

На правах рукописи



Соловьев Павел Владимирович

**ДЕМОДЕКОЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И МЕРЫ БОРЬБЫ С
НИМ**

16.00.06 - ветеринарная санитария, экология,
зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза

03.00.19 - паразитология

“

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**



Москва 2008

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН) и Федеральном государственном учреждении науки Государственном научном центре Прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФГУН ГНЦ ГИМБ)

Научный руководитель:
заслуженный деятель науки РФ, доктор
ветеринарных наук, профессор

Непоклонов
Анатолий Александрович
(ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН)

Научный консультант:
кандидат биологических наук

Бикетов
Сергей Федорович
(ФГУН ГНЦ ГИМБ)

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук

Кудрявцев
Евгений Александрович
(ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН)

кандидат медицинских наук

Гутова
Валентина Петровна
(ИМП и ТМ им Е И Марциновского
ММА им И М Сеченова)

Ведущая организация ФГОУ ВПО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им К И Скрябина

Защита состоится «12» марта 2008 г в 10 часов на заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата биологических наук Д 006 008 01 во Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной санитарии, гигиены и экологии по адресу 123022, Москва, Звенигородское шоссе д 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии.

Автореферат разослан «6» февраля 2008 г

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Майстренко Евгения Семеновна

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность проблемы

Демодекоз – широко распространенное в России и за рубежом паразитарное заболевание млекопитающих, вызываемое клещами рода *Demodex*. В настоящее время описано по разным источникам от 134 до 140 видоспецифичных клещей. Несмотря на это, в литературе появляются данные о новых видах клещей. Так, помимо основного вида *Demodex canis*, паразитирующего на собаках, недавно было найдено еще два вида *Demodex injai* и *Demodex corni*. На кошках обитает два вида *Demodex cati* и *Demodex gatoi*, у коз *Demodex philloides*, у свиней *Demodex carcae*, у крупного рогатого скота *Demodex bovis* и т.д. Болеют демодекозом и люди. У человека паразитируют два вида *Demodex folliculorum*, обитающий в волосяных фолликулах и *Demodex brevis*, обитающий в сальных железах.

У большинства видов клещей рода *Demodex* хорошо изучена морфология и биология. Предложено множество схем лечения и профилактики демодекоза, более глубоко изучаются вопросы патогенеза и хозяино-паразитарных взаимоотношений при этом заболевании.

Можно с уверенностью сказать, что наиболее изученным на настоящий момент, является клещ *Demodex canis*, и работы по его изучению продолжаются. Не отстает от ветеринарии и медицина – *Demodex folliculorum* и *Demodex brevis*, также хорошо изучены.

Продолжается изучение *Demodex bovis* – наиболее важного, с ветеринарной точки зрения, клеща, который, поражая кожный покров животных, наносит существенный ущерб кожевенной промышленности. В нашей стране и за рубежом кожи, выработанные из шкур, полученных от больных демодекозом животных, существенно обесцениваются из-за демодекозного порока (Василевич Ф. И., 1998, Ларионов С. В., 1991, Поляков Д. К., 1958, Bwangmo O., 1969, Everett A. L. et al., 1977, Fisher W. F., 1974, Flaherty F., 1954).

Демодекоз крупного рогатого скота поддается лечению, однако, предлагаемые схемы и методы борьбы с этим заболеванием имеют ряд недостатков. В связи с применением большого количества акарицидов они весьма дорогостоящи, и не рекомендованы для применения на дойном скоте (Василевич Ф И, 1998, Ларионов С В, 1991, Нечаева О Н, 1995, Поляков Д К, 1956, Скосырских Л Н, 1993, Скуловец М В, 2005)

Применение акарицидов для лечения, а также испытание новых средств, невозможно без своевременной и четкой диагностики демодекоза. Имеющиеся методы непригодны для рутинного использования, особенно в масштабах промышленного животноводства, и не позволяют четко диагностировать демодекоз на ранней стадии, а также в случаях бессимптомного носительства (Ларионов С В, 1982, Поляков Д К, 1957)

Следовательно, дальнейшее изучение вопросов борьбы с демодекозом и его диагностики можно считать научной и практической стороной разрешения важных задач животноводства

Цель работы:

Целью нашей работы является совершенствование мер борьбы с демодекозом крупного рогатого скота и методов его диагностики

