

4. Коваленко, Н. К. Биотехнология культивирования молочнокислых бактерий [Текст] / Н. К. Коваленко // Молочная промышленность. - 2002. - № 2. - С. 24 - 25.
5. Полтавська, О. А. Біологічні властивості біфідобактерій, ізольованих з різних природних джерел [Текст]: дис. ... канд. биол. наук / О. А. Полтавська. - К., 2006. - 132 с.
6. Янковський, Д. С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления [Текст] / Д. С. Янковський // К.: Эксперт ЛТД, 2005. - 362 с.

## IMPROVEMENT OF TECHNOLOGY OF CULTIVATION OF LAKTOBAKTERIY AND BIFIDOBAKTERIY

**Zavgorodniy A. I., Gujvinska S. A.**

*National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine"*

*Study of biological properties of laktobakteriy and bifidobakteriy, as well as other microorganisms, requires ability of the protracted maintainance and cultivation of cultures. It is necessary both for support of collections of lactobacillus in the high-activity state and for making and storage of probiotichnikh preparations*

*Materials and methods. The object of researches were stamms: Lactobacillus, Bifidobacterium. 6 variants of experimental nourishing environments were made for cultivation of laktobakteriy and bifidobakteriy. There were neat components to the first team of environment. The environment of MRS served as control. A selection and optimization of environments was conducted for to the criteria: rN environments, by the amount of microbial cages after incubation and temperature of cultivation.*

*The amount of living microbial cages determined the method of the serial breedings. rN environments and temperature condition of cultivation determined the generally accepted methods.*

*Results of researches. The results of improvement of technology of cultivation of laktobakteriy are resulted and bifidobakteriy. It is set that on the offered environment of bacterium grew and actively accumulated the far of viable cages: 6,2–8,2 kh 10<sup>6</sup> KUO/ of sm<sup>3</sup> (control of 6,1±0,07 kh 10<sup>6</sup> KUO/ of sm<sup>3</sup>) after the technological parameters of rN–7,0 and temperatures of 37 °C.*

*Conclusions. An environment is offered for cultivation of laktobakteriy, on which bacteria grew and actively accumulated the far of viable cages of 6,2–8,2 kh 10<sup>6</sup> KUO/ of sm<sup>3</sup>. It is set that at different temperature conditions and rN environments the best of them are that which has rN–7,0, and incubation of sowing material prokhodit' for the temperatures of 37 °C.*

**Keywords:** *lactobacilli, bifidobacteria, technology*

УДК: 619:615.37:636.22/.28.0532:619:616.2

## ПОДБОР И ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СРЕДСТВА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ТЕЛЯТ

**Красочко П. А., Ломако Ю. В., Борисовец Д. С., Зуйкевич Т. А., Новикова О. Н., Амосова Л. А.**

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,*

*г. Минск, Республика Беларусь, e-mail: krasochko@mail.ru*

*Проведены исследования по подбору и изучению антигенной активности штаммов возбудителей вирусно-бактериальных респираторных заболеваний телят. Для конструирования вакцины были отобраны авирулентные вакцинные штаммы вирусов: инфекционного ринотрахеита КМИЭВ-V123, диареи КМИЭВ-V120, парагриппа-3 КМИЭВ-V124, а также штаммы бактерий Mannheimia haemolytica КМИЭВ – В158 и Pasteurella multocida тип А КМИЭВ – В166. Титр противовирусных антител в крови иммунизированных телят по результатам изучения антигенной активности отобранных штаммов составил 4–4,5 (log<sub>2</sub>).*

**Ключевые слова:** *телята, респираторные заболевания, профилактика, вакцина, штаммы, антигенная активность*

Рост числа респираторных заболеваний крупного рогатого скота является острой проблемой во всем мире и одной из основных причин экономического ущерба в животноводстве.

Как правило, респираторные заболевания молодняка крупного рогатого скота протекают по типу смешанных инфекций. Основную роль в возникновении вспышек первичных респираторных заболеваний молодняка крупного рогатого скота играют вирусы: парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, респираторно-синцитиальной инфекции, вирусной диареи и корона-вирус [5, 6]. Вирусы повреждают защитные механизмы дыхательной системы, чем облегчают размножение и колонизацию органов различных микроорганизмов (пастерелл, мангаймий, гемофиллюс, псевдомонас, микоплазмы и др.) [1, 4, 7].

Сложность борьбы с заболеваниями крупного рогатого скота, обусловленными условно-патогенными бактериями, прежде всего объясняется тем, что пневмоэнтериты телят вызываются преимущественно ассоциацией вирусов и условно-патогенных бактерий, которые имеют лабильные факторы патогенности, обладают плюрализмом, что затрудняет диагностику и профилактику этих болезней [2, 3].

