

На правах рукописи



РУДЕНКО
Андрей Александрович

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИНЦИПОВ
ДИАГНОСТИКИ И ОЗДОРОВИТЕЛЬНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ
ПРИ ЛЕЙКОЗЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа 2004

2005-4
12175

На правах рукописи

РУДЕНКО
Андрей Александрович

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИНЦИПОВ
ДИАГНОСТИКИ И ОЗДОРОВИТЕЛЬНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ
ПРИ ЛЕЙКОЗЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

16.00 03 - ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа 2004

862149

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет»

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
Галеев Рафаэль Фаррахович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Курамшина Наталья Георгиевна;
кандидат ветеринарных наук,
Янбарисова Светлана Рафаэловна

Ведущая организация: Башкирский научно-исследовательский
ИНСТИТУТ сельского хозяйства

Защита состоится «25 » июня 2004 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д. 220.003.03 при ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет»

Адрес университета: 450001, г. Уфа, ул. 50 лет Октября, 34.

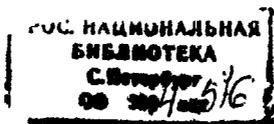
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет».

Автореферат разослан «25» мая 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



Кутлин Н.Г.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы. Наиболее актуальной проблемой стоящей перед отечественным животноводством, является полное обеспечение потребности населения страны полноценными мясомолочными продуктами. Решение этой проблемы предполагает дальнейшее планомерное увеличение поголовья скота с использованием современных достижений ветеринарной и зоотехнической науки и повышение продуктивности сельскохозяйственных животных на основе ветеринарного благополучия.

Из многочисленных задач ветеринарной медицины существенное место занимают хронические инфекционные болезни сельскохозяйственных животных и птиц и, в частности, проблема лейкоза крупного рогатого скота (Л.Г. Бурба, 1976; В.П. Шишков, 1977; В.К. Паракин, 1979; Г.Р. Розенберг, 1979; Р.Ф. Галеев, 1981, 2000; В.М. Нахмансон, 1986; П.Н. Смирнов, 1998; и др.)

Лейкоз крупного рогатого скота (ЛКРС) - одно из наиболее распространенных лимфопролиферативных заболеваний, наносящих значительный экономический ущерб не только вследствие падежа, недополучения продуктов животноводства, но и опасностью потери уникального генофонда в молочном скотоводстве, т. к. болезнь поражает в первую очередь высокопродуктивных коров (Л.К. Эрнст, В.П. Шишков, 1984; В.М. Авилов, В.М. Нахмансон, 1995; М.З. Хайруллин, 1998).

Есть данные о способности некоторых онкогенных вирусов преодолевать межвидовые барьеры, а также о тенденции роста этих болезней (В.П. Шишков, 1988). Большое значение представляют проблемы потенциальной опасности для человека продуктов питания от животных из стад, неблагополучных по лейкозу, влияния вредных метаболитов, накапливающихся в организме больных коров, на организм человека, а также использования животных для получения различных биопрепаратов. Установлено, что мясо, полученное от больных лейкозом коров, имеет более высокую микробную обсемененность, обнаруживаются чаще бактерии группы *E.coli*, в тушах наблюдаются признаки дистрофий и миопатий (А.А. Кунаков, И.Г. Серегин, 1998). Качество молока и молочных изделий от больных и инфицированных вирусом коров при лейкозе понижается. В молоке и мясе образуются и накапливаются вредные метаболиты триптофана и других циклических аминокислот, что является опасным для здоровья человека, особенно для детей (П.Н. Смирнов, А.Г. Левашов, А.Г. Незавитин и др., 1991; Н.И. Петров, 1998).

Имеются данные об экспериментальном заражении обезьян бычьим лейкозом (McClure H.M., Ruling M.E., Custer P.Ph., 1979). Следует отметить, что имеется высокая степень сходства ВЛКРС с вирусом Т-клеточного лейкоза человека (HTLV-1, Human T-cell leukemia virus), относящемуся также к семейству Retroviridae. Это свидетельствует об их общем пути в процессе эволюции (М.И. Парфанович, 1987). Однако окончательного ответа на вопрос о возможности

взаимосвязи между заболеваниями лейкозами и другими болезнями опухолевой природы у животных и человека пока нет.

Существенный вклад в изучение вопросов эпизоотологии, этиологии, патогенеза, патоморфологии, биохимии, диагностики, специфической профилактики и роли наследственности внесли многие отечественные ученые Т.П. Кудрявцева 1969; В.П. Шишков, Г.Ф. Коромыслов 1977; А.Ф. Валихов, В.М. Нахмансон, Л.Г. Бурба, Р.Ф. Галеев, 1982; Н.И. Королев, 1983, К.Н. Кондрахина, 1985; Г.А. Симонян 1995; П.Н. Смирнов 1998; Н.И. Петров 1999; и зарубежные исследователи J. Miller, Van der Maaten, 1969, 1977; H. Bendixen, 1963, 1973 и другие.

Исходя из этого, представляет большой научный и практический интерес установления сроков оздоровления стад от лейкоза с использованием различных модификаций РИД-диагностики в зависимости от пораженности поголовья лейкозом ВЛКРС, породы животных, других факторов и методов осуществления противолейкозных мероприятий.

1.2. Цель и задачи исследований. Цель исследования - изучить закономерности распространения вируса и истинную эпизоотическую обстановку, факторы передачи и распространения ВЛКРС, определить эффективность оздоровительных мероприятий при данном заболевании.

Задачи исследований.

Для достижения цели исследования необходимо решить следующие задачи:

1. Методами комплексных клинико-гематологических и серологических исследований установить истинную эпизоотическую ситуацию по лейкозу поголовья крупного рогатого скота в хозяйствах Стерлитамакского района и наметить модельные хозяйства для проведения экспериментов

2. Выявить степень заболеваемости и инфицированности вирусом лейкоза поголовья скота различных возрастных групп, с учетом пород и принадлежности животных.

3. Провести сравнительную характеристику эффективности различных методов оздоровления неблагополучных по лейкозу хозяйств РБ в зависимости от степени пораженности поголовья, породного состава и технологии ведения животноводства.

4. Экспериментально изучить титры антител к ВЛКРС и чувствительность разных модификаций РИД до и после проведения вакцинаций животных, введения туберкулина и других биопрепаратов.