Основные задачи исследований:

- изучить распространение демодекоза в хозяйствах Московской области,
- сравнить эффективность препаратов гиподектин-н, новомек и циперил при демодекозе крупного рогатого скота,
- изучить эффективность комбинированного метода лечения демодекоза при совместном применении препаратов циперил и новомек,
- определить антигенный состав возбудителя демодекоза -- клеща *Demodex bovis*, и охарактеризовать его основные компоненты,
- выделить антигены клеща *Demodex bovis*, имеющие диагностическую ценность, и изучить их потенциал для создания диагностики демодекоза методом иммуноферментного анализа

Научная новизна работы:

Изучена эффективность препаратов гиподектин-н и циперил при демодекозе крупного рогатого скота, ранее рекомендованных для обработки дойных животных против других эктопаразитов, а также действие препарата новомек при внутрикожном введении в микродозах

Предложен комбинированный метод лечения демодекоза крупного рогатого скота, включающий совместное применение препаратов на основе макроциклических лактонов и пиретроидов

Изучена антигенная структура клеща *Demodex bovis* и определена перспектива создания метода непрямого твердофазного иммуноферментного анализа для выявления антител к возбудителю демодекоза в сыворотках крови крупного рогатого скота с целью ранней диагностики заболевания

Практическая значимость работы:

Лечение демодекоза с применением испытанного комбинированного метода обходится дешевле, чем с применением препарата новомек в дозе 200 мкг/кг двукратно и проводится с применением минимальных доз акарицидов

Охарактеризованы антигены клеща *Demodex bovis*, пригодные для создания метода ранней диагностики заболевания на основе непрямого твердофазного иммуноферментного анализа. Материалы наших исследований по выделению антигена клеща *Demodex bovis* вошли в «Методические рекомендации по выделению и определению антигена возбудителя демодекоза крупного рогатого скота – клеща *Demodex bovis*» утвержденные Отделением ветеринарной медицины РАСХН 24 января 2008 г

Основные положения, выносимые на защиту:

На основе полученных данных на защиту выносятся

- результаты испытаний инсектоакарицидных препаратов при демодекозе крупного рогатого скота,
- результаты испытаний комбинированного метода лечения при демодекозе крупного рогатого скота,

- результаты исследований антигенов клеща *Demodex bovis*, участвующих в иммунопатогенезе демодекоза,

Публикации:

По материалам диссертации опубликовано две научные работы

Апробация работы:

Основные материалы исследований были доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (2005-2007 гг) и на межлабораторном совещании Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (2007 г)

Объем и структура диссертации: Диссертационная работа изложена на 138 листах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных результатов исследований, обсуждения, выводов, практических предложений, списка цитированной литературы, включающего 210 источников, в том числе 115 иностранных авторов. Материалы диссертации иллюстрированы 23 таблицами и 16 рисунками

2 Собственные исследования

2.1 Материалы и методы исследования

Работа проводилась с 2004 по 2007 год в группе по изучению инсектицидов микробиологического синтеза лаборатории санитарной микробиологии ВНИИ ветеринарной санитарии гигиены и экологии (Москва). Иммунологические исследования по ранней диагностике демодекоза крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа проводили в отделе иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск, Серпуховского района, Московская область)

Обследования животных на наличие демодекозной инвазии, сбор демодекозных колоний, образцов сывороток, проведение опытов по испытанию эффективности инсектоакарицидных препаратов проводили в хозяйствах

Московской области Всего было обследовано 2968 коров Обследование кожевенного сырья и изучение новых методов сортировки проводили на кожсырьевом складе – филиале компании «КОУДЖЕК» в г Курск. Всего было обследовано 1134 парных и консервированных мокросолением шкур

Клиническое обследование животных на наличие демодекоза проводилось путем осмотра и пальпации кожного покрова животного При наличии клинических признаков заболевания диагноз подтверждали микроскопически При этом на пораженном участке выстригали шерсть, участок кожи дезинфицировали и кровопускательной иглой делали прокол в центр поражения Затем выдавливали содержимое, которое переносили на предметное стекло, добавляли каплю вазелинового масла, иглой равномерно распределяли препарат по стеклу и исследовали под малым увеличением микроскопа в затемненном поле

Для определения интенсивности демодекозной инвазии использовали классификацию Ларионова С В (1980) Для описания клинических признаков использовали классификацию гипов колоний Скосырских Л Н (1993)