В этой связи, разработка и внедрение в практику ветеринарии новых отечественных высокоэффективных средств специфической профилактики вирусно-бактериальных инфекций телят является одной из наиболее актуальных задач.

**Цель работы** – провести подбор и изучение антигенной активности штаммов с целью конструирования средства специфической профилактики вирусно-бактериальных респираторных заболеваний телят.

**Материалы и методы.** Научно-исследовательская работа проводилась на базе отделов вирусных инфекций и бактериальных инфекций крупного рогатого скота РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», вивария института, животноводческих хозяйств Республики Беларусь.

Для проведения исследований по подбору и изучению антигенной активности вирусов и бактерий были использованы авирулентные вакцинные штаммы: инфекционного ринотрахеита (ИРТ) – КМИЭВ-V123 и КМИЭВ-6, вирусной диареи (ВД) – КМИЭВ-V120 и КМИЭВ-7, парагриппа-3 (ПГ-3) – КМИЭВ-V124 и КМИЭВ-7.

Для культивирования вакцинных штаммов вирусов инфекционного ринотрахеита, диареи, парагриппа-3 использована перевиваемая культура клеток почки эмбриона теленка (MDBK).

Заражение матрасов проводилось по общепринятым методикам.

В качестве бактериальных компонентов были отобраны штаммы бактерий *Mannheimia haemolytica* КМИЭВ – В158 и *Pasteurella multocida* тип А КМИЭВ – В166. С целью накопления бактериальных штаммов, их выращивали на бульоне Хоттингера с содержанием 200 мг% аминного азота с добавлением 5 % сыворотки крови крупного рогатого скота (рН 7,4–7,6). Инактивация накопленных бактериальных штаммов проводилась с использованием 0,2 %-ного формалина в течение 10–12 суток.

Изучение антигенной активности адаптированных штаммов вирусов для конструирования вакцины проводилось на телятах в сравнении с исходными. Для этого было взято 6 групп телят по 5 голов в группе. Животным опытных групп двукратно внутримышечно вводили внутримышечно по 2,0 см<sup>3</sup> каждого вируса в титре 6,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Кровь у животных брали до введения вирусов и через 14 дней после иммунизации. В сыворотках крови определяли титр противовирусных антител в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).

**Результаты исследований.** Для конструирования средства специфической профилактики вирусно-бактериальных респираторных заболеваний телят были проведены исследования по подбору и изучению антигенной активности штаммов вирусов и бактерий.

В Республике Беларусь и странах СНГ с 70-х годов используются различные аттенуированные штаммы: вируса ИРТ – ТК-А и МВА 2/81, ВД – ВК-№ 28, ПГ-3 – ПТК-45, SF-4, «Белорусский-9». Подбор штаммов проводили с учетом того факта, что вирусы ИРТ ВД и ПГ-3 имеют низкую вариабельность и в антигенном отношении различные референтные и производственные штаммы вирусов различаются незначительно.

В работе использован аттенуированный штамм КМИЭВ-6, в отношении которого была проведена адаптация в количестве 10 пассажей на культуре клеток MDBK, при культивировании которой использована безглобулиновая сыворотка крови крупного рогатого скота в качестве компонента ростовой среды. По активности исходный штамм вируса ИРТ был ниже адаптированного на 0,8–1,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Так, титр исходного штамма вируса ИРТ КМИЭВ-6 составлял 6,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, а после 10 пассажей – 7,3–7,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. После изучения его свойств штамм был задепонирован в Республиканской коллекции микроорганизмов и ему присвоен номер – КМИЭВ-V123.

Для подбора вируса диареи в процессе работы была проведена адаптация аттенуированного штамма КМИЭВ-7 в течение 10 пассажей на культуре клеток MDBK, при культивировании которой использована безглобулиновая сыворотка крови крупного рогатого скота в качестве компонента ростовой среды. По активности исходный штамм вируса диареи был ниже адаптированного на 0,5–0,8 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Так, титр исходного штамма вируса диареи КМИЭВ-7 был 7,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, а после 10 пассажей – 7,5–7,8 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. После изучения его свойств штамм был задепонирован в Республиканской коллекции микроорганизмов и ему присвоен номер – КМИЭВ-V120.

Работа по адаптации референтного штамма вируса парагриппа-3 проведена на культуре клеток MDBK, при культивировании которой использована безглобулиновая сыворотка крови крупного рогатого скота в качестве компонента ростовой среды. По активности исходный штамм вируса парагриппа-3 были ниже адаптированного на 0,5–0,7 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Так, титр исходного штамма вируса парагриппа-3 КМИЭВ-8 был 6,3 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, а после 10 пассажей – 6,8–7,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. После изучения его свойств штамм был задепонирован в Республиканской коллекции микроорганизмов и ему присвоен номер – КМИЭВ-V124.