5. Провести сравнительный анализ титров антител к ВЛКРС в молочном секрете, молоке, молозиве и крови у коров различных пород и у телят родившихся от инфицированных вирусом коров, с учетом гематологических показателей коров-матерей.

1.3. Научная новизна. В результате проведенных исследований, впервые в Республике Башкортостан в условиях хозяйств различных форм собственности, с учетом процента инфицированности вирусом лейкоза отработаны и пред-

ложены эффективные методы оздоровления от лейкоза основных пород крупной рогатого скота, разводимых в регионе.

Теоретически обоснована и доказана возможность контроля эпизоотического состояния, профилактических и оздоровительных мероприятий методом исследования молока, молочного секрета и молозива путем с использованием модифицированного варианта, реакции иммунодиффузии в геле агара.

Экспериментально показано, что после проведения вакцинаций животных, введения туберкулина происходит повышение титров антител к ВЛКРС через 14-21-30 дней после обработок.

1.4. Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследований вошли в программу оздоровления хозяйств Республики Башкортостан и Стерлитамакского района на 2001-2005 годы.

В наших исследованиях показано, что в различные сроки беременности животных титр антител к вирусу лейкоза крупной рогатого скота, в молочном секрете, молоке и молозиве имеет принципиальное различие, в сравнении с титром антигена в сыворотке крови.

Полученные результаты позволяют рекомендовать проводить исследования на лейкоз крупной рогатого скота с учетом физиологического состояния животных (беременность, вакцинация, туберкулинизация).

Сроки оздоровления хозяйств от лейкоза существенно сокращаются при содержании телят в изолированных условиях и раздельной пастбе серонегативных и сероположительных животных с 6 месячного возраста

Результаты нашей работы включены в монографию «Лейкоз крупной рогатого скота» (Галеев Р.Ф., Уфл, 2003), а также используются в учебном процессе и в научных исследованиях на кафедре паразитологии, микробиологии и вирусологии ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет».

1.5. Основные положения диссертации выносимые на защиту:

1. Характеристика эпизоотической ситуации по лейкозу крупной рогатого скота в Республике Башкортостан за 1992-2003 годы и районирование территории республики по степени распространения заболевания;

2. Биологические особенности при диагностике сыворотки крови, плазмы молока, молочного секрета и молозива у коров-матерей и родившихся от них телят в различные периоды онтогенеза;

3. Особенности проведения оздоровительных мероприятий в зависимости от процента инфицированности поголовья стад вирусом лейкоза КРС, с учетом породного состава и форм собственности сельскохозяйственных предприятий

4. Изучение чувствительности РИД с использованием различных схем постановки и внесением ПЭГ-6000 в состав агара.

1.6. Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на Международных научно-практических конференциях «Проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса регионов России» (Уфа, 2002),

«Пути повышения эффективности АПК в условиях зступления России в ВТО» (Уфа, 2003), Республиканской научно-практической конференции молодых ученых и аспирантов «Аграрная наука в XXI веке»(Уфа, 2003).

Диссертационная работа апробирована на расширенном заседании кафедры паразитологии, микробиологии и вирусологии ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет» 11 ноября 2003 года.

1.7. Публикация результатов исследований. Основные положения работы опубликованы в 6 научных статьях.

1.8. Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и практических предложений, списка литературы, приложения. Работа изложена на 152 страницах текста компьютерного набора, содержит 23 таблицы, 5 рисунков. Библиографический список включает 254 источников, в том числе 62 да иностранных языках.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследовании

Объем диссертационной работы и использованные нами методы исследования находились в прямой зависимости от поставленных задач:

1. Использовали «Набор для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота» изготовленного Курской биофабрикой, который состоял из гликопротеидного антигена вируса лейкоза, разбавителя антигена, специфической преципитирующей сыворотки, солевой смеси агара и разбавителя солевой смеси агара. Для сравнительных экспериментальных исследований использовали лиофилизированный набор диагностикумов из Германии, который включал антиген вируса лейкоза, контрольную «положительную»сыворотку, контрольную «слабо-положительную» сыворотку и контрольную «отрицательную» сыворотку, для разбавления которых имелась стерильная дистиллированная вода.

2. Постановку реакции иммунодиффузии (РИД) проводили в описании Л.Г. Бурбы, А.Ф. Валихова (1977) в чашках Петри, традиционным методом, на основе методических указаний по диагностике лейкоза крупного рогатого скота. Использовали также модифицированный метод постановки РИД на лейкоз представленный в работах Ю.Н. Смирнова (1998) и Р.Ф. Галева (2000). Дм массовых серологических исследований на первом этапе с целью выяснения эпизоотической ситуации по лейкозу в хозяйствах Стерлитамакского района и подбора модельных хозяйств, с различным процентом инфицированности и породности скота, использовали методику постановки РИД в чашках Дрыгальского, ранее описанных в работах W. Wittmann, E.Jke Starick, Ht. Liebermann, 1983.

За период с 2001-2003 годы в Стерлитамакском районе Республики Башкортостан самостоятельно и с участием Стерлитамакской зональной ветеринарной лаборатории и Башкирской научно-производственной ветеринарной лаборатории в РИД исследовали и проанализировали более 81 тыс. проб сывороток крови крупного рогатого скота.

3. Клинико-гематологические исследования крупного рогатого скота инфицированного вирусом лейкоза по результатам серологических (РИД) исследований проводили общепринятыми методами. Характеристику гематологических показателей телят в возрасте до 1 года проводили основываясь на физиологических нормах, которые представлены в работе М.И. Гулюкина (1978). Животные старше этого возраста и взрослые коровы распределялись в зависимости от результатов серологических и клинико-гематологических исследований с учетом стадии лейкозного процесса, которые представлены в работах Г.А. Симоняна (1995).

Таблица 1.

