pertinent findings about FIV from work published in a variety research journals.

признаков у вирус-инфицированных кошек является гингивостоматит. Методы диагностики инфекции включают выделение вируса, ПЦР с чувствительностью и специфичностью от 40 до 100%. Рутинно вирусная инфекция диагностируется на основании определения специфических антител с использованием ИФА- и ИХА-тестов. Вестерн блот рассматривается как "золотой стандарт" в серологических

Для цитирования / For citation

Федоров, Ю.Н. Вирус иммунодефицита кошек: характеристика и роль в патологии / Ю.Н.Федоров [и др.] // Ветеринария и кормление.-2021.-№1.- С.52-56.

Fedorov, Yu.N. Feline Immunodeficiency Virus: characteristics and role in pathology / Yu.N.Fedorov [et.al.] // Veterinaria i kormlenie.-2021.-N1.-P.52-56.

исследованиях для подтверждения спорных результатов диагностических исследований. Наиболее распространенными лекарственными средствами для терапии вирусной инфекции являются ингибиторы обратной транскриптазы, интегразы, протеазы и интерфероны. Получение эффективных вакцин против инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита кошки, затруднено, из-за большого числа и вариантов штаммов вируса. Вакцины защищают только против одного варианта вируса и показывают хорошую эффективность против гомологичных штаммов. Обзор обобщает соответствующие данные о вирусе иммунодефицита кошки из работ, опубликованных в различных научных журналах.

Введение

В настоящее время отмечается значительное увеличение популяции кошек (их число превысило количество собак) и рост инфекционных болезней. Эти обстоятельства стимулировали усилия ветеринарных иммунологов к расширению фундаментальных и прикладных исследований, направленных на изучение иммунной системы кошки, патогенеза иммуноопосредованных болезней, иммунных реакций, диагностику различных болезней, разработку и совершенствование вакцинных препаратов. С фундаментальной точки зрения кошки представляют интерес как биологическая модель для изучения различных болезней человека. Повышению интереса к изучению иммунологии кошки послужили два события: открытие вируса лейкемии кошки в Шотландии группой ученых [1] и выделение вируса иммунодефицита кошки в Калифорнии в 1986 году в колонии кошек с высокой степенью оппортунистических инфекций и дегенеративных поражений, который был назван Т-лимфотропным вирусом кошки [2].

Открытие вируса иммунодефицита кошки привлекло большой интерес многих групп вирусологов и иммунологов для проведения фундаментальных научных исследований, поскольку было установлено, что он является важной биологической моделью для изучения вируса иммунодефицита человека и вируса приобретенного иммунодефицита человека, поскольку очень близок по структуре, жизненному циклу и патогенезу, оба вируса размножаются в Т-лимфоцитах, макрофагах и клетках нервной системы. Важно подчеркнуть, что человек не чувствителен к вирусу иммунодефицита кошки, который инфицирует только представителей семейства Felidae. Экспериментально инфицированные кошки в терминальной стадии проявляют выраженную иммуносупрессию, которая прогрессирует до развития синдрома приобретенного иммунодефицита [3,4,5].

Структура и биология вируса. Вирус иммунодефицита кошки является РНК вирусом из рода *Lentivirus*, в семействе *Retroviridae*. Знание ретровирусной структуры и репликации вируса необходимо для понимания стратегии диагностики, терапии и профилактики инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита кошки. Подобно другим ретровирусам, он имеет трехслойную структуру, диаметр вириона - от 80 до 100 нм. Геном вируса диплоидный, имеет типичную структуру генома ретровирусов и гликопротеидную оболочку. В структуре вируса иммунодефицита кошки имеется три главных гена: *gag*-ген, кодирующий капсидный белок р24, который является важным для диагностики инфекции. Другой, *pol*-ген, кодирует протеазу, интегразу и белки обратной транскриптазы, определяющие вирулентность вируса. Оба гена относительно консервативны по отношению к различным штаммам. Ген *env* кодирует вирусный гликопротеин (gp120) и трансмембранный белок (gp41), которые являются главными детерминантами различий между изолятами. Вирус иммунодефицита кошек имеет пять главных генетически различных субтипов, обозначаемых от А до Е со значительными (до 26%) отличиями нуклеотидных последовательностей, кодирующих вирусную оболочку (*env*-ген) или полимеразу (*pol*-ген). Дополнительно новые субтипы (субтип F и U-NZenv) описаны в Техасе, Новой Зеландии и Португалии [6-10].

Большинство из идентифицированных вирусов иммунодефицита кошки принадлежат к субтипам А или В, име-

ется определенная географическая приуроченность субтипов, что имеет важное значение для ПЦР-диагностики. Например, в Англии обнаружен только субтип А, который является доминантным в Австралии и в других странах, но при этом присутствуют и другие субтипы (Швейцария, Австралия, западная часть США, северная часть Японии, северная часть Германии, Южная Африка), впервые этот тип описан в континентальной Азии. Вирус В-субтипа широко распространен в мире, но наибольшую приуроченность имеет в восточной части Японии, Италии, Португалии и северной части США, в то время как субтип С вируса идентифицирован в Европе, Африке, Канаде и Аргентине. Сообщения о выделении вируса субтипа Д относятся к Японии [6], субтип Е постоянно идентифицируется только в Аргентине [7], и как преобладающий субтип в Бразилии [11]. В Южной Америке обнаруживаются только субтипы В и Е вирусов. Субтип F описан только в Португалии и США, а U-NZenv-субтип только в Новой Зеландии [12,13].

Знание превалентности и вариабельности вируса является важным для конструирования и оценки эффективности вакцин в полевых условиях. Кроме того, идентификация циркулирующих субтипов является существенной для разработки стратегии молекулярной диагностики, поскольку высокое генетическое разнообразие этого вируса приводит к ложно отрицательному диагнозу при использовании в диагностической тест-системе с использованием несоответственного праймера. Вирус не устойчив во внешней среде и чувствителен к различным дезинфектантам.

Эпидемиология. Несмотря на то, что выделение вируса относится к 1986 году, а первые сообщения к 1987 году, ретроспективные серологические исследования показали, что вирус иммунодефицита кошки является эндемиком в популяции кошек во всем мире в течение многих предшествующих лет, причем вариабельность в различных регионах отличается с оценкой от 1 до 14% у кошек, не имеющих клинического проявления и до 44% у больных кошек [14]. Больные взрослые кошки, коты и свободно-бродящие кошки с наибольшей вероятностью могут быть источником инфекции [15]. Главный путь естественной передачи вируса происходит при укусах через слюну во время драки [16]. Коты более часто инфицируются, чем кошки, степень распространения у кошек варьирует географически от 2% до 30% [17]. Вертикальная передача вируса и передача его между кошками в стабильных питомниках относительно редко имеют место. Возникновение естественной инфекции ассоциируется с укусами персистоно инфицированных кошек, преимущественно через инокуляцию вируса или через вирус-инфицированные клетки слюны. Передача вируса от матери котят может иметь место пренатально и постнатально, но при этом только часть потомства становится персистоно инфицированными, что зависит от вирусной нагрузки матери в течение беременности и родов. В естественных условиях не зарегистрированы ни ороназальный, ни венеральный пути распространения, в экспериментальных условиях кошки могут инфицироваться инокуляцией вируса в носовую и ротовую полости, вагину, прямую кишку, и вирус может быть выделен из спермы после естественной и экспериментальной инфекции. Кошки могут инфицироваться во время спаривания при укусах инфицированным котом [18].

Патогенез. Вирус широко распространен в мире в популяции домашних кошек, является Т-лимфотропным, вызывает прогрессирующую дегенерацию иммунных функций, обуславливая вторично возникновение заболеваний причиной которых являются оппортунистические патогены вирусного, бактериального, протозойного и грибкового происхождения. Главными мишенями вируса иммунодефицита кошки являются активированные CD4+ Т-лимфоциты, которые функционируют как типичные Т-хелперы, играющие центральную роль в осуществлении иммунных функций, ответственных за развитие гуморального и клеточного иммунитета.

Также вирус инфицирует перитонеальные макрофаги,

другими клетками-мишенями являются дендритные клетки, астроциты мозга, микроглиальные клетки, мегакариоциты и мононуклеарные клетки костного мозга. Вирус вызывает прогрессивное нарушение клеточного иммунитета за счет истощения CD4 популяции Т-лимфоцитов, при этом механизмы гуморального иммунитета кажутся нормальными или даже гиперстимулированы. Соотношение CD4+(хелперы) к CD8+ (цитотоксические) - лимфоцитам нормальное и составляет 1,7:1 за счет прогрессивного снижения количества CD4+Т-лимфоцитов. Другие иммунологические нарушения, связанные с инфекцией, включают: угнетение blastogenesis лимфоцитов в ответ на Т- и В-клеточные митогены, снижение антительного ответа на Т-зависимые клеточные иммуногены и способности продуцировать и отвечать на интерлейкин-2.

Патогенез FIV-инфекции отражает взаимодействие большого числа факторов, включая возраст животного и время инфицирования, свойства вирусного изолята, количество вируса, используемого для инфицирования, путь инфицирования и инокулят в форме свободного от клеток или ассоциированный с клетками вирус. После экспериментального заражения вирусные частицы проникают в ткани, богатые макрофагами и вирусная репликация затем происходит в клетках-мишенях лимфоидных органов (тимус, селезенка, лимфатические узлы) и других тканях, богатых лимфоцитами. Используя ПЦР или культуру клеток, вирус легко обнаруживается в плазме или в лимфоцитах периферической крови через две недели после инфицирования и даже раньше с пиком виремии в течение нескольких недель после инфицирования. Обычно специфические антитела, преимущественно к капсидным и трансмембранным белкам, у экспериментально инфицированных кошек впервые обнаруживаются через 2–4 недели после заражения. Вирус-нейтрализующие антитела не действуют на клетки и поэтому не элиминируют вирус, их роль в супрессии виремии остается неясной [15,17,19].

Клиническое проявление. Большинство клинических признаков у инфицированных кошек не являются прямой причиной, вызываемых самим вирусом иммунодефицита, во многих случаях они являются результатом вторичной инфекции. Вирус вызывает формирование иммунодефицита, и кошка становится более чувствительной к вторичным инфекциям и неоплазии, а также вирус вызывает иммуностимуляцию с развитием иммунозависимых болезней и может быть в ряде случаев причиной неврологических болезней.

В первые недели после инфицирования клинические признаки проявляются в течение нескольких дней или недель. Они включают лихорадку, летаргию и периферическую лимфаденопатию, гематология обнаруживает нейтропению. Инфицированные кошки обычно остаются здоровыми до проблем, ассоциированных с развитием иммунодефицита. Этот период без проявления клинических признаков может продолжаться годами в большинстве случаев и некоторые кошки не проявляют клинических признаков, вызываемых вирусом [20,21]. Болезнь часто не проявляется до конца жизни, обычно до 4-6-летнего возраста и старше. Иммунодефицитное состояние или иммуностимуляция в большинстве случаев проявляются в форме хронических гингивитостоматитов, хронических ринитов, лимфаденопатии, иммуносвязанными гломерулонефритами и потерей веса. Хронический гингивитостоматит является одним из наиболее частых проявляющихся признаков у инфицированных вирусом кошек. Имеются сообщения о многих вирусных, бактериальных, грибковых и протозойных инфекциях у кошек, инфицированных вирусом иммунодефицита. Исход инфекции зависит от баланса между разрушением вирусом иммунной системы и способностью иммунной системы элиминировать вирус, который инфицирует различные типы клеток в их отношении хозяина, включая CD4+ и CD8+ лимфоциты, В-лимфоциты, клетки нейрональной линии и моноцитарно / макрофагальной линии [22]. Дендритные клетки экспрессируют специфические вирусные рецепторы и в высокой степени инфицируются

вирусом иммунодефицита кошки.