Результаты исследований по изучению антигенной активности штаммов вирусов и бактерий на телятах в сравнении с исходными представлены в таблице.

Таблица – Результаты изучения антигенной активности штаммов вирусов и бактерий

Вирус	Штамм вируса	Срок исследования	Титр антител ( $\log_2$ )
Инфекционного ринотрахеита	КМИЭВ-V123	До иммунизации	1,0±0,1
		Ч-з 14 дней	4,0±0,3***
	КМИЭВ-6	До иммунизации	1,0±0,1
		Ч-з 14 дней	4,0±0,3***
Вирус диареи	КМИЭВ-V120	До иммунизации	1,0±0,1
		Ч-з 14 дней	4,5±0,2***
	КМИЭВ-7	До иммунизации	1,0±0,1
		Ч-з 14 дней	4,2±0,2***
Вирус парагриппа-3	КМИЭВ-V124	До иммунизации	1,5±0,1
		Ч-з 14 дней	4,5±0,2***
	КМИЭВ-8	До иммунизации	1,5±0,1
		Ч-з 14 дней	4,0±0,2***

Примечание: P - \*\*\* –  $\leq 0,001$

Результаты исследований показали, что адаптация вирусов ИРТ, ВД, ПГ-3 на клеточной линии MDBK путем сравнения с исходными штаммами не влияет на их антигенную активность. Штаммы не реактогенны, вызывают активную выработку противовирусных антител в организме телят в достаточно высоких титрах – 4,0–4,5  $\log_2$ .

Изучение штамма бактерий *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* показало, что это Грам-негативная коккобактерия, дающая слабый гемолиз при культивировании на кровяном агаре.

Установлено, что серотип (A1) *M. haemolytica* – основная причина легочного пастереллеза среди жвачных, но иногда заболевание может быть обусловлено серотипом (A6) и нетипируемыми изолятами. Серотип (A2) выделяется из носовой полости здорового крупного рогатого скота и редко приводит к заболеванию. Однако этот же серотип чаще всего вызывает заболевание у овец.

В работе нами от больных респираторными заболеваниями телят выделены и идентифицированы *M. haemolytica* № 1/4 и 2/7, по своим биологическим и антигенным свойствам характерны для рода *Mannheimia*. Штаммы переданы для депонирования в Республиканскую коллекцию микроорганизмов.

Установлено, что бактерии *Pasteurella multocida* тип А представляют собой короткие овоидные палочки, образуют капсулу, неподвижны. Растут на обычных питательных средах. На агаре образуют колонии с ровными краями, в проходящем свете сначала голубоватые, затем белые, с трудом снимающиеся петлей и обладающие специфическим запахом. На бульоне дают сначала равномерную муть, затем слизистый осадок.

Для конструирования вакцины были отобраны штаммы бактерий *Mannheimia haemolytica* КМИЭВ – В158 и *Pasteurella multocida* тип А КМИЭВ – В166, а также авирулентные вакцинные штаммы вирусов: инфекционного ринотрахеита КМИЭВ-V123, диареи КМИЭВ-V120, парагриппа-3 КМИЭВ-V124.

**Выводы и перспективы дальнейших исследований.** По результатам изучения антигенной активности подобраны штаммы для конструирования средства профилактики респираторных инфекций крупного рогатого скота – штаммы инфекционного ринотрахеита (КМИЭВ-V123), вируса диареи (КМИЭВ – V120), парагриппа-3 (КМИЭВ – V124); в качестве бактериального компонента вакцины использованы штаммы *Mannheimia haemolytica* (КМИЭВ – В158) и *Pasteurella multocida* тип А (КМИЭВ – В166).

#### Список литературы

1. Анализ заболеваемости молодняка КРС респираторными инфекциями / В.А. Мищенко [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2008. – № 6. – С. 2-4.
2. Диагностика пневмоэнтеритов молодняка крупного рогатого скота в Республике Беларусь / А.Н. Притыченко [и др.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак почета» государственная академия ветеринарной медицины». – 2012. – Т. 48, № 1. – С. 54-59.
3. Ковальчук, Н.М. Проблемы эшерихиоза телят в современных условиях экологического неблагополучия / Н. М. Ковальчук // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2008. – № 4. – С. 21-22.
4. Лисицын, В.В. Заболевание молодняка КРС вирусной этиологии / В.В. Лисицын // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2013. – № 3. – С. 6-12.
5. Frequency of rotavirus and coronavirus in neonatal calves in Kars District / H.M. Erdogan [et al.] // Kafkas Üniv. Veteriner Fakültesi Dergisi. – 2003. – Vol. 9, № 1. – P. 65-68.