Количество лейкоцитов и лимфоцитов в 1 мкл крови здорового, подозрительного на заболевание и больного лейкозом крупного рогатого скота («лейкозный ключ»)

Возраст животного	Здоровые животные		Подозрительные по заболеванию животные	Больные лейкозом Животные
	количество лимфоцитов в 1 мкл	процент лимфоцитов	(абсолютное количество лимфоцитов в 1 мкл)	(абсолютное количество лимфоцитов в 1 мкл)
1-2 года	до 12000	до 75	9000-11000	свыше 11000
2-4 года	до 11000	до 70	8000-10000	свыше 10000
4-6 лет	до 10000	до 65	6500-9000	свыше 9000
старше 6 лет	до 9000	до 60	5500-8000	свыше 8000

На основе «лейкозного ключа» животные были распределены на следующие группы:

- здоровые, интактные животные свободные от антител к вирусу лейкоза (контроль - показатели крови в пределах физиологической нормы);
- инфицированные, имеющие антитела к ВЛКРС, но с нормальными гематологическими показателями (5500-9000 лейкоцитов в 1 мкл крови);
- животные находящиеся в предлейкозном состоянии (10000-14000 лейкоцитов в 1 мкл крови);
- животные которые находятся в начальной стадии лейкоза (14000-40000 лейкоцитов в 1 мкл крови);
- животные в развернутой стадии лейкоза (свыше 40000 в 1 мкл крови);
- животные в конечной стадии лейкоза (с наличием характерных для лейкоза клинических симптомов и патологоанатомических изменений).

4. При изучении эпизоотологических особенностей развития лейкоза у крупного рогатого скота использовали ретроспективные, перспективные и экспериментальные приемы и методы исследований (М.Г. Таршис и соавт., 1975). Материалом для этих исследований послужили данные ветеринарной отчетности в Республике Башкортостан о выявлении инфицированных и больных лейкозом животных, движении неблагополучных пунктов на основе результатов клинико-гематологических и патологоанатомических исследований, а также ветеринарно-санитарной экспертизы убойных животных на мясокомбинатах. Сбор данных о регистрации лейкоза крупного рогатого скота проведен в 54 районах Республики Башкортостан. Глубина ретроспективного анализа составила 11 лет (1992-2003 годы)

По результатам исследований были разработаны программы оздоровления хозяйств Стерлитамакского района путем разделения хозяйств по степени инфицированности животных ВЛКРС и клинического проявления болезни.

5. Для изучения титров антител в реакции иммунодиффузии были подобраны 4 группы коров в количестве 112 голов и 2 группы нетелей (46 голов) черно-пестрой и симментальской пород МТФ Наумовка ФГОУ СПО «Стерлитамакский сельскохозяйственный техникум». В течение всего периода исследований от коров было получено 98 телят. От телят получали кровь для исследований с 5-7 дневного возраста и параллельно исследований с коровами-матерями.

Гематологические исследование коров и телят проводили по общепринятому методу. Гематологические показатели у телят до 12-месячного возраста оценивали, исходя из физиологической нормы (А.А. Кудрявцев, 1975), а также исследованием контрольных телят-аналогов, неинфицированных вирусом лейкоза КРС.

6. Для изучения титров антител в молочном секрете, молоке, и молозиве получали пробы объемом 15-20 мл в стерильные лабораторные бактериологические пробирки и закрывали резиновыми пробками. Эти пробы помещали для хранения в холодильник при +4°C, затем центрифугировали при 1500-2000 об/мин в течение 15-20 минут. Стерильными пастеровскими пипетками осторожно протыкали образовавшиеся в верхней части пробирки жировой слой и отсасывали жидкую часть содержимого. Полученные таким образом пробы исследовали в модифицированном варианте РИД (П.Н. Смирнов, Р.Ф. Галеев, 2000) с увеличенными лунками для исследуемых проб. Титрование проб проводили в двукратных разведениях. В некоторых случаях жир с пробирок снимали отдельными шпателями и проводили повторное центрифугирование молока, для получения более достоверных результатов, так как наличие жира мешает проведению четкой реакции.

Разработку схем и методов оздоровления от лейкоза крупного рогатого скота проводили в ОПХ «Стерлитамакское» ККХ «Заря» Стерлитамакского

района на основе действующих нормативных правил по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота.

Цифровой материал обработан статистически с вычислением стандартной ошибки и доверительных интервалов среднеарифметических величин на персональном компьютере.

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Республике Башкортостан

В Республике Башкортостан лейкоз крупного рогатого скота является серьезной ветеринарной проблемой. По данным клинико-гематологических, патологоанатомических и гистологических исследований, проведенных в республике в 2003 году болезнь была диагностирована у 4,96% исследованных животных. В 2003 году было исследовано 1 млн. 073 тыс. голов крупного рогатого скота с использованием серологической РИД-диагностики и выявлено 53012 положительно реагирующих (инфицированных) животных по республике, что составляет 5,2 % вирусносительства к исследованному поголовью. Гематологическим методом исследовали 56174 головы и выделено с высоким лимфоцитозом 2983 головы, что составляет 5,3% больных животных.

В целом, проведенные эпизоотологические, клинические, серологические и гематологические исследования показали, что из имеющихся в республике 2008 молочно-товарных ферм свободными от лейкоза оказались 208 (198 хозяйств в 40 районах), что составляет 15,3 %.

Следует отметить высокий процент инфицированности вирусом лейкоза среди крупного рогатого скота в хозяйствах Мелеузовского района - более 20%, Благовещенского района - более 40%, а в Уфимском, Кармаскалинском, Бирском районах до 60-80% к исследованному поголовью.

Возникновение лейкоза крупного рогатого скота в Республике Башкортостан, по нашим данным, связано с завозом в этот регион черно-пестрого скота из Калининградской области, Белоруссии, Прибалтики, Московской и Ленинградской областей. В республике заболевание было зарегистрировано в 1973 году при массовом обследовании скота в хозяйствах Дюртюлинского и Илшевского районов. При обследовании животных была ярко выражена картина развернутой стадии лейкозного процесса характеризующейся увеличением подкожных лимфатических узлов (предлопаточный, надколенной складки, надвывяранных).

Основной целью настоящей главы явилось - изучить и представить комплексную эпизоотическую ситуацию по лейкозу и лейкозной инфекции в

Республике Башкортостан в целом, с учетом разводимых период животных, в зависимости от природно-климатических зон.