Экспериментальная FIV-инфекция протекает в несколько стадий, подобно HIV-1 у человека. Клинические стадии у кошек включают: острую фазу, клинически бессимптомную фазу различной продолжительности и терминальную фазу инфекции, которую часто анонсируют как приобретенный иммунодефицит кошки. У инфицированных кошек описано большое количество клинико-патологических нарушений, но ни одно не является специфическим [15,17,23,24,25].

Диагностика. Современные методы, используемые для диагностики инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита у домашних кошек, включают изоляцию вируса, иммунологические тесты для выявления специфических антител и молекулярные тесты генома вируса с учетом клинического диагноза. Среди прямых методов детекции наиболее надежным методом диагностики является выделение вируса в культуре лимфоцитов. Процедура является трудоемкой и рутинно не используется. Рутинным тестом для обнаружения антител, распознающих вирусные структурные белки (капсидный белок p24 и пептид gp41) являются ИФА и иммунохроматографические (ИХА) методы [26,27]. Однако, когда результаты этих тестов являются неубедительными, используются более специфические тесты, такие как Вестерн-блот, который рассматривается как "золотой стандарт" для серологических исследований и применяется для подтверждения спорных результатов. ИФА-тесты по обнаружению специфических антител основаны на p24 и трансмембранном антигенах. В сравнении с ИХА-тестами, которые выявляют только антитела к коротким пептидам, относящимся к трансмембранному белку, в Вестерн-блоте очищенный вирус разделяется гелем электрофорезом на его составляющие белки, что позволяет определять антитела к каждому индивидуальному белку вируса. ИФА- и ИХА-тесты применяются в большинстве случаев, но имеют ограничения, потому что их диагностическая специфичность составляет менее 100% [15,28].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) основана на обнаружении провирусной ДНК. ПЦР-тесты вариабельны в выполнении и могут в некоторых случаях по эффективности быть ниже серологических тестов с чувствительностью и специфичностью от 40 до 100% [29,30,31]. ПЦР может давать недостоверные (сомнительные) результаты, из-за высокой генетической вариабельности вируса, используя специфический праймер только для одного субтипа, низкой вирусной нагрузки в течение длительного периода инфекции и неадекватного приготовления ПЦР-компонентов. ПЦР позволяет эффективно выявлять субтип А вируса, но штаммы других субтипов выявляет более вариабельно. Вариабельностью штаммов можно объяснить не совпадающие результаты, когда идентичные образцы передаются для исследования в различных лабораториях [32,33]. Такие результаты могут также иметь место при сравнении результатов серологических исследований с результатами при использовании ПЦР (сероположительные, ПЦР-негативные), что связано с присутствием субтипа вируса, который в большей степени не распознается методом ПЦР. Этот аспект важен в тех случаях, когда кошка может быть вакцинирована против вируса иммунодефицита. Однако, не совпадающие результаты (серонегативные, ПЦР-положительные) могут также наблюдаться при исследовании кошек, находящихся в тесном контакте с вирус-инфицированными серопозитивными кошками. В этом случае, провирус может выявляться в ПЦР без развития обнаруживаемого уровня сывороточных антител или проявления болезни [34]. Эти кошки инфицируются и в большинстве случаев сероконверсия у них развивается от недели до месяцев позднее. В диагностических исследованиях с применением коммерческих тест-систем различной направленности используется кровь и слюна [35,36].

Окончательный диагноз наиболее часто основан на детекции специфических антител в крови. Несмотря на то, что тестирование антител является очень удобным и высоко надежным методом диагностики в ряде ситуаций при

установлении окончательного диагноза оно не является определяющим. Диагностические тесты, применяемые в настоящее время, не различают вакцинированных кошек от инфицированных или от кошек, которые вакцинированы и инфицированы [37]. Положительные тесты на антитела у котят до 6-месячного возраста должны интерпретироваться с учетом полученных материнских антител.

АБСД (European Advisory Board on Cat Diseases) рекомендует, что кошки не должны подвергаться эутаназии из-за положительных результатов вирусной инфекции. Имеются сообщения, что вирус-инфицированные кошки могут жить также долго, как и не инфицированные. Однако инфицированные кошки имеют высокий риск возможности развития клинических признаков главным образом благодаря вторичным инфекциям, иммуносвязанным болезням или неоплазии [38,39,40].

Специфическая профилактика и терапия. Вакцинация против инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита у кошек, является предметом обсуждения. Создание эффективных вакцин против вируса иммунодефицита кошки является трудной задачей, из-за большого числа вариантов штаммов вируса. Вакцины из одного штамма демонстрируют эффективную защиту против гомологичных вирусных штаммов. Инактивированные вакцины применяются в ряде стран, которые индуцируют быстрый гуморальный ответ с образованием антител, которые нельзя дифференцировать от антител, образовавшихся в результате естественной инфекции. Это обстоятельство создает трудности в диагностике, поскольку вакцинированные кошки показывают положительные результаты в диагностических тест-системах. Проблемной является вакцинация кошек в поздней стадии развития инфекции, когда развивается иммунодефицитное состояние. В этом случае иммунная стимуляция, вызванная вакцинацией, может привести к прогрессированию инфекции, стимуляция инфицированных лимфоцитов повышает продукцию вируса. Рекомендуется использование инактивированных вакцин, поскольку у иммуносупрессивных кошек живые вакцины могут сохранять некоторый патогенный потенциал вируса и вызывать клиническую болезнь.

В настоящее время нет пригодных для применения коммерческих вакцин в Европе. Экспериментальные вакцины, индуцирующие защиту против вирус-инфекции у кошек с использованием некоторых иммуногенов, включают инактивированный вирус или вакцины на основе инактивированных инфицированных клеток, субъединичные, пептидные и рекомбинантные векторные вакцины и ДНК-вакцины [41]. Из этих вакцин наиболее успешными являются цельные инактивированные вирус-вакцины, такая коммерческая вакцина применяется в ветеринарии США с 2002 года и с 2004 года - в Австралии и Новой Зеландии. Однако, эффективность вакцин не была тестирована против ряда Европейских полевых изолятов [42]. Также импортированные вакцинированные кошки могут быть не защищены против естественного заражения европейскими вирусными изолятами.

АБСД не рекомендует применение цельных инактивированных вирус-вакцин не принадлежащих Европе, которые создают проблемы, которые ассоциируются с серологической диагностикой инфекции и недостатком их очевидной эффективности против Европейских изолятов вируса иммунодефицита кошки (Guidelines on Feline Infectious Diseases. Feline Immunodeficiency Virus. 2008).

В качестве средств поддерживающей терапии некоторые клиницисты сообщают о пользе применения кортикостероидов и других иммунодепрессивных препаратов у вирус-инфицированных кошек с хроническими стоматитами. Однако, их применение остается дискуссионным, из-за степени потенциального побочного действия. Колонистимулирующий фактор в виде рекомбинантного продукта человека (rHuG-CSF) используется у вирус-инфицированных кошек с глубокой нейтропенией, но препарат может повышать количество нейтрофилов у инфицированных ко-

шек и вирусную нагрузку в мононуклеарных клетках крови, экспрессию вируса инфицированными клетками [43]. Эритропозтин, как рекомбинантный человеческий продукт ((rHuEPO), безопасен для применения и эффективно используется у кошек с нерегенеративной анемией. У вирус-инфицированных кошек, получавших лечение человеческим эритропозтином (100МЕ/кг), наблюдается увеличение количества эритроцитов и лейкоцитов без увеличения вирусной нагрузки [44]. Инсулин-подобный ростовой фактор-1 (IGF), как рекомбинантный человеческий продукт (rHuIGF-1), кроме других действий, вызывает значительное увеличение тимуса и стимулирует Т-клеточную функцию [45].

В США лицензирован лимфоцитарный Т-клеточный иммуномодулятор для лечения кошек, инфицированных вирусом иммунодефицита, который является белком, имеющим одну полипептидную цепь. Препарат получен из стромальных клеток тимуса крупного рогатого скота, является мощным регулятором продукции и функции CD4 лимфоцитов, увеличивает количество лимфоцитов, продукцию ИЛ-2 и ИНФ [46].

Антивирусная терапия. Наиболее часто применяемыми лекарствами для терапии инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита кошки являются ингибиторы обратной транскриптазы, ингибиторы ДНК или РНК-полимеразы, средства, которые ингибируют вирусную репликацию, и интерфероны.

AZT-Zidovudine - зидовудин (3,-азидо-2,3,-дидеокситимидин, АЗТ) является нуклеозидным аналогом (дериват тимидина), который блокирует реверсию транскриптазы ретровирусов. Показано, что он ингибирует репликацию вируса иммунодефицита кошки *in vitro* и *in vivo*, может ограничивать накопление вируса в плазме, улучшая иммунный и клинический статус инфицированных кошек и увеличивает качество жизни. Применяется перорально и парентерально (5-10 мг/кг) [49]. Как и при ВИЧ-инфекции, развиваются АЗТ-устойчивые мутанты к вирусу иммунодефицита кошки, которые могут возникать в течение 6 мес. после начала лечения. Кроме АЗТ в качестве нуклеозидных аналогов ингибиторов обратной транскриптазы испытываются ставудин, диданозин, ламивудин, эмтрицитабин, абакавир, эффективность которых показана *in vitro*. Нуклеотидные аналоги ингибиторов обратной транскриптазы включают адефовир, тенофовир, но их эффективность для терапии инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита кошки, с переменным успехом показана только *in vitro*. В стадии исследований по оценке эффективности находятся ингибиторы нуклеотидного синтеза, ингибиторы протеазы и интегразы [47,48].

AMD3100,1,1,- [1,4-phenylenbis (methylene)] bis-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecene octahydrochloride, JM3100, SID791 принадлежит к новому классу бициклических соединений, который действует как селективный антагонист. AMD3100 не лицензирован как антивирусное соединение, но как активатор стволовых клеток для пациентов, которые перенесли трансплантацию костного мозга. Он эффективен против вируса иммунодефицита кошки *in vitro* и при лечении естественно инфицированных кошек (0,5 мг/кг), вызывает статистически выраженное улучшение клинических признаков и снижение провирусной нагрузки у инфицированных кошек. У кошек, получавших AMD3100, не наблюдается побочных эффектов [49].

Интерфероны играют важную роль в развитии антивирусного ответа и модуляции иммунного ответа и поэтому находят применение при терапии инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита кошки. Рекомбинантный ИНФ-омега кошки имеет рыночный характер применения в Японии, Австралии и лицензирован во многих Европейских странах для использования кошкам и собакам. Интерфероны видоспецифичны, поэтому кошачий интерферон - омега может применяться парентерально без ограничений периода времени, поскольку у кошек не образуются анти-ИНФ-антитела [50].