Обследование кожевенного сырья на наличие демодекозных пороков проводили во время сортировки поступивших на кожсырьевой склад партий сырья Каждую шкуру осматривали со стороны волосяного покрова, затем с мездряной стороны и проводили пальпацию Мокросоленное сырье осматривали дополнительно очищая от соли и грязи Сырые шкуры осматривали и пальпировали без дополнительной очистки

Испытание эффективности инсектоакарицидных препаратов проводили в хозяйствах Московской области В опытах использовали животных пораженных демодекозом в различной степени Сроки наблюдения составляли 30 дней и более, в зависимости от цели опыта Каждый учетный период животных осматривали, проводили подсчет колоний, выборочно проводили микроскопию содержимого демодекозных колоний Обязательным условием опыта была подробная регистрация происходящих количественных и качественных изменений демодекозных колоний Критериями эффективности

препаратов являлась гибель клещей в колониях, а также количественные и качественные изменения демодекозных колоний. Погибшими считали клещей с явной деструкцией тела

Испытание препаратов гиподектин – н, циперил, новомек проводили летом в период максимальной интенсивности инвазии. Испытание комплексного метода лечения, включающего совместное применение препаратов циперил и новомек, проводили в период минимальной интенсивности инвазии – зимой

Препарат гиподектин – н применяли в дозе 15 мл на голову путем нанесения на пораженные демодекозом участки кожи из флакона из-под препарата акаромектин с распылительной головкой

Препарат новомек применяли в двух режимах

- по основному наставлению по применению новомека против паразитарных болезней животных» в дозе 200 мкг/кг подкожно с интервалом 10 дней. Препарат вводили при помощи аппарата Шилова

- в составе комплексного метода лечения демодекоза по «Дополнению к наставлению по применению новомека против паразитарных болезней животных» вводили его внутрикожно из безыгольного инъектора в область шеи два раза по 0,2 мл (общая доза 0,4 мл на животное)

Препарат циперил самостоятельно и в составе комплексного метода лечения применяли согласно «Наставлению по применению циперила для борьбы с эктопаразитами животных», не превышая установленных норм применения для лактирующих животных. Животных, пораженных демодекозом, при помощи опрыскивателя нагнетательного типа Laser G10 (Франция) опрыскивали 0,0125% эмульсией препарата циперил с нормой расхода 2 литра на животное по всей поверхности тела. Через 10 дней обработку циперилом повторяли

В качестве контрольных служили животные, пораженные демодекозом, которых ничем не обрабатывали

Для проведения иммунологических исследований и изучения иммунореактивных белков клеща *Demodex bovis* от всех больных животных собирали содержимое демодекозных колоний I, II, III типа. Экстракцию белков из содержимого демодекозных колоний проводили путем перетиранья колоний в фосфатно - солевом буфере (рН 7.2) без добавления детергента и с добавлением детергента (6М гуанидинхлорида) в стеклянном гомогенизаторе с последующей ультразвуковой дезинтеграцией суспензии на аппарате VirSonic 100. Режим обработки 20кГц, 80 Вт/см² 3 раза по 20 сек с перерывом 30 сек на льду. Контроль гомогенизации проводили путем микроскопии капли суспензии. Конец гомогенизации определяли по отсутствию целых клещей в поле зрения микроскопа. Полученный образец центрифугировали при 5000g 10 минут. Полученный супернатант хранили аликвотами при -20°C и использовали как антиген при проведении иммунологических исследований в непрямом твердофазном иммуноферментном анализе, иммуноблоттинге, двойной двумерной иммунодиффузии.

Имуноферментный анализ проводили по Егорову А. М. (Егоров А. М. и др. 1991).

Для удаления из экстракта белков демодекозных колоний небелковых компонентов, пептидов и балластных белков проводили очистку хлороформом. Для выделения из экстракта глобулинов (свободных и/или связанных) были использованы магнитные частицы конъюгированные с белком G «Bio Mag Plus Protein G Particle Antibody Isolation Starter Kit» (Polysciences Inc Германия) по методике производителя.