Таблица 2

Динамика инфицированности крупного рогатого скота вирусом лейкоза в Республике Башкортостан (природно-климатические зоны)

Природно-климатическая зона	ГОДЫ											
	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Горно-лесная	3	1,2	1,9	2	3	2,8	3,5	3,3	3,7	2	2	1,03
II Лесостепная зона												
Северная лесостепь	10,5	15,8	15,6	13,6	16,1	16,1	17,5	17,2	17,5	14,8	8,6	7,44
Северо-восточная лесостепь	4,3	4,3	3,3	4,4	4,9	4,6	5,3	3,6	4	3,7	2,6	2,55
Южная лесостепь	14,3	11,7	9,5	8,1	9,5	11,2	10,7	11,3	9,7	8,6	5,7	5,08
III Степная зона												
Предуральская степь	10,3	9,7	9,5	7,7	8,7	7,9	6,2	8,5	7,9	7,2	5,2	4,77
Зауральская степь	7,1	6,7	6,7	6,7	7,3	6,9	6,4	5,9	5,1	5	4,1	3,92
По республике	11,2	10,1	9,9	8,3	9,9	9,8	9,8	9,9	9,5	8,3	5,5	5,2

На первом этапе мы провели серологический мониторинг с целью выявления эпизоотической ситуации в хозяйствах республики. Осуществили исследования более 81000 проб сывороток крови быков-производителей, Есоров, нетелей и телочек старше 6-ти месячного возраста из хозяйств и индивидуального сектора 4 районов, расположенных в разных природно-климатических зонах, с использованием серологической диаг ностики (РИД).

Из обследованного поголовья скота симментальской породы, в частности в СГЖ «Ашкарский» Мелеузовского района носителями вируса оказались 1261 голова крупного рогатого скота, старше 6 мес. возраста, что составляет 30%. Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3

Исследование крупного рогатого скота СПК «Ашкарский»

	Поголовье КРС	Положительно реагировало		Отрицательно реагировало	
		голов	%	голов	%
Общественный скот	3370	1238	36,7	2132	63,3
Индивидуальный сектор	853	23	2,7	830	97,3
Всего исследовано	4223	1261	30	2962	70,1

В Архангельском районе при проведении серологических исследований в хозяйствах, где разводится в большинстве скот бестужевской породы, картина инфицированности животных вирусом лейкоза несколько отличается.

В частности при исследовании крупного рогатого скота маточного стада Б СПК «Бакалдинское» зараженность животных составила 19,3% (результаты представлены в таблице 4).

Таблица 4

Исследование крупного рогатого скота СПК «Бакалдинское»

	Поголовье КРС	Положительно реагировало		Отрицательно реагировало	
		голов	%	голов	%
Телки ст. 6 мес.	80	29	36,25	2132	63,75
Коровы и нетели	169	19	11,24	150	88,76
Всего исследовано	249	48	19,28	201	88,72

Таблица 5

Частота инфекции вируса лейкоза и заболеваемости крупного рогатого скота в Республике Башкортостан

Показатель	Год						В сред- нем
	1998	1999	2000	2001	2002	2003	
Исследовано в РИД тыс. голов	1128	1092,2	1184,5	1175,7	1067,8	1072,5	1120,1
Выявлено РИД(+), тыс. гол.	ПО	108,7	112,4	97,8	58,7	53	90,1
Процент выявления инфицированных животных	9,8	10	9,5	8,3	5,6	4,9	8,64
Исследовано гематологическим методом, тыс. гол.	69,8	76,8	69,6	72,4	70,5	56,3	69,2
Выявлено больных лейкозом, тыс. гол.	4,3	4,3	3,6	3,1	4,2	2,98	3,8
Процент выявления больных лейкозом животных	6,2	5,6	5,1	4,3	6,1	5,3	5,4

Отмечается, что лейкозная инфекция имеет неодинаковую распространенность в различных природно-климатических зонах. Районы с высоким процентом вирусоносителей, расположены в условиях северной лесостепи (Иглинский, Благовещенский, Бирский, Янаульский Татышлинский и др.) и южной лесостепи (Аургазинский, Бакалинский, Дюртюлинский, Уфимский и др.). Наименьшее распространение лейкоз получил в горно-лесной зоне, которая представлена двумя районами - Белорецкий, Бурзянский. Это связано, по нашему мнению, с изолированным выращиванием кота, в основном, местной селекции более приспособленной к выращиванию в этих суровых горно-лесных условиях. Животные в этих районах свободно пасутся с ранней весны до поздней осени обособленными изолированными небольшими группами, вдали друг от друга, что предотвращает перезаражение поголовья вирусом лейкоза.

Полученные нами данные свидетельствуют о широком распространении ВЛКРС инфекции, заболевании крупного рогатого скота лейкозом в Республике Башкортостан и необходимости скорейшего оздоровления от инфекции ВЛКРС и лейкоза.

3.2.2 Результаты комплексных клинико-гематологических и серологических исследований крупного рогатого скота в хозяйствах Стерлитамакского района

С целью разработки научно-обоснованных предложений по усовершенствованию мер профилактики и борьбы мы провели комплексные исследования в Стерлитамакском районе.

В хозяйствах Стерлитамакского района сосредоточен ценный племенной генофонд крупного рогатого скота, представленного скотом черно-пестрой и симментальской пород.

Для выяснения эпизоотической ситуации по заболеванию лейкозом и ретровирусной инфекции, необходимо было одновременно проводить клинико-гематологическое и серологическое исследования крупного рогатого скота всех хозяйств района. В хозяйствах имелось 35967 голов крупного рогатого скота, в том числе 9541 коров и 3472 телок в возрасте старше 6 месяцев. Было подвергнуто серологическому (РИД) исследованию 10884 коров и 3123 телок перед случкой, гематологическому исследованию - 926 голов крупного рогатого скота (таблица 5).

После проведения первичных серологических исследований на наличие инфицирования скота вирусом лейкоза в стадах маточного поголовья в 2002 году было отмечено, что инфекция имеет место во всех хозяйствах Стерлитамакского района, за исключением СПКК им Салавата и СПКК «Ашкадар».

Сложная ситуация сложилась на молочно-товарных фермах ФГОУ СПО «Стерлитамакский сельскохозяйственный техникум», ККХ «Заря», СПК им. Машкина и ряде других хозяйств, где инфицированность поголовья составляла более 15%. В районе установлен один неблагополучный пункт по лейкозу - ФГОУ СПО «Стерлитамакский сельскохозяйственный техникум», где в 2002 году было гематологически исследовано 2001 голов КРС, а признано больных 261 голов, что составляет 13%, в 2003 году в хозяйстве осталось 13 голов гембольных животных из 607 голов исследовано по гематологии. По результатам этих исследований нами были разработаны для всех хозяйств планы оздоровительных мероприятий. Больные по крови животные ФГОУ СПО «Стерлитамакский сельскохозяйственный техникум» были сданы на мясокомбинат использованы на внутрихозяйственные нужды. Хозяйство было полностью восполнено 190 головами телок и нетелей собственного воспроизводства и закупленными племенными телками в количестве 85 голов.