Рекомбинантный человеческий интерферон-альфа име-

ет иммуномодулирующий эффект, но также действует как истинный антивирусный препарат, индуцируя защиту клеток от вирусной репликации [51]. Два обычных режима существует для применения человеческого интерферона-альфа у кошек: подкожная инъекция в высокой дозе (10^4 - 10^6 МЕ/кг каждые 24 часа) или пероральная аппликация в низкой дозе (1 до 50 МЕ/кг каждые 24 часа). При подкожном введении препарата в высокой дозе в течение трех-семи недель снижалась его эффективность благодаря формированию нейтрализующих антител. Поэтому пероральное введение является предпочтительным при длительном курсе лечения, проявляя иммуномодулирующую активность за счет стимуляции местных лимфоидных тканей в ротовой полости [52,53].

Заключение

До настоящего времени вирус иммунодефицита кошки является главным вирусным патогеном в популяции кошек различных стран мира. Продолжаются исследования по разработке эффективных методов диагностики, средств терапии и иммунопрофилактики вирусной инфекции, использовании вируса как биологической модели вируса иммунодефицита человека и вируса приобретенного иммунодефицита человека, по созданию эффективных иммунофармакологических препаратов и вакцин.

Литература/References

- Jarrett, W.F.H. A virus-like particle associated with leukemia (lymphosarcoma). //W.F.H.Jarrett, E.M.Crawford, W.B.Martin, F.Davie// Nature.-1964.-202.-P.567-568.
- Pedersen, N.C. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome.//N.C.Pedersen, E.W.Ho, M.L.Brown, J.K.Yamamoto //Science.-1987.- 235.- P.790-793.
- Gardner, M.B. Simian and feline immunodeficiency viruses: animal lentivirus models for evaluation of AIDS vaccines and antiviral agents.//Antiviral. Res.-1991.-15(4).- P.267-286.
- Beninelli, M. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for A.IDS studies and an important cat pathogen.//M.Beninelli,M.Pistello, S.Lombardy, A.Poli, C.Garselli, D.Matteucci, L.Ceccherini-Nelli, G.Malvaldi, F.Tozzini //Clin.Microbiol..Rev.-1995.- 8.-87.-P.112.
- Miller, R.J. Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses.//R.J.Miller, S.Cairns, S.Btidges, N.Sarver // J.Virol.-2000.-74.-P.7187-7195.
- Kakinuma, S. Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-Japanese subtypes.//S.Kakinuma., K.Motokawa, T.Hohdatsu [et al.]/ J.Virol.-1995.- 69.-P.3639-3646.
- Pecoraro, M.R. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. //M.R.Pecoraro, K.Tomonaga, T.Miyazawa [et al.] //J.Gen.Virol.-1996.-77.- (9).-P.2031-2035.
- Bachman, M.H. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades.//M.H.Bachman, C.Mathiason-Dubard, G.H.Learn [et al.] / J.Virol.-1997.-74.-P.4241- 4253.
- Duarte, A. Phylogenetic analysis of Portuguese feline immunodeficiency virus sequences reveals high genetic diversity.//A.Duarte, L.Tavers //Vet. Microbiol.-2006.-114.-P. 25-33.
- Sykes, J.E. Feline Immunodeficiency Virus Infection. In Book: Canine and Feline Infectious diseases.-2014.- pp.209-223.
- Teixeira, B.M. Feline Immunodeficiency Virus in South America.//B.M.Teixeira B, M.K.Hagiwara, J.C.M.Cruz, M.J.Hosie //Viruses.-2012.-4.-P.383-396.
- Hayward, J.J. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of New Zealand.//J.J.Hayward, J.Taylor, A.G.Rodrigo.//J.Virol.-2007.-81.-P.2999-3004.
- Zhang, J. First Molecular Characterization of Feline Immunodeficiency Virus in Domestic Cats from Mainland China. //J.Zhang, L.Wang, J.Li, P.Kelly, S.Price, C.Wang.//PloS ONE.-2017.-12(1).
- Hartmann, K. Feline immunodeficiency virus infection: An Overview. // Vet.J.-1998.- 155 (2).- P.123-137.
- Hosie, M.J.. Feline Immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. M.J.Hosie, D.Addie, S.Belak, C.Boucraut-Baralon, H.Egberinc [et al.]/J.Feline Med.Surg.-2009.- 11 (7).- P. 575-584.
- Yamamoto, J.K. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from Continental United States and Canada and possible mode transmission. //J.K.Yamamoto, H.Hansen, E.W.Ho T.Y.Morishita [et al.] //JAm.Vet.Med.Assoc.1989.-194 (2).-P.213-220.
- Sellon, R.K. Feline Immunodeficiency Virus Infection. //R.K.Sellon, K.Hartmann. //In Infectious Diseases of the Dogs and Cats; Greene C.E.,Eds.; Philadelphia: W.B. Saunders Co.-2006.- pp.131-143.
- Jordan, H.L. Feline immunodeficiency virus shed in semen from experimentally and naturally infected cats. AIDS //H.L.Jordan, J.Howard, M.C.Bar [et al.] //Res.Hum.Retroviruses.-1998.-14.- P.1087-1092.
- Torten, M. Progressive immune dysfunction in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus.//M.Torten, M.Franchini, J.E. Barlough [et al.] // J.Virol.-1991.- 65 (5).-P.2225-2230.
- Pedersen, N.C. Feline immunodeficiency virus infection.//N.C.Pedersen, J.K.Yamamoto, T.Ishida, H.Hansen.//Vet.Immunol.Immunopathol.-1989.-21.-P.111-129.
- Ishida, T. Long-term clinical observations on feline immunodeficiency virus infected asymptomatic carriers.//T.Ishida, A.Taniguchi, S.Matsumura [et al.] //Vet.Immunol.Immunopathol.-1992.-35.-P.15-22.
- English, R.V. In vivo lymphocyte tropism of feline immunodeficiency virus.//R.V.English, C.M.Jonson, D.H.Gebhard, M.B.Tompkins//J.Virol.-1993.-67.-P.5175-5186.
- del Fierro, G.M. Quantification of lymphadenopathy in experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in domestic cats.//G.M.del Fierro, J.Meers, J.Tomas B.Chadwick [et al.]/Vet. Immunol.Immunopathol.-1995.-46.-P.3-12.
- Hartmant, K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. Vet.Immunol.Immunopathol.-2011.-143 (3-4).- P.190-201.
- Alves, F., J.K.Pimenta dos Reis. Feline Immunodeficiency. In: K.Metodiev. Immunodeficiency.-2012.-.P.357-354.
- Novo, S.G. Viral diagnostic for Feline immunodeficiency virus and Feline leukemia virus infections in domestic cats from Buenos Aires, Argentina.// S.G.Novo, D.Bucafusco, L.M.Diaz, A.C.Branich. //Rev.Argent.Microbiol.-2016.-48 (4).-P.293-297.
- Westman, M.E. Determining the feline immunodeficiency virus (FIV) status of FIV-vaccinated cats using point-of-care antibody kits. //M.E.Westman, R.Malik, E.Hall, P.A.Sheehy. //Comp. Immunology, Microbiol.Inf.Dis.-2015.-42.- P.43-52.
- Lutz, H. Specificity Assessment of Feline T-lymphotropic lentivirus Serology. //H.Lutz, P.Arnold, U.Hubscher, H.Egberinc [et al.]/Zbl.Vet.Med.-B.1988.-35.- P.773-778.
- Bienzie, D. The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection D.Bienzie, F.Reggeti, X.Wen [et al.]/ Canadian Vet.J.-2004.-45.-P.753-757.
- Levi, J.K. Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. //J.K.Levi, P.C.Crawford, M.R.Slater. // J.Am.Vet.Med.Ass.-2004.-225.-P.1558-1561.
- MacDonald, K. Effects of passive transfer of immunity on results of diagnostic tests for antibodies against feline immunodeficiency virus in kittens born to vaccinated queens.//K.MacDonald, J.K.Levi, S.J.Tucker, P.C.Crawford. //J.Am.Vet.Med.Ass.-2004.-225.-P.1554-1557.
- Crawford, P.C. Accuracy of polymerase chain reaction assays for diagnosis of feline immunodeficiency virus infection in cats.//P.C.Crawford. M.R.Slater, J.K.Levi. //J.Am.Vet.Med.Ass.-2005.-226 (9).-P.1503-1507.
- Crawford, P.C. New challenges for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection //P.C.Crawford, J.K.Levi. //Vet.Clin. North Am. Small Anim.Pract. -2007.- 37 (2).-P.335-350.
- Dandekar, S. Detection of feline immunodeficiency virus (FIV) nucleic acids in FIV-seronegative cats.//S.Dandekar, A.M.Beebe, J. Barlough [et al.] //J.Virol.-1992.-66.- P.4040-4049.
- Westman, M.E. Diagnosing feline immunodeficiency virus (FIV) infection in FIV-vaccinated and FIV-unvaccinated cats using saliva.//M.E.Westman, R.Malik, E.Hall, J.M.Norris.//Comp. Immunol. Microbiol.Infect.Dis.-2016.-46.-P.66-72. 36.Westman, M.E. Diagnosing feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukaemia virus (FeLV) infection: an update for clinicians. //M.E.Westman, R.Malik, J.M.Norris.// Austr.Vet.J.- 2019.-97 (3).-P.47-55
- Richards, J.R. Feline immunodeficiency virus vaccine: implications for diagnostic testing and disease management.//Biologicals.-2005.-33 (4).- P.215-217.
- Lutz, H. Felines T-lymphotropes Lentivirus (FTLV): Experimentelle Infektion und Vorkommen in einigen L?ndern Europas.//H.Lutz, H.Egberinc, P.Arnold G.Wincler [et al.]/Kleintierpraxis.-1988.-33.-P.455-459.
- Addie, D.E. Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus.//D.E.Addie, J.M.Dennis, S.Toth [et al.]/Veterinary Record.-2000.-146.-P.419-424.
- Levy, J. 2001 Report of the American Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on feline retrovirus testing and management.//J.Levy, J.Richards, D.Edwards, T.Elston [et al.]/J.Feline Med.Surg.-2003.-5 (1).-P.3-10.
- Hosie, M.J. Vaccine protection against feline immunodeficiency virus-setting the challenge.//M.J.Hosie, J.A.Beatty. //Aus.Vet.J.-2007.-85.-P. 5-12.
- Dunham, S.P. Limited efficacy of inactivated feline immunodeficiency virus vaccine.//S.P.Dunham, J.Bruce, S.Mackay [et al.]/Vet.Rec.-2006.-158.-P.561-562.
- Phillips, K. FIV-infected cats respond to short-term rHuG-CSF neutralizing antibody production that inactivates drug activity.//K.Phillips, M.Arai, T.Tanable, R.Raskin [et al.]/Vet.Immunol.Immunopathol.-2005.-15.-108 (3-4).-P.357-371.
- Aral, M. The use of human hematopoietic growth factors (rHG-CSF and rEPO) as a supportive therapy for FIV-infected cats.//M.Aral, J.Darman, A.Lewis J.K.Yamamoto.//Vet.Immunol. Immunopathol.-2000.-77 (1-2).-P.71-92.
- Woo, J.C. Investigation of recombinant human insulin-like growth factor type 1 in thymus regeneration in the acute stage of experimental FIV infection in juvenile cats.//J.C.Woo, G.A.Dean, A. Lavoy, R.Clark, P.F.Moore.//AIDS Res. Hum. Retroviruses.-1999.-15 (15).-P.1377-1388.
- Gingerich, D.A. Lymphocyte T-Cell Immunomodulator (LTCI): Review of the Immunopharmacology of a New Veterinary Biolog.// Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.-2008.-vol.6.-No2.-P.61-68.
- Hartmann, K. AZT in treatment of feline immunodeficiency virus infection: Part 2.//K.Hartmann, A.Donath, W.Kraft.//Feline Pract.-1995.-23.-P.13-20.
- Hartmann, K. Efficacy of Antiviral Drugs against Feline Immunodeficiency Virus.//K.Hartmann, A.Wooding, M.de Bergmann.//Vet.Sci.-2015.-2.-P.456-476.
- Hartmann, K. Efficacy of the chemokine receptor inhibitor 1,1-bis-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan against feline immunodeficiency virus infection.//K.Hartmann, S.Stengel, D.Klein [et al.]/Abstract, 6th Intern.Fel.Retrovirus Res.Symp.Amelia Island.-2002.-26.
- de Mari, K. Therapeutic effects of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats.//K.de Mari, L.Maynard, A.Sanquer, B.Lebreau, H.M.Eun. //J.Vet.Intern.Med.-2004.-18 (4).-P.472-482.
- Tomkins, W.A. Immunomodulation and therapeutic effects of the oral use of interferon-alpha: mechanism of action. //J.Interferon Cytokine Res.-1999.-19 (8).-P.817-828.
- Cummins, J.M. Oral use of interferon //J.M.Cummins, M.W.Beilharz, S.Krakowka. // J.Interferon Cytokine Res.-1999.-19.-P.853-857.
- Pedretti, E. Low-dose interferon-alpha treatment for feline immunodeficiency virus infection.//E.Pedretti, B.Passerri, M.Amadori, P.Isola [et al.]/Vet.Immunol.Immunopathol.-2006.-109.-P.245-254.