Электрофоретическое разделение белков содержимого демодекозных колоний проводили в полиакриламидном геле различной концентрации в денатурирующих условиях в присутствии натрия – додецилсульфата (SDS) по Laemmli (Laemmli U K 1970), в нативных условиях электрофорез проводили в 3% акриламидном геле по Hames (Hames B D 1990). Иммуноблоттинг проводили по Towbin (Towbin H et al 1979, 1984), перенос белков из геля после электрофореза осуществляли при помощи полужидкостного электроблоттера.

Для выявления пероксидазной активности мембрану после переноса белков из геля сразу замачивали в субстрате для пероксидазы с диаминобензидином

Для определения способности компонентов экстракта связывать иммуноглобулины без применения антивидовых конъюгатов меченых пероксидазой хрена, был проведен иммуноблоттинг с флуоресцирующими антителами. Для этого после переноса мембраны инкубировали с очищенными иммуноглобулинами класса G больных и здоровых животных мечеными флуоресцирующей меткой. Тестируемые немеченые сыворотки в иммуноблоттинге проявляли иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими антивидовыми против иммуноглобулинов быка («МЕДГАМАЛ» Россия). После инкубации мембраны отмывали, просушивали и визуализировали путем облучения ультрафиолетом с длиной волны 365 нм под углом 45 градусов на облучателе для тонкослойной хроматографии MinUVIS фирмы DESAGA (Германия).

Для выделения более чистых и концентрированных индивидуальных белков из смеси экстракта содержимого колоний проводили электроэлюцию белков и элюцию за счет диффузии из 12% полиакриламидного геля после электрофоретического разделения белков экстракта.

Концентрацию белка в препаратах определяли по методу Lowry (Lowry O H, 1951).

Экстракты, полученные после электроэлюции, оценивали на цитотоксичность в стандартном МТТ тесте по методике Hiroko Tada (Hiroko Tada, Osami Shihō et al 1986) на спектрофотометре «Униплан» («Пикон» Россия). Выживаемость клеток после воздействия на них фракций экстракта демодекозных колоний определяли по способности митохондриального фермента сукцинат-дигидрогеназы расщеплять тетразолевуую соль МТТ с образованием синего окрашенного продукта – формазана.

Для определения локализации иммуноглобулинов связывающих белков в клещах *Demodex bovis* их обрабатывали иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими антивидовыми против иммуноглобулинов быка.

Полученный образец осадка исследовали при помощи люминесцентного микроскопа “Люмам” Р-3 (“ЛЮМО”, Ленинград) Двойную двумерную иммунодиффузию применяли для анализа антигенной структуры нативного экстракта без применения антивидовых конъюгатов и дополнительных его обработок Метод проводили по Ouchterlony (Ouchterlony 1958) в 1,5% агарозном геле

Статистическую обработку проводили с использованием общепринятых методов статистического анализа (Лакин Г Ф 1990) Достоверность полученных данных оценивали с применением коэффициента Стьюдента, с вероятностью $P > 0,95$

2.2 Распространение демодекоза в хозяйствах Московской области

Последняя работа, наиболее полно характеризующая распространение демодекоза в Московской области датируется 1998 годом (Василевич Ф И 1998), для выполнения нашей работы мы выяснили состояние данного вопроса в настоящее время Исследования проводились в хозяйствах Московской области в различные сезонные периоды С целью выявления заболевания во всех случаях проводили клиническую и микроскопическую диагностику каждого обследованного животного Всего нами было обследовано 2968 голов крупного рогатого скота из 8 хозяйств 4 районов Московской области Больные демодекозом животные были выявлены в 7 хозяйствах Экстенсивность инвазии при этом составила 0,58% - 12,50% Всего было обследовано 2968 голов крупного рогатого скота и выявлено 114 больных животных, что составляет 3,84%

Следует отметить, что в хозяйстве «Совхоза им Чапаева» (Ногинский р-н), где содержатся животные, привезенные из разных хозяйств западных земель Германии, демодекоза не выявлено В остальных хозяйствах, где проводилось обследование, весь скот Российский При изучении распространения демодекоза установлено, что животные с клиническими признаками болезни имеют различную степень интенсивности инвазии 64,91% слабую, 28,95% - среднюю, 5,26% - сильную, 0,88% генерализованную форму демодекоза

2.3 Изучение пораженности кожевенного сырья демодекозом

Помимо изучения распространения демодекоза крупного рогатого скота в некоторых районах Московской области, мы изучили распространение демодекоза крупного рогатого скота в Центральном - Черноземном регионе РФ по степени поражения кожевенного сырья демодекозом, путем осмотра партий кожевенного сырья, поступающего из разных областей. Всего нами было обследовано 1134 шкур, как парных, так и консервированных мокросолением поступивших из Белгородской, Орловской, Липецкой, Курской областей. Нами было обнаружено 3 шкуры с демодекозными пороками, что составляет 0,26 % от общего количества осматриваемых шкур.