Результаты гематологического и серологического исследований крупного рогатого скота хозяйств района

№ п/п	Наименование хозяйства	Всего скота	В том числе			МТФ	Результаты исследований								
			коров	быки-производители	телок ст.б мес		исследовано по РИД, голов	инфицировано	% выявленных	коровы		телки перед случкой		Гематологические исследования	
										исследовано по РИД, голов	"+" в РИД	исследовано по РИД, голов	"+" в РИД	всего голов	из них признано гемобляными
1	СПКК «Урал»	1875	550	7	240	1	891	176	19,8	613	166	260	12	164	0
2	СПКК «Ашкадар»	680	200	5	82	2	517	0	0	264	0	64	0		
3	Колхоз им Фрунзе	1211	350	3	108	2	740	96	13	476	96	102	0		
4	СПКК им Калинина	2208	540	10	180	2	1085	85	7,8	496	61	257	15		
5	СПКК им Шевченко	828	300	8	71	1	554	115	20,8	317	108	0	0		
6	СПК им Мапкина	2305	550	15	156	4	1113	187	16,8	730	155	142	19	155	0
7	СПКК им Салавата	1351	410	8	125	3	972	12	1,2	494	12	208	0		
8	СПКК «Авангард»	1700	500	10	141	3	1159	99	8,5	563	71	175	0		
9	ККХ «Заря»	1063	221	5	111	1	495	214	43,2	206	128	159	40		
10	СПК «Чайка»	1020	350	7	90	2	1007	151	15	459	122	129	10		
11	СПКК «Родина»	1606	300	10	135	2	714	43	6	309	33	0	0		
12	АКХ «Красное Знамя»	660	150	6	72	2	274	87	31,8	266	85	0	0		
13	СПКК «Дружба»	1727	530	8	177	3	328	127	38,7	182	103	0	0		
14	СПКК им Свердлова	570	150	8	81	2	512	145	28,3	281	102	113	40		
15	СПК «Труд»	901	320	5	86	1	700	182	26	420	165	135	3		
16	СПКК «Некра»	773	200	3	143	1	748	50	6,7	227	30	0	0		
17	СПК «Юлдуз»	992	300	6	122	3	588	36	6,1	382	36	204	0		
18	СПКК им. Ленина	660	150	6	76	1	341	118	34,6	269	107	66	8		
19	СПКК им. 50 лет Октября	2246	250	4	104	1	253	47	18,6	253	47	0	0		
20	СПКК «Зенит»	470	140	3	59	1	268	38	14,2	156	38	0	0		
21	СПК «Первомайский»	2900	900	22	282	5	1471	41	2,8	820	31	89	0		
22	СПК «Стерлитамакский»	3340	1000	20	334	4	1974	95	4,8	1184	87	254	8		
23	ФГОУ СПО "Стерлитамакский сельхозтехникум"	2503	700	12	289	3	2449	1049	42,8	1161	744	447	72	607	13
24	АО «Маринское»	1250	250	4	110	1	399	12	3	173	12	96	0		
25	ОПХ «Стерлитамакское»	860	230	5	98	2	877	0	0	178	0	232	0		
	ВСЕГО	35699	9541	200	3472	53	20429	3205	15,7	10884	2539	3132	227	926	13

3.2.3 Результаты сравнительного анализа титров антител к ВЛКРС в сыворотке крови, молоке и молозиве корое-матерей различных пород и родившихся от них телят

Было исследовано 112 коров (по 28 голов в 4 группах) и 46 голов нетелей (2 группы животных по 23 головы в каждой), беременностью от 6 до 9 месяцев в молочном комплексе (практически до отела).

Инфицированных ВЛКРС коров и нетелей исследовали в при беременности с 5-тимесячного возраста беременности в РИД. Подвергли исследованию молоко у лактирующих коров, у нетелей и сухостойных коров - молочный секрет на предмет наличия антител к вирусу лейкоза.

У животных со сроком стельности 5 и 6 месяцев наблюдаются одинаковые титры антител в молоке и сыворотке крови. При стельности в 7 месяцев наблюдается некоторое увеличение титров антител в молоке молочном секрете коров и нетелей, тогда как в сыворотке крови количество антител несколько снижается. Такая картина наблюдается и при 8-мимесячной беременности.

Сразу после отела у коров и в первые дни жизни у телят, после получения ими молозива своих коров-матерей титры антител в крови у коров очень низкие, тогда как в молозиве титр антител очень высокий. В сыворотке крови у новорожденного теленка наблюдается высокий титр колостральных антител.

При анализе беременных животных было выявлено то, что наблюдается выпадение реакции с сывороткой крови коров с беременностью в 8-9 месяцев и в течении 2-3 недель после отела. В некоторых случаях реакции оказывались у таких животных слабо-положительными и даже неспецифическими.

Основываясь на этих результатах следует иметь в виду, что при диагностических исследованиях на лейкоз крупного рогатого съота, практиковать взятие крови на исследования за 1 месяц до и после отела, с: целью достоверности диагностики реакции иммунодиффузии.

В связи с физиологическим состоянием в организме животного в зависимости от беременности происходят увеличение концентрации антител в крови, молозиве и молоке (после рождения ПОТОМСТВА). В этот период наблюдается различение при диагностике заболеваний на лейкоз в связи с изменением в крови титров вируснейтрализующих антител к ВЛКРС. То есть понижается при 8,5-9 месячной беременности и в первые 2-3 недели после отела (практически не выявляются в РИД) и увеличиваются титры антител в сыворотке крови новорожденных телят. Исследование первых порций молозива, на 2-3 дгнь, 5, 10, 15 дни показало неуклонное снижение титров антител в молозиве и млоке при удалении от дня отела коровы-матери.

Титры антител в сыворотке крови, молоке, молочном секрете и молозиве не отличаются вне зависимости от породы животных.