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-16
УДК: 57.055.

Опыт применения стимулирующей подкормки для медоносных пчел "БиХит" в Московской области и Республике Крым



Фролова М.А.
Frolova M.A.

Фролова М.А., д.б.н., в.н.с. отдела получения биологически активных веществ
Албулов А.И., д.б.н., профессор, зав. отделом получения биологически активных веществ
Ковалева Э.И., м.н.с. отдела получения биологически активных веществ
Елисеев А.К., к.б.н., с.н.с. отдела получения биологически активных веществ
Гринь А.В., к.б.н. с.н.с. отдела получения биологически активных веществ
ФГБНУ ВНИТИБП РАН, М.О, Щелковский район, п. Биокомбината, д.17, ВНИТИБП, e-mail: vnitibp@mail.ru

Ключевые слова: полифункциональная стимулирующая подкормка "БиХит", медоносная пчела, сила пчелосемьи, количество печатного расплода, сохранность пчёл, медопродуктивность.

Резюме. Неблагоприятные факторы окружающей среды: пестициды, химические препараты, некачественное питание пчелиных семей приводят к снижению иммунной защиты пчелы. В настоящее время ведется непрерывный поиск биологически активных веществ, стимулирующих жизнедеятельность пчел и повышающих яйцекладку маток. Анализ данных научных источников показал высокую эффективность для стимуляции жизнеспособности и повышения продуктивности пчел таких биологически активных добавок, как хитозан и его производные, пробиотические штаммы бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, а также источников жизненно необходимых аминокислот. Накопленный к настоящему времени опыт применения хитозана и его производных в ветеринарии позволяет отнести хитозан к эффективным адаптогенам с полифункциональными свойствами, способным обеспечивать резистентность организма к многочисленным неблагоприятным факторам внешней среды и к возбудителям различных заболеваний. За счет избыточного положительного заряда хитозан приобретает свойства высокоактивного анионита, связывающего и прочно удерживающего ионы различных тяжелых металлов, радиоактивных изотопов, токсичных элементов с последующим выведением их из организма животных, в том числе и пчелы. Хитозан и его производ-

Experience of using stimulating feeding for honey bees "BiHit" in the Moscow region and the Republic of Crimea

Frolova M.A., Doctor of Biological Sciences, Leading Scientist of the Department for the Production of Biologically Active Substances

Albulov A.I., Doctor of Biological Sciences, Professor, Head. Department for the production of biologically active substances

Kovaleva E.I., junior researcher Department for the production of biologically active substances

Eliseev A.K., Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher Department for the production of biologically active substances

Grin A.V., Ph.D. senior researcher Department for the production of biologically active substances

Federal State Budgetary Scientific Institution VNITIBP RAS, 17, Biokombinata, , Shchelkovsky District, Moscow Region, 141142, Russia, e-mail: vnitibp@mail.ru

Key words: multifunctional stimulating feeding "BiHit", honey bee, strength of bee colony, amount of printed brood, safety of bees, honey productivity.

Abstract. Unfavorable environmental factors: pesticides, chemicals, poor nutrition of bee colonies lead to a decrease in the bee's immune defense. Currently, there is a continuous search for biologically active substances that stimulate the vital activity of bees and increase the egg-laying of queens. Analysis of scientific sources data has shown high efficiency for stimulating the viability and increasing the productivity of bees of such biologically active additives as chitosan and its derivatives, probiotic strains of bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, as well as sources of vital amino acids. The experience accumulated to date in the use of chitosan and its derivatives in veterinary medicine makes it possible to classify chitosan as an effective adaptogen with multifunctional properties capable of providing the body's resistance to numerous adverse environmental factors and pathogens of various diseases. Due to the excess positive charge, chitosan acquires the properties of a highly active anionite. It binds and firmly holds ions of various heavy metals, radioactive isotopes, toxic elements with their subsequent removal from the body of animals, including bees. Chitosan and its derivatives have high antibacterial, sorption, fungicidal, antiviral activity, being a natural biocompatible product that is biodegradable to CO₂ and H₂O and does not pollute the environment. To stimulate the vital activity of bees and increase the egg-laying of queens, stimulating protein supplements are needed to cover the lack of vital amino acids, probiotic preparations that improve the microbiocenosis of the intestines of bees, sugar syrup.

Earlier, at the preliminary stage of research, we developed a recipe for stimulating feeding for bees "BiChit", which includes low molecular weight chitosan, chitosan succinate, dry bacterial mass of *Bacillus subtilis* VKM B-2716D and *Bacillus licheniformis* VKM B-2717D, lactose-free edible glucose hydrolyzate, lactose-free whey. In this work, the influence of the multifunctional stimulating feeding "BiHit" on the economically useful traits of bee colonies based on private apiaries in the Moscow region and the Republic of Crimea has been studied. Studies have shown a positive effect of feeding on family strength, brood and honey production.

Для цитирования / For citation

Опыт применения стимулирующей подкормки для медоносных пчел "БиХит" в Московской области и Республике Крым/Фролова М.А. [и др.] // Ветеринария и кормление. - 2021. - №1 - С. 57-59.
Experience of using stimulating feeding for honey bees "BiHit" in the Moscow region and the Republic of Crimea / Frolova M.A. [and others] // Veterinary medicine and feeding. - 2021. - No.1. - P. 57-59.

ные обладают высокой антибактериальной, сорбционной, фунгицидной, противовирусной активностью, являясь естественным биосовместимым и биodeградируемым до CO₂ и H₂O продуктом, не загрязняющим окружающую среду. Для стимуляции жизнедеятельности пчел и повышения яйцекладки маток необходимы стимулирующие белковые подкормки, позволяющие покрывать недостаток в жизненно важных аминокислотах, пробиотические препараты, улучшающие микробиоценоз кишечника пчел, сахарный сироп. Ранее на предварительном этапе исследований нами была разработана рецептура стимулирующей подкормки для пчел "БиХит", включающая низкомолекулярный хитозан, сукцинат хитозана, сухую бактериальную массу *Bacillus subtilis* ВКМВ-2716D и *Bacillus licheniformis* ВКМВ-2717D, гидролизат безлактозной молочной сыворотки, пищевую глюкозу. В данной работе на базе частных пасек в Московской области и Республике Крым изучено влияние полифункциональной стимулирующей подкормки "БиХит" на хозяйственно полезные признаки пчелиных семей. Исследования показали положительное влияние подкормки на силу семей, расплод и медопродуктивность.

Пчелы являются самыми полезными насекомыми в мире и играют особую роль в повседневной жизни человека. Благодаря этим насекомым мы получаем не только полезные пчеловодческие продукты, но и опыление 80–95% цветков энтомофильных растений, а это 80% всего объема культурных растений. Практически все они являются кормовой базой для животных и человека. Важным периодом в жизнедеятельности пчелиных семей является благополучная зимовка. От ее исхода в значительной мере зависит дальнейшая продуктивность и развитие пчелиных семей. Успешная зимовка позволяет эффективно использовать пчел в весенне-летний период на медосборе и опылении сельскохозяйственных культур [1, 2].

В современном пчеловодстве массовая потеря пчелиных семей является основной проблемой. В период зимовки ежегодно теряется 20–30% пчелосемей, а к началу весны пчелы заметно ослаблены. Для обеспечения достаточного количества рабочей пчелы ко времени массового медосбора необходимо стимулировать процесс яйцекладки пчелиной маткой [3].

Принос нектара и пыльцы в улей стимулирует жизнедеятельность пчел, повышает яйцекладку маток. С уменьшением или прекращением медосбора кладка яиц уменьшается или вовсе прекращается – рост семей замедляется. Многие пчеловоды, пытаясь увеличить число пчел весной (к началу медосбора) или осенью (для усиления семей к зимнему периоду), подкармливают пчелиные семьи малыми дозами сахарного сиропа, имитируя поддерживающий медосбор. Кроме того, для стимуляции развития пчелиных семей сироп обогащают белками, жирами, витаминами, гормонами, антибиотиками, минеральными веществами [4].

Для стимуляции яйцекладки в весенний период широко используют подкормку сахарным сиропом, которая компенсирует отсутствие взятка, но не обеспечивает полноценное

питание белковым кормом [5]. Между тем, прибавление к корму белковых веществ повышает содержание белка в теле пчелы, способствует увеличению расплода. Матка вообще может не начать засев, если нет белкового корма.

Для устранения дефицита белка используют стимулирующие витаминно-минеральные и белковые подкормки. С этой целью в сахарный сироп добавляют цветочную пыльцу, обезжиренное молоко, препараты белка. В настоящее время в качестве замены пыльцы в ранневесенний период все чаще применяют пивные дрожжи, соевую муку, молочную сыворотку [6].

Важнейшим условием существования пчел является постоянное обеспечение их пыльцой. В организме пчел белки пыльцы расщепляются на аминокислоты, которые в дальнейшем используются на построение тела пчелы. В составе поступающих в организм аминокислот должны обязательно присутствовать в готовом виде следующие 10 незаменимых аминокислот, синтез которых в организме пчел невозможен: аргинин, гистидин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан и валин [7].

Белок необходим так же вышедшим из ячеек молодым пчелам, так как глоточные железы у них развиваются до нормальных размеров только после поедания протеинов. При недоразвитии глоточных желез пчелы не в состоянии выкармливать расплод, а в последующем участвовать в инвертировании сахаров нектара. Отложенный в таких случаях в ячейки мед содержит повышенное количество воды и обычно не запечатывается пчелами. Аналогичная зависимость развития от белка наблюдается у восковыделительных желез, при их недоразвитии снижается отстройка сотов. Снижают так же свои функции пищеварительные и половые железы рабочих пчел и матки [8].