2.4 Испытание эффективности инсектоакарицидных препаратов при демодекозе крупного рогатого скота.

Учитывая, что демодекоз крупного рогатого скота наносит значительный экономический ущерб народному хозяйству, разработка эффективных мер борьбы с этим заболеванием актуальна и на сегодняшний момент. При изыскании более совершенных мер борьбы с демодекозом крупного рогатого скота, нами были учтены литературные данные, касающиеся борьбы с демодекозом крупного рогатого скота, а также некоторые фармакокинетические особенности препаратов наиболее широко применяющихся при лечении демодекоза.

Существующие методы и схемы лечения демодекоза позволяют решить задачи борьбы с этим заболеванием, но из-за трудоемкости, расхода большого количества акарицидов требуют совершенствования. Известно, что использование инсектоакарицидных препаратов в больших концентрациях приводит к накоплению их в организме животного и длительному выделению их остаточных количеств, что ограничивает их применение для обработок дойного скота.

С целью совершенствования методов лечения демодекоза крупного рогатого скота, а также с целью попытки внедрения их для лечения дойного

скота, нами были испытаны препараты гиподектин – н, циперил, новомек, а также комплексное использование препаратов циперил и новомек

Испытание эффективности препаратов гиподектин – н, новомек и циперил при лечении демодекоза крупного рогатого скота показали, что каждый из препаратов не приводит к полному выздоровлению животных, однако обеспечивает снижение интенсивности инвазии Циперил, методом опрыскивания 0,0125% эмульсией с нормой расхода 2 литра на животное двукратно, приводит к снижению интенсивности инвазии на 52,6% Гиподектин – н в микродозе 2 мкг/кг веса на кожно однократно на 26,9% Применение при демодекозе препарата новомек при внутривенном введении в микродозе 10 мкг/кг веса приводит к снижению интенсивности инвазии на 36,5%

При сопоставлении данных об изменении количества демодекозных колоний по типам мы пришли к выводу, что препарат новомек действует в основном на колонии I типа, а препарат циперил на колонии II типа Гиподектин – н действует на все колонии, однако недостаточно эффективно

Так как и новомек и циперил действуют в основном на разные типы колоний, обеспечивая при этом снижение интенсивности инвазии, мы испытали эти два препарата совместно в комплексном методе лечения демодекоза При испытании мы сравнивали данный метод с методом, предложенным Скосырских ЛН (1993) для лечения животных с сильной степенью поражения демодекозом

Испытание комплексного метода лечения демодекоза проводили в хозяйстве СПХ «Осетр» в период наименьшей интенсивности инвазии, в декабре месяце

Для этого всех животных, пораженных демодекозом, поделили на три группы Животных первой группы обрабатывали препаратом циперил на кожно с одновременным внутривенным введением препарата новомек Через 10 дней обработку циперилом повторяли Животных второй группы обрабатывали препаратом новомек согласно наставлению по применению новомека против

паразитарных болезней животных в дозе 200 мкг/кг двукратно с интервалом 10 дней Контрольных животных третьей группы ничем не обрабатывали

За время наблюдения интенсивность инвазии в группах 1 и 2 достоверно снизилась на 53,3% и 89,3% соответственно, а в контрольной выросла на 10,3% Помимо уменьшения интенсивности инвазии, в 1 и 2 группе произошло изменение экстенсивности инвазии (таблица 1) На 30 сутки после второй обработки (40 после первой) во второй группе выздоровели 7 голов (87,5%) крупного рогатого скота из 8, а в первой 13 (81,3%) из 16

Таблица 1 - Изменение экстенсивности инвазии при испытании комплексного метода лечения демодекоза

Группа	Количество здоровых животных, от исходного %		
	10 сутки после второй обработки	20 сутки после второй обработки	30 сутки после второй обработки
Группа 1, n=16	0	43,7	81,2
Группа 2, n=8	0	37,5	87,5