3.2.4 Результаты исследований КРС различных половозрастных групп с учетом породной принадлежности на лейкоз

Изучение устойчивости, восприимчивости разных пород крупного рогатого скота к ВЛКРС-инфекции и заболеваемости лейкозом имеет важное теоретическое и практическое значение. Учитывая, что в Республике Башкортостан лейкоз крупного рогатого скота имеет широкое распространение, нами сделана попытка на большом поголовье изучить влияние породной принадлежности на частоту ВЛКРС инфекции и заболеваемости лейкозом. Изучена частота инфекции крупного рогатого скота черно-пестрой, симментальской, пород, численностью 2711 голов (таблица 7).

Таблица 7
Распространенность ВЛКРС инфекции разных пород

Порода	Исследовано в РИД	Из них			
		РИД(+)		РИД(-)	
		голов	%	голов	%
черно-пестрая	1458	821	56,3	637	43,
Симментальская	1253	432	34,5	821	65,5
Всего	2711	1253	46,2	1458	53,8

Полученные данные говорят нам о том, что среди поголовья крупного рогатого скота симментальской породы распространенность ВЛКРС почти в два раза меньше, чем среди животных черно-пестрой породы. Такая разница объясняется тем, что иммунологически симментальский скот более устойчив против вируса лейкоза.

Лейкоз крупного рогатого скота в хозяйствах Стерлитамакского района Республики Башкортостан регистрируется в течение последних двадцати-тридцати лет. В начале болезнь диагностировали по данным гематологических исследований, клинических симптомов и патологоанатомических вскрытий.

В хозяйствах района по состоянию на 31.12. 2002 г. имелось 35976 голов крупного рогатого скота, в том числе 10306 коров и 18655 телок в возрасте старше 6 месяцев. Было подвергнуто серологическому (РИД) исследованию 11413 коров и нетелей и 5828 телок 6-12 месяцев возраста. Гематологическим методом исследовано 2001 коров и нетелей, так как больные по крови телки выявляются в очень ограниченном количестве.

Для уточнения эпизоотической ситуации были отобраны 4 хозяйства, в целях выбора более обоснованного варианта оздоровления для каждого из них.

ОПХ «Стерлитамакское» с поголовьем 902 голов, в том числе 221 коров и нетелей, 380 телок старших возрастов, что составляют 24,5% к общему поголовью. Число серопозитивных коров и нетелей в 2002 году варьировало в пределах от 4,5 до 9%, больных лейкозов - от нуля до 1,2%, то в 2003 году после сдачи инфицированного поголовья реагирующего на лейкоз скота осталось 2 головы. Число инфицированных телок варьировало в пределах от 12 (3,16%) до 40 (10,5%) голов к исследованному поголовью. В 2003 году после отделения инфицированных телок от здорового скота, серопозитивных животных не обнаружено. Таким образом, в этом хозяйстве отмечена незначительная степень инфицированности скота, как лейкозом, так и вирусной инфекцией, а случаи обнаружения инфицированных вирусом животных в большом количестве имели давность не более 2-3 лет.

СПК им. Машкина. Хозяйство с поголовьем в 2305 голов в котором симментальская порода насчитывает до 65 % от общего количества животных. Черно-пестрый скот в это хозяйство завозился за последние 15 лет. Число инфицированного поголовья коров составило 27,3 %, в основном из завезенных животных и их потомства. Среди симментальского скота процент инфицированности у коров составил 12,3%, тогда как у черно-пестрых коров процент пораженности инфекцией достигал 54%.

ККХ «Заря». Почти аналогичная ситуация сложилась в этом хозяйстве. Степень пораженности коров вирусом также высокая и составляет 41,2. Наиболее инфицированное поголовье коров находящееся с телятами на подсосе.

ФГОУ СПО «Стерлитамакский сельскохозяйственный техникум». Почти тотальное поражение маточного стада вирусом отмечено в этом хозяйстве, в которое завоз черно-пестрой породы скота проводили начиная 40 лет назад.

В хозяйстве на трех молочно-товарных фермах сосредоточено 1166 коров и 390 телок, из которых симментальского скота около 34%. Серопозитивных коров оказалось 944 головы или 81%. Из них коровы симментальского скота положительных на инфекцию оказались 68,6%, а из черно-пестрых коров давали положительную реакцию 85,2, т.е. самый высокий процент по сравнению с другими хозяйствами.

Высокая степень заболеваемости и инфицированности черно-пестрого скота свидетельствует о их предрасположенности к лейкозу и о большом сроке их неблагополучия. Меньшая и средняя степень пораженности аборигенных пород можно объяснить коротким сроком контакта их с источником инфекции. При продолжительном содержании завозных животных с аборигенными, инфицирование последних приходит в те же сроки и в том же количестве, что и завозные.

Таблица 8

Результаты серологической диагностики крупного рогатого скота
ФГОУ СПО «Стерлитамакский сельскохозяйственный техникум»

Группа скота	Порода скота	Исследовано всего	Серопозитивные животные		Серонегативные животные	
			голов	%	голов	%
Коровы	Симментальская	296	203	68,6	92	31,1
Коровы	Черно-пестрая	870	741	85,2	129	14,8
Тетки	Симментальская	238	79	33,2	159	66,8
Тетки	Черно-пестрая	152	80	52,6	72	47,4
Телки	Всего	390	159	40,8	231	59,2
Коровы	Всего	1166	944	81,0	221	19,0
Итого животных		1556	1103	70,9	452	29,1

3.2.5 Динамика титров антител к ВЛКРС до и после проведения вакцинации, введения туберкулина

Данный раздел нашей работы предусматривал показать существующую зависимость на количество антител к ВЛКРС при проведении туберкулинизации, как обязательного противоэпизоотического мероприятия в хозяйствах, и вакцинации животных.

Исследования проводились на группе коров и телок 18 месячного возраста. Животные были разделены на 2 группы, по 20 голов в каждой.

1 группа - у животных первое исследование проводилось перед туберкулинизацией, титр антител составил 1:4-1:8. После введения туберкулина на 3 день (день четкой реакции) и на 7 день уровень антител был таким же как и до введения туберкулина. На 14 день, 21 день и на 30 день титр антител увеличился в два раза и составил - 1:8-1:16. На 60 день исследования титр антител был таким же как и до проведения туберкулинизации и составил 1:4-1:8.

2 группа - у животных первое исследование проводилось перед вакцинацией (вакцина против сибирской язвы). Уровень антител был 1:4-1:8. У животных после введения вакцины титр антител не изменился и составил на 3 день 1:4-1:8, на 7 день 1:4-1:8. На 14 день, 21 день и на 30 день титр антител увеличился в два раза и составил - 1:8-1:16. На 60 день исследования титр антител был таким же как и до проведения вакцинации и составил 1:4-1:8.