Неблагоприятные факторы окружающей среды: пестициды, химические препараты, некачественное питание пчелиных семей приводят к снижению иммунной защиты пчелы [9,10]. В настоящее время ведется непрерывный поиск биологически активных веществ, стимулирующих жизнедеятельность пчел и повышающих яйцекладку маток.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили в условиях частных пасек Московской области и Республики Крым.

На базе частной пасеки Московской области был проведен опыт в период с 28.05.18 по 28.06.18 с целью изучения влияния стимулирующей подкормки "БиХит" на хозяйственно полезные признаки пчелиных семей. Было сформировано 2 группы пчел (контрольная и опытная) по 3 пчелосемьи в каждой. Контрольная группа получала 60%-ный сахарный сироп, опытная – 60%-ный сахарный сироп с добавлением 4-х г подкормки "БиХит" на 1 л сахарного сиропа (из расчета 1 литр сахарного сиропа на 10000 пчел) один раз в неделю в течение месяца. Учет силы, яйценоскости маток и медопродуктивности пчелосемей проводили в начале опыта и по истечении 30 дней.

Изучение влияния стимулирующей подкормки "БиХит" на хозяйственно-полезные признаки пчелиных семей на базе частной пасеки в Республике Крым проводили в период с 18.03.19 по 18.04.19. Были сформированы группы пчел: контрольная и опытная – по 13 пчелосемей в каждой. Контрольная группа получала 60%-ный сахарный сироп, опытная 60%-ный сахарный сироп с добавлением подкормки "БиХит" в количестве 4 г на 1 л сахарного сиропа. Сахарный сироп давали из расчета 1 литр сахарного сиропа на 10000 пчел один раз в неделю в течение месяца. Учет силы семьи и яйценоскости маток проводили в начале, в середине и в конце опыта.

Таблица 1. Влияние полифункциональной подкормки «БиХит» на хозяйственно полезные признаки пчелиных семей в условиях частной пасеки (Московская обл.)
Tabl 1. Influence of BiHit multifunctional feeding on economically useful traits of bee colonies in a private apiary (Moscow region)

Группа	Сила семей (количество улочек)	Расплод (колич. ячеек)	Мед, кг
28.05.18г (начало опыта)			
Контрольная (n=3)	4,5	17771	-
Опытная(n=3)	5,0	14607	-
26.06.18г (конец опыта)			
Контрольная (n=3)	7,7	26795	5,4
Опытная(n=3)	10,3	32885	8,1

Таблица 2. Влияние полифункциональной подкормки «БиХит» на хозяйственно полезные признаки пчелиных семей в условиях частной пасеки (Республика Крым)

Tabl 2. Influence of BiHit multifunctional feeding on economically useful traits of bee colonies in a private apiary (Republic of Crimea)

Группа	Сила семей (колич. улочек)	Расплод (колич. ячеек)
18.03.19г (начало опыта)		
Контрольная (n=3)	2,9	2820
Опытная(n=3)	2,9	2641
28.03.19г (середина опыта)		
Контрольная (n=3)	3,0	6339
Опытная(n=3)	3,2	7112
18.04.19г (конец опыта)		
Контрольная (n=3)	6,5	16723
Опытная(n=3)	7,1	18199

Результаты исследования и их обсуждение

Как показал анализ данных научных источников высокую эффективность для стимуляции жизнеспособности и повышения продуктивности пчел имеют такие биологические добавки, как хитозан и его производные, пробиотические штаммы бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, а также источники жизненно необходимых аминокислот.

В результате проведенных предварительных исследований по изучению эффективности полифункциональной подкормки "БиХит" для пчел была разработана ее рецептура, включающая сухую бактериальную массу *Bacillus subtilis* ВКМ В-2716D и *Bacillus licheniformis* ВКМ В-2717D, сукцинат хитозана, низкомолекулярный хитозан, гидролизат безлактозной молочной сыворотки, пищевую глюкозу.

С целью изучения влияния полифункциональной подкормки "БиХит" на хозяйственно полезные признаки пчелиных семей на базе частной пасеки Московской области нами был проведен опыт в период с 28.05.18 по 28.06.18. Полученные результаты представлены в таблице 1. Из данных, приведенных в таблице 1, видно, что контрольная группа по силе пчелосемей и количеству расплода увеличилась на 71,1% и 50,8%, а опытная на 106% и 125,1%, соответственно, по сравнению с началом опыта. Скармливание полифункциональной подкормки "БиХит" опытной группе оказало положительное влияние на медопродуктивность пчелосемей (в 1,5 раза).

На базе частной пасеки в Республике Крым был проведен опыт в период с 18.03.19 по 18.04.19 с целью изучения влияния полифункциональной подкормки "БиХит" на хозяйственно полезные признаки пчелиных семей (Таблица 2). Из данных, представленных в таблице 2, видно, что уже к середине опыта сила семей и расплод увеличились в контрольной группе на 3,4%, 124,8% и опытной группе на 10,3%, 169,3%, соответственно. К концу опыта показатели силы семьи и расплод пчелосемей в контрольной группе увеличились на 24,1 % и 493,0%, а в опытной – на 44,8% и 589,1%, соответственно.

Таким образом, полученные нами результаты исследований свидетельствуют о положительном влиянии на хозяйственно полезные признаки пчелиных семей полифункциональной стимулирующей подкормки для медоносных

пчел "БиХит". На полифункциональную подкормку для медоносных пчел "БиХит" получен патент РФ № 2687457.

Литература

1. Дайана Кокс-Фостер, Деннис ВанЭнгельсдорп. Спасаем пчелу. Scientific American. 2009,300 (4), 40-47. DOI: 10.1038 / scientificamerican 0409-40
2. Хамадиева А.Р., Кутлин Н.Г., Шареева З.В., Назмиев Б.К. Влияние препарата на основе хитозана на зимостойкость пчел. Пчеловодство. 2012, (3), 18-19.
3. Горлов, И.Ф. Инновационные способы повышения эффективности производства и переработки продукции пчеловодства / И.Ф. Горлов, А.А. Мосолов // Волгоград, 2013.-144с
4. Биляш Н. Г., Игнатов С. В., Любимов Е. М. Изучение влияния различных белковых компонентов в углеводном корме, как стимуляторов яйценоскости маток // Материалы Международной конференции "Пчеловодство - XXI век. Пчеловодство, апitherapia и качество жизни". - Москва, 2010. С. - 24-27.
5. Комлацкий. В.И.Справочник пчеловода / В.И. Комлацкий, С.В. Логинов, С.В.Свистунов //Ростов-на-Дону, "Феникс". - 2012. - 447 с.
6. Ивойлова, М.М.Эффективность использования стимулирующих подкормок органического происхождения для медоносных пчел/ М.М. Ивойлова, А.З. Брандорф, А.В. Пральников // "Проблемы и перспективы сохранения генофонда медоносных пчел в современных условиях". - Киров. - 2014. - С. 14.
7. Ивановский, Ю.А. Справочник пчеловода / Ю. А. Ивановский - СПб.: Издательство "ДИЛЯ", 2005. - 240 с.
8. Садовникова Е.Ф. Применение белково - витаминно - минеральных добавок в кормлении пчел. Е. Ф. Садовникова, И.П. Захарченко, О. К. Чупахина, С. С. Виличинская // Ученые записки учреждения образования витебская ордена знак почета государственная академия ветеринарной медицины. - 2012. - №2-2. С. 143-145.
9. Салтыкова Е.С., Гайфуллина Л.Р., Гатауллин А.Р., и др. Хитозан как основа иммуномодулирующего препарата для пчел. Известия Уфимского научного центра РАН. 2016, (1), 157-159.
10. Мосолов А.А. Инновационные способы повышения эффективности производства и переработки продукции пчеловодства: диссертация ... доктора биологических наук. Волгоград. научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции РАСХН, Волгоград, 2014.

References

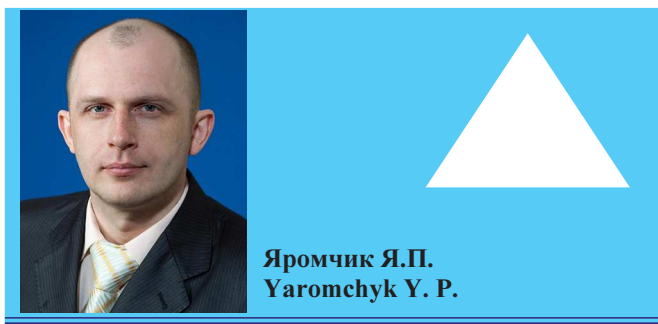
1. Diana Cox-Foster, Dennis VanEngelsdorp. Saving the honeybee. Scientific American. 2009,300 (4), 40-47. DOI: 10.1038 / scientificamerican0409-40
2. Khamadiev A.R., Kutlin N.G., Shareeva Z.V., Nazmiev B.K. The effect of a preparation based on chitosan on the winter hardiness of bees. Beekeeping. 2012, (3), 18-19.
3. Gorlov, I.F. Innovative ways of increasing the efficiency of production and processing of beekeeping products / I.F. Gorlov, A.A. Mosolov // Volgograd, 2013.-144s
4. Bilash N. G., Ignatov S. V., Lyubimov E. M. Study of the influence of various protein components in carbohydrate feed as stimulators of egg production of queens // Materials of the International conference "Beekeeping - XXI century. Beekeeping, Apitherapia and Quality of Life". - Moscow, 2010. S. - 24-27.
5. Komlatsky. V.I. The beekeeper's handbook / V.I. Komlatsky, S.V. Loginov, S.V. Svistunov // Rostov-on-Don, "Phoenix". - 2012. -- 447 p.
6. Ivoilova, MM The efficiency of using stimulating fertilizing of organic origin for honey bees / MM. Ivoilova, A.Z. Brandorf, A.V. Pralnikov // "Problems and prospects of preserving the gene pool of honeybees in modern conditions." - Kirov. - 2014. -- P. 14.
7. Ivanovsky, Yu.A. Beekeeper's guide / Yu. A. Ivanovsky - SPb.: Publishing house "DILYA", 2005. - 240 p.
8. Sadovnikova E.F. Application of protein - vitamin - mineral supplements in bee feeding. E. F. Sadovnikova, I. P. Zakharchenko, O. K. Chupakhina, S. S. Vilichinskaya // Scientific notes of the educational institution Vitebsk Order badge of honor State Academy of Veterinary Medicine. - 2012. - No. 2-2. S. 143-145.
9. Saltykova ES, Gaifullina LR, Gataullin AR, et al. Chitosan as the basis of an immunomodulatory drug for bees. Bulletin of the Ufa Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. 2016, (1), 157-159.
10. Mosolov A.A. Innovative ways to improve the efficiency of production and processing of beekeeping products: dissertation ... Doctor of Biological Sciences. Volgograd. Research Institute for the Production and Processing of Meat and Dairy Products of the Russian Academy of Agricultural Sciences, Volgograd, 2014.