При осмотре на 60 сутки после первой обработки в первой и второй группе больных животных не регистрировали, кроме обнаруженных ранее. В контрольной группе интенсивность инвазии увеличилась на 10,5% от первоначальной

Испытанный нами комплексный метод, по своей эффективности не уступает ранее рекомендованному методу лечения При его эффективности 81,2%, он пригоден для лечения демодекоза, а также для обработки животных с бессимптомным течением болезни, если в хозяйстве животных с клиническими признаками демодекоза обрабатывают иным методом Данный метод позволяет экономично расходовать акарицидные препараты и обходится в 3 раза дешевле, чем предложенный ранее

Большинство методов лечения демодекоза крупного рогатого скота имеют один недостаток - ограничение их применения для обработок дойного скота. Мы считаем, что разработанный нами комплексный метод, после определения остаточных количеств ивермектина в молоке и мясе, можно будет рекомендовать для обработки дойных животных ввиду применения микродоз ивермектина.

2.5 Изучение возможности разработки и внедрения в практику ранней диагностики демодекоза крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа

Для решения вопросов совершенствования диагностики демодекоза крупного рогатого скота мы использовали подходы, реализованные при идентификации иммунореактивных белков клеща *Sarcoptes scabiei* и личинок оводов *Hypoderma lineatum* и *Hypoderma bovis*. На сегодняшний день эти белковые антигены являются основой диагностических тест систем для определения специфических антител к возбудителю саркоптоза и гиподерматоза животных соответственно. При изучении возможности создания метода ранней диагностики демодекоза крупного рогатого скота на основе иммуноферментного анализа, мы исходили из того, что на присутствие в организме антигенов клеща *Demodex bovis*, вырабатываются антитела и образуется комплекс антиген - антитело. Так как не известно, присутствует ли данный антиген внутри клеща или это некий секреторный белок, а так же какая стадия развития клеща может продуцировать данный антиген, на начальном этапе мы исследовали экстракт содержимого демодекозных колоний.

Попытка обнаружить антитела к белкам *D bovis* в сыворотке больных животных методом непрямого иммуноферментного анализа с использованием данного экстракта в качестве антигена не принесла результатов. Значения оптической плотности при тестировании в иммуноферментном анализе сывороток больных животных и здоровых достоверно не отличались. Это связано, в первую очередь со сложным составом экстракта. Дальнейшие эксперименты выявили, что экстракт из колоний клещей *D bovis* в

иммуноферментом анализе неспецифически связывается с антивидовым конъюгатом. Такое связывание объясняется наличием свободных и связанных с антигенами клеща коровьих иммуноглобулинов в экстракте.

Результаты электрофореза в 12% полиакриламидном геле (Рис. 1 А) и иммуноблоттинга (Рис.2 Б) указывают на присутствие иммуноглобулинов в экстракте. Из рисунков 1 и 2 видно, что в составе экстракта присутствуют белковые компоненты, которые связываются с антивидовым конъюгатом идентично иммуноглобулинам класса G (IgG) в областях с молекулярной массой около 64 кДа и 28 кДа. Экстракт, кроме этого содержит другие IgG связывающие компоненты. Следует отметить, что специфическое связывание IgG из сывороток коров в иммуноблоттинге не регистрировали.

Помимо компонентов неспецифически связывающих IgG, мы обнаружили, что белок молекулярной массой 10 кДа обладает пероксидазной активностью, поскольку он проявлялся на мембране после инкубации в субстрате для пероксидазы.