Таким образом, при вакцинации и туберкулинизации наблюдалось увеличение титров антител в период с 14 по 30 день после обработок и постепенное снижение уровня антител к 60-му дню. Увеличение титров антител после вакцинации в 5-7% случаях сопровождалось неспецифическими реакциями в РИД.

3.2.6 Взаимосвязь титров антител к р24 антигену ВЛКРС и гематологически показателей

Данные исследования показывают, что титр антител к вирусу лейкоза в РИД у спонтанно инфицированного КРС прямо пропорционален лимфоцитозу, т.е. с увеличением абсолютного количества лимфоцитов титр антител повышается.

При постановке РИД в сыворотке крови некоторых животных наблюдается образование двойной линии преципитации. Это явление наблюдается при наличии в антителах к ВЛКРС внутреннего белка р24. При этом гематологические показатели крови проявляются высоким лимфоцитозом. Так у исследованного поголовья скота в ФГОУ СПО «Стерлитамакский сельскохозяйственный техникум» было выявлено 29 животных, у которых выявлено наличие двойной полоски преципитации. Гематологическим методом исследования лимфоцитоз не был обнаружен только у 5 голов нетелей симментальской породы.

При патологоанатомическом исследовании органов и тканей животных с лимфоцитозом и высоким титром антител к вирусу в большинстве случаев установлена опухолевая форма лейкоза. Высокий титр антител у больных лейкозом животных (что было подтверждено гистологическим исследованием) может быть результатом перехода вирусной инфекции в опухолевую форму болезни. На основе этих данных можно предположить, что уровень антител может быть одним из показателей дальнейшего опухолевого развития, вызываемого инфекцией ВЛКРС.

3.2.7 Результаты сравнительной характеристики эффективности различных методов оздоровления в зависимости от процента инфицированности поголовья и технологии ведения мсвиотноводства

Противолейкозные мероприятия в хозяйствах Стерлитамакского района проводились в течение многих лет согласно действующих в свое время Инструкций по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота. После введения новой инструкции по профилактике и борьбе с лейкозом крупного рогатого скота (1999 год) изменились наши подходы к методам борьбы с болезнью.

Выясненная эпизоотическая ситуация хозяйств района позволила нам разработать план по борьбе с данной болезнью и утвердить его на уровне главы администрации района в 2003 году. Было предусмотрено три варианта оздоровления хозяйств.

Первый вариант предполагал выбраковку и сдачу на мясо больных и инфицированных животных при незначительном поражении поголовья (5%).

Второй вариант при умеренной инфицированности поголовья, по результатам диагностических исследований, поголовье животных подразделяется на две группы: инфицированная и свободная от лейкоза и вируса.

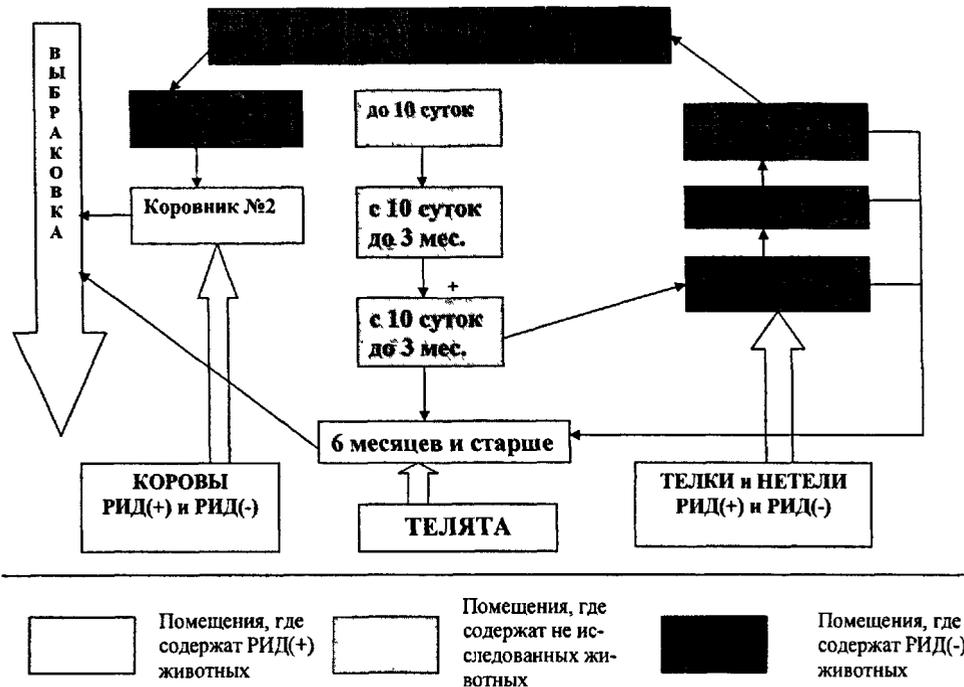
Третий вариант при значительной степени инфицированности взрослого маточного поголовья, проводится создание здорового стада за счет потомства от больных и инфицированных вирусом коров, с последующим, контролем диагностическим за полученным приплодом.

По первому варианту удалось оздоровить за 2002-2003 гг. из 9 хозяйств два хозяйства ОПХ «Стерлитамакское» и СГЖК «Ашкадар». До проведения комплексных оздоровительных мероприятий инфицированность поголовья в хозяйствах была 5-7%. Метод единовременной выбраковки позволил ликвидировать заболевание в течение 12 месяцев. В настоящее время инфицированность 7 хозяйств составляет 1,2-8,5%

Второй вариант оздоровления предусматривал разделение стада на РИД-положительных и РИД-негативных животных. По этому варианту было отобрано 9 хозяйств, в которых инфицированность поголовья составляла от 13 до 28,3%. По результатам осенних диагностических исследований в 2003 году в группе зараженных животных в хозяйствах не наблюдалось увеличения инфицированности среди животных здорового стада, зато среди пораженных лейкозом животных удалось добиться снижения процента инфицированности. Учитывая значительность поражения поголовья ВЛКРС оздоровить хозяйства этой группы можно через 1,5-2 года.