6. Mayr, A. Control of acute virus diseases of calves in the Federal Republic of Germany / A. Mayr // Veterinary Research Communications. – 1979. – Vol. 3, № 1. – P. 3–19.
7. Moustafa, A.H. Study on bacterial causes of diarrhoea in neo-nate calves in Dakahlia Province / A.H. Moustafa, M.E. Hatab, M.M.A. El-Latif // Assiut Veterinary Med. J. – 2007. – Vol. 53, № 114. – P. 155–166.

**SELECTION AND STUDY OF ANTIGENIC STRAINS OF ACTIVITY FOR THE DEVELOPMENT OF THE MEANS OF SPECIFIC PROPHYLAXIS OF VIRAL AND BACTERIAL RESPIRATORY DISEASES OF CALVES**

**Krasochka P. A., Lamaka Y. V., Barysavets D. S., Zujkevich T. A., Novikava O. N., Amosava L. A.**  
RUE «Institute of experimental Veterinary Medicine named of S.N. Vyshelessky» Minsk, Belarus

*The aim of research is to carry out the selection and study of antigenic activity of strains to develop a preparation for specific prophylaxis of viral and bacterial respiratory diseases of calves.*

*Materials and methods. The avirulent vaccine strains of viruses of infectious bovine rhinotracheitis, viral diarrhea, and parainfluenza-3, grown in MDBK cells culture were used for these researches. The bacterial strains of Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida, grown on Hottinger broth were selected as the bacterial components.*

*Study of antigenic activity of strains was carried out in calves. Titers of antiviral antibodies in blood serum were determined with use of the indirect hemagglutination test prior to the immunization with viruses and 14 days after it.*

*The results of research. Adaptation of the attenuated strains of IBR virus KMIEV-6, BVD virus KMIEV-7, and parainfluenza-3 virus KMIEV-8 through 10 passages of each strain on a culture of MDBK cells was carried out.*

*The results showed that the adaptation of IBR, BVD and the parainfluenza-3 viruses to MDBK cells line not affect to their antigenic activity. Selected strains were not reactogenic, causing the active production of antiviral antibodies in calves in sufficiently high titers – 4.0-4.5 log<sub>2</sub>. M. haemolytica and Pasteurella multocida type A strains which their biological and antigenic properties characteristic of the genera of Mannheimia and Pasteurella were isolated and identified from the respiratory diseased calves.*

*Conclusions. As a result of studying the antigenic activity the strains of infectious bovine rhinotracheitis (KMIEV-V123), viral diarrhea (KMIEV – V120), parainfluenza-3 (KMIEV – V124), Mannheimia haemolytica (KMIEV – V158) and Pasteurella multocida type A (KMIEV – V166) were selected for the development of a preparation for specific prophylaxis of viral and bacterial respiratory diseases of calves.*

**Keywords:** calves, respiratory diseases, prophylaxis, vaccine, strains, antigenic activity

УДК: 616.981.455:616-093/-098

**РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ГЕНОДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ FRANCISELLA TULARENSIS**

**Нехороших З. Н., Джуртубаева Г. Н., Галаев А. В., Пилипенко Н. В.,  
Процышина Н. М., Егорова Е. А., Выдайко Н. Б., Загоруйко М. А.**

ГУ «Украинский научно-исследовательский противочумный институт им. И.И. Мечникова МЗ  
Украины», г. Одесса, Украина, e-mail: info\_urapi@odessa.gov.ua

*Представлены материалы по разработке двух вариантов отечественных генодиагностических ПЦР тест-систем (монодиагностической и мультиплексной) для индикации и идентификации возбудителя туляремии. Аprobация экспериментальных образцов авторских генодиагностических ПЦР тест-систем подтвердила их специфичность и чувствительность.*

**Ключевые слова.** Туляремия, штаммы, индикация, идентификация, праймеры, ПЦР тест-системы

Туляремия – зоонозная природноочаговая особо опасная инфекция (ООИ), широко распространенная на территории многих стран, в том числе Украине. Возбудитель туляремии – *Francisella tularensis* (*F. tularensis*), являющийся высоковирулентным патогеном категории «А» и потенциальным агентом биологического оружия, поражает более 250 видов животных [1, 2, 3]. Инфицирование людей происходит различными путями (алиментарный, трансмиссивный, аспирационный), при этом, туляремийная инфекция человеку от человека не передается [4, 5].

В Украине в настоящее время эпидемиологическая обстановка по туляремии остается сложной. Эндемичные территории зарегистрированы в 177 административных районах и расположены в основных ландшафтно-географических зонах страны (Полесье, Лесостепь, Степь).