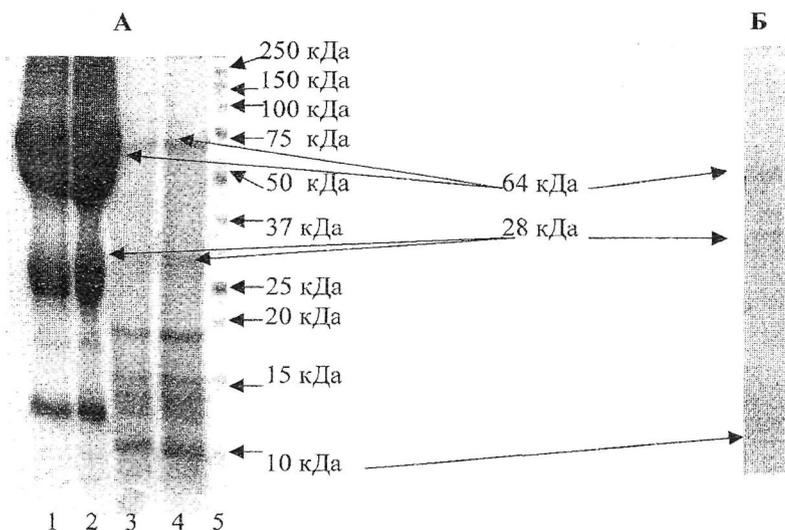


Рисунок 1 – Электрофореграмма сывороток и экстракта в 12% геле (А) и иммуноблоттинг мембраны с антивидовым конъюгатом (Б): 1 – сыворотка

здоровой коровы, 2 – сыворотка больной коровы, 3, 4 - экстракт содержимого демодекозных колоний, 5 – маркеры молекулярного веса.

Установлено, что в реакцию с субстратом для пероксидазы вступает триплет белков в области 10 кДа. Данный триплет обладает также способностью неспецифически связывать иммуноглобулины и обладает цитотоксичностью.

После частичной очистки экстракта хлороформом и выделения из экстракта иммуноглобулинов (свободных и/или связанных) при помощи магнитных частиц конъюгированных с белком G мы получили более пригодные для проведения иммунологических исследований препараты.

Результаты электрофоретического разделения препаратов после очистки хлороформом и после смыва с магнитных частиц присоединенных белков представлены на рисунке 2.

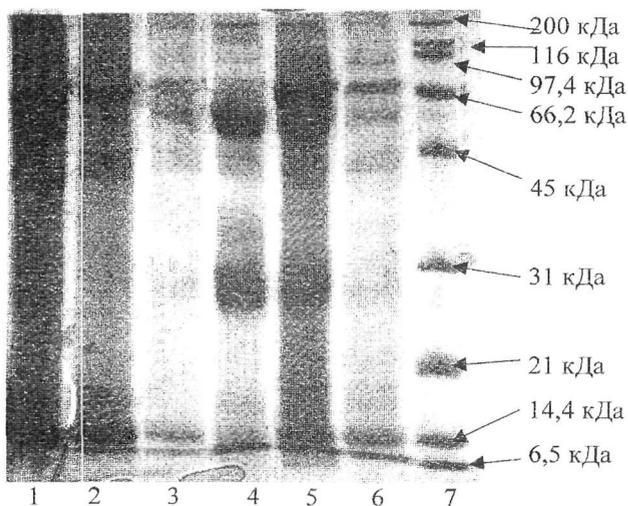


Рисунок 2 – Электрофореграмма белковых препаратов: цельного экстракта (1), экстракта очищенного при помощи магнитных частиц (2), третьего элюата с магнитных частиц (3), второго элюата с магнитных частиц (4), первого (основного) элюата с магнитных частиц (5), хлороформенного экстракта (6), маркеры молекулярного веса (7).

Как видно из рисунка 2 экстракция хлороформом приводит к удалению части компонентов экстракта и приводит к лучшему разделению высокомолекулярных белков. Из качественного изменения стоит отметить исчезновение белковой полосы с весом 90 кДа и целого ряда белков в области 21 - 30 кДа.

Помимо электрофоретического разделения препаратов после очистки был проведен иммуноблоттинг первого элюата с магнитных частиц с сыворотками больных демодекозом и здоровых коров. Для этого отдельно было смешено 10 сывороток коров больных демодекозом с разной степенью поражения (5 в сильной, 3 в средней, 2 в слабой) и 10 сывороток от здоровых животных. Результаты иммуноблоттинга представлены на рисунке 3.

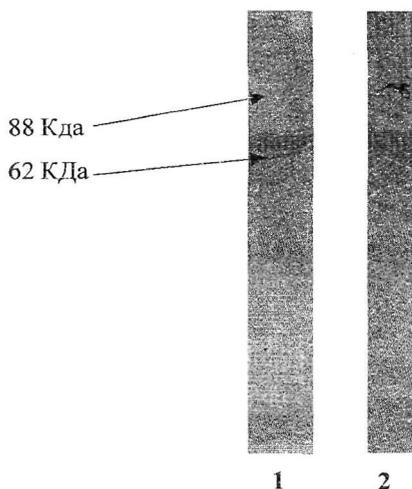


Рисунок 3 – Мембраны, проявленные объединенными сыворотками больных демодекозом коров (1) и объединенными сыворотками здоровых коров (2).