По третьему варианту работа проводилась в 5 хозяйствах района. Наиболее поражено поголовье скота в ФГОУ СПО «Стерлитамакский сельскохозяйственный техникум» (42,8%), ККХ «Заря» (43,2%). в остальных трех хозяйствах инфицированность составила чуть менее 40%. Для этой группы хозяйств был использован метод разделения стада, также как и по второму варианту, на РИД-положительных и РИД-отрицательных животных. Но с учетом значительной пораженности поголовья проводится тщательный онтроль за тем чтобы не происходил контакт между животными из этих групп. В группе РИД-положительных животных проводится постепенный вывод из стада отелившихся коров и нетелей с последующей их сдачей на мясо. За полученным приплодом ведется серологический контроль с тем чтобы своевременно выявить инфицированных вирусом телят. С учетом зышесказанного в группе хозяйств оздоровление по третьему варианту удастся осуществить в течение 2,5-3,5 лет.

ПЕРЕМЕЩЕНИЕ ЖИВОТНЫХ В ХОЗЯЙСТВАХ ПРИ ОЗДОРОВЛЕНИИ ОТ ЛЕЙКОЗА



ВЫВОДЫ

1. С использованием современных иммунологических, клинико-гематологических методов установлена истинная эпизоотическая ситуация на лейкоз крупного рогатого скота в хозяйствах Стерлитамакского района Республики Башкортостан.

2. В базовых хозяйствах района с различной длительностью неблагополучия и процентом инфицированности вирусом лейкоза, с учетом породы и принадлежности теоретически обоснованы и экспериментально осуществлены пути профилактики и ликвидации заболевания на основе новых получения новых данных в закономерностях передачи вируса и подходов в диагностике.

3. Комплексными методами изучена и подтверждена возможность контроля эпизоотического состояния, профилактических и оздоровительных мероприятий на лейкоз методом исследования молочного секрета, молока и молозива коров с использованием нами модифицированного варианта реакции иммунодиффузии в геле агара.

4. Выявление высоких титров антител к р24 антигену ВЛКРС и характерных гематологических показателей является одним из научно-обоснованных показателей дальнейшего развития наиболее контагиозной опухолевой формы лейкоза.

5. В контролируемых опытах подтверждено, что происходит увеличение титров антител к ВЛКРС после вакцинаций, введения туберкулина и других биопрепаратов, которое следует учитывать при диагностике заболевания.

6. Эпизоотологические серологические и клинико-гематологические исследования показали, что из имеющихся в Стерлитамакском районе 53 молочно-товарных ферм (25 хозяйств) 7 свободные от ВЛКРС. При этом высокий процент вирусоносительства установлен среди черно-пестрого скота ФГОУ СПО «Стерлитамакский сельскохозяйственный техникум» (42,8%), ККХ «Заря» (43,2%) и симментальского скота СПК им. Машкина (20,7%), СПК им. Ленина (34,6%).

7. Сроки и эффективность профилактических и оздоровительных мероприятий напрямую зависят от пораженности поголовья, наличия свободных помещений, изолированных ферм, принципиальных подходов и предложенных схем и методов искоренения:

- оздоровление хозяйств от лейкоза с незначительным процентом инфицированности узнается осуществлять в течение 18-24 месяцев при условии изоляции и сдачи на убой всех РИД - положительных животных после каждых исследований, проводимых с интервалом в 3 месяца.
- оздоровление хозяйств с инфицированностью до 30% удается в течение 2,0 - 2,5 лет путем изолированного содержания здорового маточного поголовья с 6-ти месячного возраста.

8. На основе предложенных нами рекомендаций и схем осуществлено оздоровление от лейкоза крупного рогатого скота ОПХ «Стрлитамакское» (черно-пестрая порода скота) и СПКК «Ашкадар» (симментальская порода).

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Выявление р24 антигена ВЛКРС, как предвестника опухолевой формы при диагностике лейкоза в РИД, позволяет рекомендовать сдать животное на убой.
2. При вакцинации и туберкулинизации крупного рогатого скота не исследовать животных на лейкоз в РИД в течение 30 дней, так как возможны неспецифические результаты.
3. В период между плановыми исследованиями предлагается выявлять инфицированных вирусом животных методом постановки РИД с молоком, молочным секретом и молозивом.
4. Полученные нами данные могут быть использованы в подготовке лекций и методических рекомендаций для студентов ветеринарных факультетов, слушателей ФПК, для практических ветеринарных врачей.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Галеев Р.Ф., Абдуллин Ш.М., Руденко А.А., Абубакиров Р.Р. Основные принципы профилактики и оздоровления хозяйств от лейкоза крупного рогатого скота в Республике Башкортостан. В сб. Материалов международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса регионов России» Уфа, 2002, т2, С78
2. Галеев Р.Ф., Руденко А.А. Профилактики лейкоза крупного рогатого скота в Республике Башкортостан В сб. Материалов международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса регионов России» Уфа, 2002, т2, С81.
3. Руденко А.А., Галеев Р.Ф. Оздоровительные мероприятия при лейкозе крупного рогатого скота В сб. Материалов международной научно-практической конференции «Пути повышения эффективности АПК в условиях вступления России в ВТО» Уфа, 2003 С.376-378.
4. Руденко А.А. Сравнительные исследования сыворотки крови и молока в стадах, инфицированных вирусом лейкоза В сб. Материалов научно-практической конференции молодых ученых и аспирантов «Аграрная наука в XXI веке» Уфа, 2003, с.33-35.
5. Галеев Р.Ф., Руденко А.А., Валиев Ф.Р., Абубакиров Р.Р. Профилактика лейкоза крупного рогатого скота. Журнал «Практик» Санкт-Петербург, 2003, №5-6.
6. Галеев Р.Ф., Руденко А.А., Валиев Ф.Р., Абубакиров Р.Р. Профилактика лейкоза крупного рогатого скота Журнал «Практик» Санкт-Петербург, 2003, №7-8.

Подписано в печать 24.05.2004

Формат 60x84¹/₁₆. Бумага типографская. Гарнитура Times

Усл. печ. л. 1,05. Тираж 100 экз. Зак. № 379

Издательство Башкирского государственного аграрного университета

Типография Башкирского государственного аграрного университета

Адрес издательства и типографии: 450001, г. Уфа, ул. 50 лет Октября, 34

+

№ 14397

РНБ Русский фонд

2005-4

12175