Журнал «Ветеринария и кормление»:
оказываем услуги по верстке и печати книг, методичек, брошюр,
и другой полиграфической продукции.
Присваивается DOI с размещением в CrossRef.
Бюджетные цены, высокое качество, ответственное исполнение.
Доставка во все регионы России

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2021-1-17

УДК: 619:615.371:616.98:578.823.9:579.842.11

Выбор оптимальной дозы применения ассоциированной вакцины против рота-, коронавирусной инфекции и колибактериоза телят



Яромчик Я.П.
Yaromchyk Y. P.

Яромчик Я.П., кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней;
Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой эпизоотологии и инфекционных болезней животных ORCID ID: 0000-0002-4641-4757
Красочко П.П., доктор биологических наук, доцент, заведующий отраслевой лабораторией ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных;
Еремец В.И., доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела обеспечения качества лекарственных средств для животных;
Скотникова Т.А., доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела обеспечения качества лекарственных средств для животных
 УО "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", ул.Доватора 7/11, г. Витебск, 210026,
 Республика Беларусь e-mail: yaromchykyroslau@mail.ru
 ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности" г.Щелково, email: vnitibp@mail.ru

Ключевые слова: вакцина, адъювант, доза, инфекционный энтерит, телята.

Резюме. Основным условием выбора средств специфической профилактики против колибактериоза (эшерихиоза) крупного рогатого скота является необходимость совпадения антигенного спектра штаммов, входящих в вакцину с эпизоотическими, выделяемых диагностическими ветеринарными учреждениями из патологического материала, отобранного от павших телят. Только в этом случае следует ожидать высоких результатов профилактической эффективности применяемых биопрепаратов. Конструирование вакцин на основе факторов патогенности возбудителей болезни является наиболее перспективным направлением при проведении разработки новых средств специфической профилактики инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. Отработка оптимальных

Selection the optimal dose of application associated vaccine against rota-, coronavirus infection and colibacillosis in calves

¹Yaromchyk Y. P., ¹Krasochko P. A., ¹Krasochko P. P., ²Eremets V.M., ²Skotnikova T.A.

¹Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Bela-rus e-mail: yaromchykyroslau@mail.ru
²FSBSI All-Russian Research and Technological Institute of Biological Indus-try, Shchelkovo, vnitibp@mail.ru

Key words: vaccine, adjuvant, dose, infections enteritis, calves.

Abstract. The main rules for choosing the means of specific prophylactic against colibacillosis (escherichiosis) in cattle is the need to match the antigenic spectrum of the vaccine strains with epizootic strains isolated by diagnostic veterinary institutions from pathological material taken from dead calves. Only in this case one should expect high results of the preventive efficacy of the applied vaccines. The design of vaccines based on pathogenicity factors of bacterias is the most promising direction in the development of new bioproducts of specific prevention of infectious diseases of farm animals. Researchs in the areas to choose the optimal doses and ratios of monocomponents, determining the optimal immunizing dose, and choosing a adjuvant is an important part of research work on the creation of vaccines. We completed work to establish the optimal dose when using the associated vaccine against rota-, coronavirus infection and colibacillosis of cattle by vaccinating cows in different doses of the test vaccine. Subsequently, serological studies of the blood of animals were carried out, according to the results of which the indicators of the best immune response were determined by comparing the established levels of biosynthesis of specific antibodies from animals of the experimental and control groups. A number of indicators of possible reactogenicity of the tested vaccine were also studied. When conducting studies of blood serum of cows, the indirect hemagglutination reaction and agglutination reaction were performed. Serological blood tests carried out were accompanied by the necessary controls to ensure the reliability of the results. According to the results of studies of blood serum of cows in the experimental groups, immunization of cows with an associated vaccine against rota-, coronavirus infection and colibacillosis of cattle in different volumes led to a significant level of antiviral and antibacterial antibodies. The optimum dose for virus antigens with infectious titres from 7,0 lg and 5,5-TC150/sm³ for vaccinated cows forms 1,5 sm³ for each viral monocomponents. The optimum dose for each vaccine strains E.coli F4, F5, Att25, F41 and 987P forms from 1,5-2,5 milliard bacterial cells for each bacterial monocomponents.

доз и соотношений монокомпонентов, определение оптимальной иммунизирующей дозы, выбор депонирующего вещества составляет важную часть научно-исследовательской работы по созданию вакцин.

Нами проведена работа по установлению оптимальной дозы при применении ассоциированной вакцины против рота-, коронавирусной инфекции и колибактериоза молодняка крупного рогатого скота путем вакцинации коров

Для цитирования / For citation

Выбор оптимальной дозы применения ассоциированной вакцины против рота-, коронавирусной инфекции и колибактериоза телят / Я.П. Яромчик, П.А. Красочко, П.П. Красочко // Ветеринария и кормление.-2021. - № 1.- С.60-63.
 Selection the optimal dose of application associated vaccine against rota-, coronavirus infection and colibacillosis in calves / Yaromchyk Y.P., Krasochko P.A., Krasochko P.P. // Veterinaria I kormlenie. - 2021. - #1 - P. 60-63.

в разных дозах введения испытуемой вакцины. В последующем проведены серологические исследования крови животных, по результатам которых определены показатели наилучшего иммунного ответа путем сопоставления установленных уровней биосинтеза специфических антител от животных опытных и контрольной групп. Выполнено изучение ряда показателей возможной реактогенности испытуемой вакцины. При проведении исследований сывороток крови коров проводили постановку РНГА и РА. Проводимые серологические исследования крови сопровождались необходимыми контролями, обеспечивающими достоверность результатов. Согласно полученным результатам исследований сывороток крови коров опытных групп иммунизация коров ассоциированной вакциной против рота-, коронавирусной инфекции и колибактериоза молодняка крупного рогатого скота в разных объемах приводила к достоверному уровню противовирусных и антиэшерихиозных антител. Определена оптимальная доза для рота-, и коронавирусов с инфекционным титром – 7,0 и 5,5 lg ТЦД₅₀/см³, которая составила при проведении вакцинации коров – 1,5 см³ каждого вирусного монокомпонента. Для вакцинных штаммов E.coli K99, K88, 987P, F41 и A20 оптимальная доза установлена в дозах от 1,5 до 2,5 млрд. бактериальных тел каждого бактериального монокомпонента. На протяжении всего опыта сроков у коров группы контроля достоверных изменений уровня специфических антител в сыворотках крови животных не происходило, отмечены лишь незначительные колебания их значений.

Введение

Согласно данным отчетности ветеринарных диагностических учреждений и результатов научных работ ряда исследователей, одними из наиболее распространенных болезней новорожденного молодняка крупного рогатого скота являются рота-, коронавирусная инфекция и колибактериоз. Среди болезней бактериальной этиологии эшерихиоз телят занимает первое место по количеству неблагополучных пунктов, количеству заболевших и павших животных уже более 15 лет наблюдения. Протекание рота-, коронавирусной инфекции и колибактериоза в ассоциации может достигать до 53,6 % случаев, с более тяжелым течением болезни и резким возрастанием процента летальности заболевших телят [6, 8, 9, 10, 13].

Вакцинация глубоководных коров приводит к созданию у полученного от них молодняка стойкого коллоидального иммунитета при выпойке новорожденным телятам иммунного молозива в первые часы их жизни. Антитела, полученные с молозивом коров-роениц, обеспечивают защиту новорожденных телят от болезней до тех пор, пока у них не разовьются собственные механизмы иммунитета [4, 6, 8, 10, 12].

При выборе средств специфической профилактики колибактериоза следует учитывать, что изменение эпизоотологической ситуации определяет необходимость предъявления новых требований к показателям, характеризующим состав и свойства вакцинных препаратов. В случаях несомнения антигенного состава вакцинных и эпизоотических штаммов профилактическая эффективность применяемых биопрепаратов значительно понижается и требует поиска более эффективных средств специфической профилактики инфекционных энтеритов новорожденных телят [8, 13, 16].

В большинстве случаев от вынужденно убитых и павших телят выделяют энтеротоксигенные штаммы эшерихий с адгезивными антигенами, входящими в диагностический набор: A20, K88, K99 и реже F41 и P987 [6, 8, 16].

Высокая концентрация антигенов в вакцинах не всегда приводит к желаемому результату, так как в ряде случаев возникает значительная антигенная нагрузка на организм и иммунную систему животных, что приводит к повышению общей температуры тела, воспалительным отекам на месте

введения, снижению продуктивности. Отсутствие данных о корреляции между показателями иммуногенности и количественным содержанием в вакцинах антигена, делают дискуссионным предложение о необходимости применения высоких концентраций бактериальных тел и требуют дополнительных исследований по определению оптимальных доз и соотношений монокомпонентов биопрепаратов [1, 6, 10, 12].

При конструировании вакцин количество применяемых антигенов, объем применяемого биопрепарата, значительно зависит от выбора депонирующего вещества. От физико-химических свойств адьюванта зависит взаимосвязь уровня биосинтеза антител и морфологических изменений тканей животных на месте введения вакцин [2, 3, 4, 7, 11, 14, 15].

Целью настоящей работы явилось определение оптимальной иммунизирующей дозы ассоциированной вакцины против рота-, коронавирусной инфекции и колибактериоза крупного рогатого скота с разными адьювантами при ее конструировании и применении.

Материалы и методы

Экспериментальная часть научно-исследовательской работы выполнена на базе СРДУП "Улишицы Агро" Городокского района Витебской области. Для этого сформировано 2 опытных группы коров черно-пестрой породы, живой массой 400–450 кг по 10 голов в группе. Для подтверждения достоверности опыта была сформирована группа контроля (n=10). Лабораторные исследования проводились в научной лаборатории кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней и отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных УО "Витебская государственная академия ветеринарной

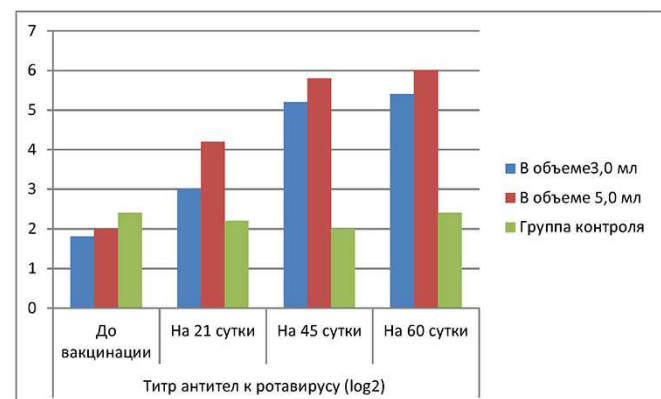


Рис. 1 - Титры антител к ротавирусам у коров после введения ассоциированной вакцины в разных объемах
Fig. 1 - Titers of antibodies to rotaviruses in cows after administration of the associated vaccine in different volumes

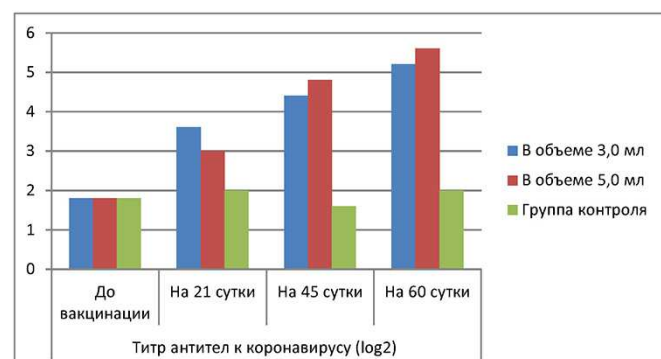


Рис. 2 - Титры антител к коронавирусам у коров после применения ассоциированной вакцины в разных объемах
Fig. 2 - Titers of antibodies to coronaviruses in cows after application of the associated vaccine in different volumes

медицины". Варианты ассоциированной вакцины против рота-, коронавирусной инфекции и колибактериоза молодняка крупного рогатого скота изготовлены в производственных условиях ОАО "БелВитунифарм" Витебского района, Республика Беларусь.