Как видно из рисунка 3, на мембране 1 присутствует белок в области 88 кДа, которого нет на мембране 2. Также на мембране 1 сразу под полосой 64 кДа (тяжелые цепи иммуноглобулинов) присутствует ярковыраженная полоса в области 62 кДа, которая на мембране 2 представлена весьма слабо. В

остальном, полосы на мембранах совпадают полностью. Они являются фоном реакции, и не отличаются от тех, что мы получали ранее при проведении иммуноблоттингов с индивидуальными сыворотками.

Таким образом, установлено, что в экстракте содержимого демодекозных колоний присутствуют антигены клеща *Demodex bovis*. Часть из них, по всей видимости, участвует в иммунопатогенезе заболевания, и не имеет диагностической ценности. Диагностическую ценность имеют белки с молекулярным весом 62 и 88 кДа.

Выводы

1 Установлена заболеваемость крупного рогатого скота демодекозом в Московской области. Из обследованных 2968 животных в 8 хозяйствах 4 районов 3,84% были поражены демодекозом. Из них 64,91% имели слабую интенсивность инвазии, 28,95% - среднюю, 5,26% - сильную, 0,88% генерализованную форму демодекоза. Пораженность кожевенного сырья демодекозом, поступившего из областей Центрально-Черноземного района РФ, составила 0,26%.

2 Применение при демодекозе препаратов циперил методом опрыскивания 0,0125% эмульсией с нормой расхода 2 литра на животное двукратно и гиподектина-н в микродозе 2 мкг/кг веса наочно однократно, приводит к снижению интенсивности инвазии на 52,6% и 26,9% соответственно.

3 Применение при демодекозе препарата новомек при внутрикожном введении в микродозе 10 мкг/кг веса приводит к снижению интенсивности инвазии на 36,5%.

3 Эффективность комбинированного метода лечения с применением микродоз акарицидов, включающий совместное применение препарата циперил методом опрыскивания 0,0125% эмульсией с нормой расхода 2 литра на животное с одновременным внутрикожным введением препарата новомек в дозе 10 мкг/кг веса с повторной обработкой через 10 суток циперилом составляет 81,2%. Эффективность ранее рекомендованного метода,

включающего двукратное подкожное введение новомека в дозе 200 мкг/кг составляет 87,5%

4 Обработка животных с применением комплексного метода обходится в 3 раза дешевле, по сравнению с известными методами борьбы с этим заболеванием

5 В состав экстракта содержащего демодекозных колоний входят антигены клеща *Demodex bovis* -- триплет белков в области 10 кДа, обладающий пероксидазной активностью, цитотоксичностью и способностью неспецифически связывать иммуноглобулины

6 Антигены клеща *Demodex bovis* – белки с молекулярным весом 88 кДа и 62 кДа специфически связываются с иммуноглобулинами коров пораженных демодекозом

7 Выделенные из колоний демодекозных клещей белки с молекулярным весом 88 кДа и 62 кДа возможно использовать в качестве специфических антигенов тест-системы для серологической диагностики демодекоза крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа.

6 Предложения для практики

Использовать выделенные из колоний демодекозных клещей белки с молекулярным весом 88 кДа и 62 кДа в качестве специфических антигенов для создания тест-системы для серологической диагностики демодекоза крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа. Материалы наших исследований по выделению антигена клеща *Demodex bovis* вошли в «Методические рекомендации по выделению и определению антигена возбудителя демодекоза крупного рогатого скота – клеща *Demodex bovis*» утвержденные Отделением ветеринарной медицины РАСХН 24 января 2008 г

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1 Соловьев П В , Баранова Е В , Бикетов С Ф , Непоклонов А А Изучение иммунореактивных белков клеща *Demodex bovis* - Ветеринарная патология, 2007, 3, с 117-122

2 Soloviev P V, Baranova E V, Biketov S F, Nepoklonov A A An immunochemical study of the proteins from *Demodex bovis* mites/ In Abstract book - Conference for young scientist, PhD students and students on molecular biology and genetics Dedicated to 120th anniversary of M I Vavilov, Kyiv, 2007, p 189

ВНИИВСГЭ, 2008 г , Москва, Звенигородское ш , 5
Заказ 274/1, тираж 80 экз