Коровам опытной группы №1 применили ассоциированную вакцину против рота-, коронавирусной инфекции и колибактериоза, при изготовлении которой в качестве адъюванта использовали водно-масляную эмульсию ИЗА-25 (Serpic, Франция). Вакцину вводили внутримышечно, в область крупа, двукратно, с интервалом в 21 день, в объеме 5,0 см³.

Иммунизацию животных второй опытной группы с применением ассоциированной вакцины против рота-, коронавирусной инфекции и колибактериоза с адъювантом ИЗА-25 проводили по аналогичной схеме, но вводимый объем биопрепарата составил 3,0 см³.

При конструировании вышеописанных вариантов вакцин инфекционный титр ротавирусов составлял 7,0 lg ТЦД₅₀/мл., а для коронавирусов – 5,5 lg ТЦД₅₀/мл. Для получения бактериальных монокомпонентов использованы штаммы E.coli с адгезивными антигенами A20, K88, K99, F41 и 987P, с концентрацией бактериальных клеток – от 1,5 до 2,5 млрд. бактериальных тел в 1 см³. Инактивацию вирусных и бактериальных компонентов проводили 0,3% раствором формалина.

После вакцинации за животными было установлено клиническое наблюдение в течение 60 дней. О реактогенности вакцины судили по наличию местной реакции и по изменению общего состояния организма животных. Для определения уровня биосинтеза специфических антител от животных опытных и контрольных групп были отобраны сыворотки крови до иммунизации, через 21, 45 и 60 суток после вакцинации.

Сыворотки крови коров опытных и контрольных групп исследовали в РНГА (диагностикумы представляли собой стабилизированные акролеином или глутаровым альдегидом эритроциты крупного рогатого скота, танизированные и сенсibiliзированные антигенами вирусов с помощью конъюгирующих веществ – хлорида хрома с трипановым синим) и в РА на полистироловых планшетах с использованием стандартных диагностикумов. Оценку результатов проводили с учетом интенсивности антителообразования в сыворотках крови животных при введении разных вариантов вакцины. Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили с использованием компьютерных программ Excel и Stat Biom 2720.

Результаты исследований

Иммунизация стельных коров вариантами вакцины против рота-, коронавирусной инфекции и колибактериоза молодняка крупного рогатого скота в исследуемых дозах сопровождалась выраженным биосинтезом специфических антител в организме животных. При проведении наблюдения на всем протяжении опыта у вакцинированных животных местных и общеклинических изменений не обнаружено.

На рисунке 1 представлены результаты изучения динамики специфических антител в сыворотке крови коров опытных групп, иммунизированных вариантами вакцины с адъювантом ИЗА-25. Вакцинация животных вакциной против рота-, коронавирусной инфекции и колибактериоза молодняка крупного рогатого скота в объеме 5,0 см³ ведет к выработке специфических антител к ротавирусу до значения 6,0±0,2 log₂ после двукратной вакцинации.

На рисунке 2 представлены результаты определения прироста противовирусных антител к коронавирусам крупного рогатого скота у животных групп опыта №1 и №2, после вакцинации ассоциированной вакциной против рота-, коронавирусной инфекции и колибактериоза молодняка крупного рогатого скота с разными адъювантами.

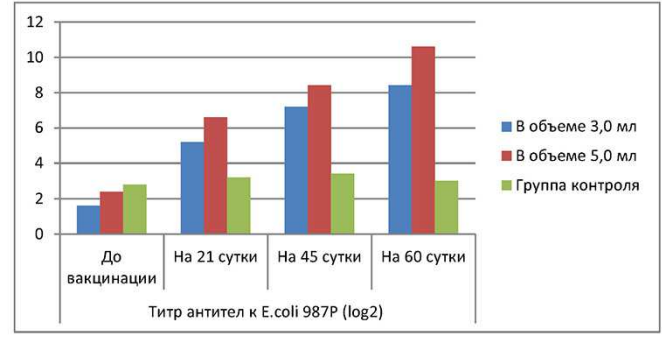
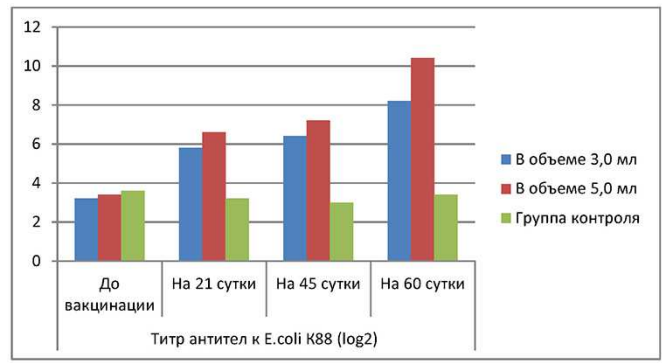
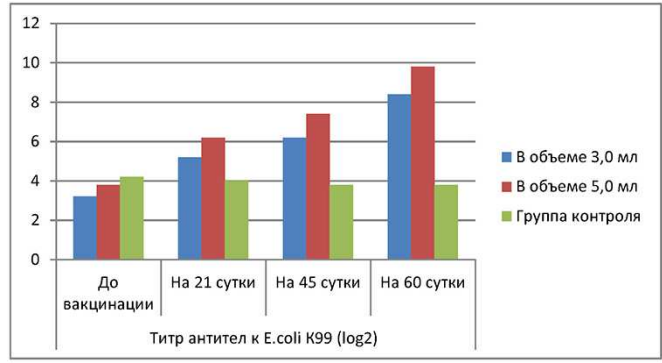
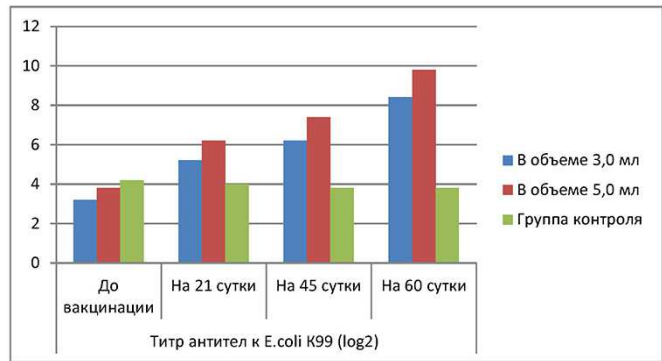
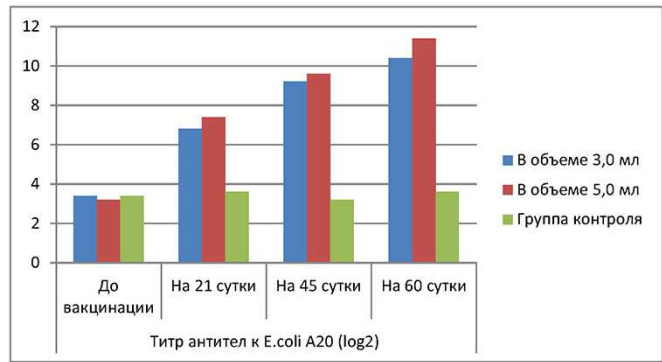


Рисунок 3-7 - Титры антибактериальных антител к E.coli при применении ассоциированной вакцины в разных объемах
Fig. 3-7 - Titters of antibacterial antibodies to E. coli after using the associated vaccine in different volumes

Согласно полученных результатов серологических исследований крови вакцинированных животных опытных групп установлено, что при введении испытуемой вакцины наибольший прирост противовирусных антител к возбудителю коронавирусной инфекции крупного рогатого скота был также наибольшим при введении варианта вакцины в объеме $5,0 \text{ см}^3$. Прирост антител через 24 дня после первичной и 15 дней после повторной иммунизации достигал до значения $4,8 \pm 0,36$ и $5,6 \pm 0,24 \log_2$ соответственно.

На рисунках 3–7 представлены результаты определения прироста противобактериальных антител к *E.coli* с адгезивными антигенами A20, K88, K99, F41 и 987P у коров групп опыта и животных группы контроля.

Данные результатов серологических исследований сывороток крови коров опытных групп также указывают на наиболее высокий достоверный прирост противозерихиозных антител в сыворотках крови коров 2-й опытной группы, значения которых после двукратной вакцинации достигли: к *E.coli* A20 – $10,5 \pm 0,45 \log_2$, к *E.coli* K88 – $10,4 \pm 0,64 \log_2$, к *E.coli* K99 – $9,8 \pm 0,15 \log_2$, к *E.coli* 987P – $10,6 \pm 0,54 \log_2$. При этом, установлено, к бактериальному компоненту *E.coli* F41 у животных первой опытной группы уровень специфических антител после двукратной вакцинации был выше на $2,1 \log_2$ полученного значения в сыворотках крови коров второй опытной группы.

В сыворотках крови коров группы контроля, на протяжении всех сроков исследований, не наблюдали достоверных отличий изменения уровня титров специфических антител.

Выводы и перспективы дальнейших исследований

1. Согласно полученных результатов серологических исследований крови коров, вакцинированных ассоциированной вакциной против рота-, и коронавирусной инфекции и колибактериоза молодняка крупного рогатого скота установлено, что по результатам гуморального иммунного ответа оптимальной дозой для компонентов рота-, и коронавирусов крупного рогатого скота с инфекционным титром $7,0\text{--}5,5 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, определено у животных, иммунизированных в объеме – $5,0 \text{ см}^3$.

2. Для бактериальных монокомпонентов A20, K88, K99 и 987P, с концентрацией бактериальных клеток от 1,5 до 2,5 млрд./см³, максимальный синтез противозерихиозных антител достигнут при введении испытуемой вакцины в объеме $5,0 \text{ см}^3$, а для *E.coli* F41 – в объеме $3,0 \text{ см}^3$.

3. Результаты изучения динамики биосинтеза специфических антител указывают на необходимость двукратного применения ассоциированной вакцины против рота-, и коронавирусной инфекции и колибактериоза молодняка крупного рогатого скота.

Литература

1. Ветеринарные и технологические мероприятия при содержании крупного рогатого скота: монография. /П.А. Красочко [и др.]; под общ. ред. П.А.Красочко. - Смоленск: "Универсум", 2016. - 508 с.
2. Диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: вирусные заболевания : монография / А. А. Шевченко [и др.]. - Краснодар : КубГАУ, 2018. - 485 с.
3. Красочко, П.А. Научные основы изучения этиологии, патогенеза и разработка мер борьбы с вирусными инфекциями молодняка крупного рогатого скота / П.А.Красочко, А.М.Ламан //Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария. 2006. № 3. С. 3-8.
4. Красочко П.А. Современные подходы к специфической профилактике вирусных респираторных и желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота /П.А.Красочко, И.А. Красочко, С.Л.Борознов // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. 2008. Т. 6. С. 243-251
5. Машеро, В.А. Этиологическая структура возбудителей респираторных и желудочно-кишечных инфекций телят в Республике Беларусь / В.А. Машеро, П.А. Красочко //Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. 2007. Т. 43. № 2. С. 83-86.
6. Молодняк крупного рогатого скота : кормление, диагностика, лечение и профилактика болезней : монография / Н. И. Гавриченко [и др.] - Витебск : ВГАВМ, 2018. - 288 с.
7. Оценка качества адьювантов и сорбентов на основе полисахаридов растительного происхождения / П. А. Красочко [и др.] // Международный научно-практический журнал : Эпизоотология, иммунология, фармакология, санитария, Выпуск 1/2014. - Минск, 2014. - С. 62-67.

8. Оценка эпизоотической ситуации по инфекционным энтеритам телят в хозяйствах Витебской области / П.А. Красочко [и др.] // Ветеринарный журнал Беларуси. Выпуск 2(9), 2018. УО ВГАВМ, 2018. - С.35-39.
9. Физиологические основы проявления стрессов и пути их коррекции в промышленном животноводстве: монография. В 2 ч. Ч. 1 / Ф.И.Фурдуй [и др.] /Под ред. П.А.Красочко. - Горки : БГСХА, 2013. - 564 с.
10. Физиологические основы проявления стрессов и пути их коррекции в промышленном животноводстве: монография. В 2 ч. Ч. 2 / Ф.И.Фурдуй [и др.] /Под ред. П.А.Красочко. - Горки : БГСХА, 2013. - 492 с.
11. Прудников, В. С. Патоморфология, диагностика и специфическая профилактика вирусных болезней телят с диарейным синдромом при моно- и ассоциативном течении / В. С. Прудников, С. П. Герман, А. И. Василенко // Ветеринарный журнал Беларуси, № 2(7). - 2017. - С. 52-55.
12. Эпизоотология и инфекционные болезни: учебник для студентов и магистрантов учреждений высшего образования по специальности "Ветеринарная медицина" /В.В.Максимович [и др.], - 2 изд. переработанное и дополненное. - Минск: ИВЦ Минфина, 2017. -824 с.
13. Средства специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота и свиней : практ. пособие / П. А. Красочко [и др.] - Минск : ИВЦ Минфина, 2018. - 368 с.
14. Яромчик, Я. П. Анализ отчетности ветеринарных диагностических учреждений Республики Беларусь по инфекционным энтеритам телят / Я.П. Яромчик // материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых "Молодые ученые - науке и практике АПК", УО ВГАВМ, Витебск, 5-6 июня 2018 г. - Витебск : ВГАВМ, 2018 г. - С. 47-49.

References

1. Veterinary and technological measures for the maintenance of cattle: monograph /P.A. Krasochko [et al.]; under the general. Ed. P.A. Krasochko. - Smolensk: "University," 2016. - 508 p.
2. Diagnosis of infectious diseases of farm animals: viral diseases: monograph/A. A. Shevchenko [and others]. - Krasnodar: KubGAU, 2018. - 485 s.
3. Krasochko, P.A. Scientific foundations for the study of etiology, pathogenesis and the development of measures to combat viral infections of young cattle horns/P.A. Krasochko, A.M.Laman//Epizootology, immunobiology, pharmacology and sanitation. 2006. № 3. С. 3-8.
4. Colorado P.A. Modern approaches to the specific prevention of viral respiratory and gastrointestinal infections of cattle/P.A. Krasochko, I.A. Krasochko, S.L. Boroznov//Proceedings of the Federal Federal Center for Animal Health Protection. 2008. Т. 6. С. 243-251
5. Mashero, V.A. Etiological structure of pathogens of respiratory and gastrointestinal infections of calves in the Republic of Belarus/V.A. Mashero, P.A. Krasochko//Scientific notes of the VitebSkskaya educational institution of the Order of Honor of the State Academy of Veterinary Medicine. 2007. Т. 43. NO. 2. С. 83-86.
6. Young cattle: feeding, diagnosis, treatment and prevention of diseases: monograph/N. I. Gavrichenko [et al.] - Vitebsk: VGAVM, 2018. - 288 s.
7. Assessment of the quality of adjuvants and sorbents based on polysaccharides of racial origin/P. A. Krasochko [et al.]//International Scientific and Practical Journal: Epizootology, Immunobiology, Pharmacology, Sanitation, Issue 1/2014. - Minsk, 2014. - С. 62-67.
8. Assessment of the epizootic situation on the infectious enteritis of calves in the farms of the Vitebsk region/P.A. Krasochko [et al.]// Veterinary Journal of Belarus. Issue 2 (9), 2018. VGAVM UO, 2018. - С. 35-39.
9. Physiological foundations of the manifestation of stresses and ways to correct them in industrial animal husbandry: monograph. At 2 h. Part 1/ F.I. Furdud [et al.]/Ed. P.A. Krasochko. - Gorki: BGSXA, 2013. - 564 s.
10. The physiological foundations of the manifestation of stresses and the ways of their correction in industrial animal husbandry: monograph. At 2 h. Part 2/F.I. Furdud [et al.]/Ed. P.A. Krasochko. - Gorki: BGSXA, 2013. - 492 s.
11. Prudnikov, V. S. Patomorphology, diagnosis and specific prevention of viral diseases of calves with diarrheic syndrome in the mono- and associative course/V. S. Prudnikov, S. P. German, A. I. Vasilenko// Veterinary Journal of Belarus, No. 2 (7). - 2017. - С. 52-55.
12. Epizootology and infectious diseases: a textbook for students and mahistrans of higher education institutions with a textbook in VeteriNarnaya Medicine/V.V. Maksimovich [and others], - 2 ed. processed and completed. - Minsk: IVC of the Ministry of Finance, 2017. -824 p.
13. Means for the specific prevention of infectious diseases of cattle and pigs: manual/P. A. Krasochko [et al.] - Minsk: IVC of the Ministry of Finance, 2018. - 368 s.
14. Yaromchik, Ya.P. The analysis of the reporting of veterinary diagnostic institutions of Republic of Belarus on infectious enteritis of calfs / Ya.P. Yaromchik//materials of the International scientific and practical conference of young scientists "Young scientists - science and practice of agrarian and industrial complex", UO VGAVM, Vitebsk, June 5-6, 2018 - Vitebsk: VGAVM, 2018 - Page 47-49.

В 2020 году увеличилось производство продукции животноводства Livestock production increased in 2020

В 2020 году российская отрасль животноводства продемонстрировала устойчивую положительную динамику развития как в мясном, так и в молочном направлении. По мнению экспертов, тенденция сохранится и в текущем году.

По оперативным данным, производство скота и птицы на убой в живом весе в хозяйствах всех категорий достигло 15,6 млн тонн, что на 3,1% (+472 тыс. тонн) больше показателя 2019 года. Наибольший рост наблюдается в свиноводстве - 8,9% (+446 тыс. тонн), что обусловлено реализацией инвестиционных проектов в этой сфере и расширением экспортных возможностей для российских поставщиков. По словам генерального директора Национального Союза свиноводов Юрия Ковалева, ежегодный прирост сохранится на уровне 3-5%, и к 2025 году показатель увеличится до 5,8 млн тонн в живом весе. Продолжается строительство современных мощностей, что позволит обеспечивать потребителей самым разнообразным ассортиментом продукции.

Также достигнут прирост в производстве крупного рогатого скота (+0,3%) и птицы (+0,3%). Производство яиц составило 44,8 млрд штук, в том числе в сельскохозяйственных организациях показатель увеличился на 64,6 млн штук (+0,2%). Как отметил генеральный директор Национального Союза птицеводов Сергей Лахтюхов, в последние годы отрасль показывает стабильные результаты, что позволяет полностью обеспечивать потребности населения и способствует снижению импорта. Дальнейшее развитие внутреннего потребления мяса птицы возможно за счет наращивания производства индейки и других нишевых продуктов. Отрасль продолжит планомерный рост с темпом 0,5-1% в год.

Ключевыми факторами, определяющими положительную динамику в отечественном животноводстве, являются активное использование аграриями мер государственной поддержки, формирование племенной базы и укрепление ветеринарной защиты.

Ключевые задачи аграрной науки - сохранение ресурсов и обеспечение продбезопасности The key tasks of agricultural science are the preservation of resources and ensuring food safety

Заместитель Министра сельского хозяйства Максим Увайдов принял участие в панельной дискуссии, которая прошла в рамках Международной зеленой недели (International Green Week Berlin) в Берлине в режиме онлайн. Ежегодное мероприятие посвящено сотрудничеству России и Германии в целях устойчивого развития сельского хозяйства и пищевой промышленности.

Темами дискуссии, в частности, стали условия для производства высокотехнологичной сельхозпродукции, применение научных исследований и разработок в сельском хозяйстве, профессиональный обмен в этой сфере. Российские аграрные вузы на встрече представил ректор РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева Владимир Трухачев.

В своем выступлении Максим Увайдов подчеркнул, что в современных условиях перед аграрной наукой стоит задача сохранения ресурсов и одновременно обеспечения продовольственной безопасности. Этому должны способствовать повышение научно-технологического уровня АПК за счет развития селекции и генетики, а также цифровая трансформация. В России минимизировать негативное воздействие на окружающую среду призван действующий с 1 января 2020 года Закон об органической продукции. По словам замминистра, развитие органического сельского хозяйства помимо повышения качества продукции влечет и иные позитивные изменения в АПК - создание дополнительных рабочих мест, снижение негативного влияния на климат и более эффективное использование энергии.

Также Максим Увайдов отметил, что для обеспечения населения продуктами питания на основе экологически ориентированных технологий создается новый защищенный "зеленый" стандарт сельхозпродукции, сырья и продовольствия с улучшенными характеристиками. Согласно проекту закона, который уже внесен в Государственную Думу РФ, производство таких продуктов предполагает бережное отношение к окружающей среде. Минсельхоз рассчитывает, что законопроект будет принят в 2021 году.

В 2021 году объем субсидий на льготное кредитование АПК составит более 80 млрд In 2021, the volume of subsidies for concessional lending to the agro-industrial complex will amount to more than 80 billion rubles

Льготное кредитование остается одним из основных механизмов господдержки агропромышленного комплекса страны. В целях дальнейшей реализации механизма Минсельхоз России утвердил План льготного кредитования заемщиков на очередной финансовый год.

Согласно документу, в 2021 году общий объем субсидий, предоставляемых уполномоченным банкам по данной программе, составляет 80,2 млрд рублей, в том числе 15,5 млрд рублей - на выдачу новых кредитов.

Для обеспечения льготного краткосрочного кредитования предусмотрены субсидии в объеме 22,5 млрд рублей, в том числе 12 млрд рублей - на новые кредиты. Средства будут направлены на поддержку малых форм хозяйствования, развитие растениеводства, животноводства и переработки продукции данных отраслей, а также молочного и мясного скотоводства.

На льготные инвесткредиты заложено 57,7 млрд рублей, в том числе 3,5 млрд рублей запланированы на выдачу новых кредитов. Они предусмотрены для малых форм хозяйствования, на развитие растениеводства, животноводства и переработки, молочного скотоводства, на приобретение техники, а также железнодорожного подвижного состава.

По материалам пресс-службы Минсельхоза РФ