

На правах рукописи

Маврин

Маврин
Николай Анатольевич

**ПОДКОЖНЫЙ ОВОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ЗАПАДНОМ
РЕГИОНЕ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(БИОЛОГИЯ, МЕРЫ БОРЬБЫ)**

16 00 06 - ветеринарная санитария, экология, зоогиена и
ветеринарно-санитарная экспертиза
03 00 19 - паразитология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Москва – 2008 г

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН)

Научный руководитель:

заслуженный деятель науки РФ,
доктор ветеринарных наук, профессор

Непоклонов Анатолий
Александрович
(ВНИИВСГЭ)

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Кононенко Галина
Пантелеевна
(ВНИИВСГЭ)

доктор ветеринарных наук, профессор

Косминков Николай
Евгеньевич
(МГУПБ)

Ведущая организация. 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, 5

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

Автореферат разослан «8» февраля 2008 г

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.С Майстренко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Гиподерматоз – паразитарное заболевание крупного рогатого скота, вызываемое личинками подкожного овода отряда *Diptera Hypoderma lineatum (HL)* и *Hypoderma bovis (HB)* Это заболевание зарегистрировано более чем в 55 странах мира (ФАО, 1984) и представляет большую проблему для стран Европы, Средней Азии и Китая Известны случаи вспышек гиподерматоза в Австралии и Южной Африке, связанные с импортом пораженного оводом крупного рогатого скота (Tarry D W , 1991).

В Российской Федерации после 1991 года, в связи с началом перестроечных процессов в сельском хозяйстве, прекратилось целевое государственное финансирование борьбы с гиподерматозом В два раза сократился объем противооводовых мероприятий, вследствие чего заболеваемость среди контролируемого поголовья (около 53%) возросла в 10-14 раз (до 2,8 - 4,5%), а среди 47% поголовья, не подвергаемого противооводовым обработкам, достигает 30 - 70% (Непеклонов А А , 2002)

Ущерб, причиняемый личинками подкожного овода, складывается из потерь молока и мяса, порчи кожевенного сырья Ежегодные потери молока составляют 80 - 200 л от каждой больной гиподерматозом коровы, мяса – от 13 до 18 кг, кожевенного сырья – 8% площади заготовленных шкур По экспертным оценкам общие потери от гиподерматоза в России оцениваются в сумме около 6,5 млрд рублей в год (Андрунакиевич А Г , Непеклонов А А , Цуканова Г В , 2004) Вызываемая гиподерматозом иммунодепрессия животных способствует развитию бактериальных, вирусных и паразитарных болезней, ущерб от которых чрезвычайно трудно подсчитать (Tarry D W , 1991) Для населения гиподерматоз опасен тем, что при употреблении молока и мяса животных, пораженных личинками овода, в организм человека может попадать вырабатываемое личинками высокотоксичное вещество – гиподермотоксин, способное оказывать неблагоприятное влияние на здоровье людей (Непеклонов А А , 2002)

В СССР, современной России и за рубежом проведена большая работа по изучению гиподерматоза крупного рогатого скота. Удалось выяснить основные особенности биологии подкожных оводов, предложить новые средства и методы борьбы с этими паразитами.

Несмотря на это, многие вопросы биологии и экологии возбудителя, выбора средств лечения и профилактики болезни в приграничных областях Российской Федерации, в частности, в Западном регионе (Брянская и Смоленская области) остаются недостаточно изученными. Существует большая вероятность заражения и перезаражения крупного рогатого скота в приграничных районах подкожным оводом от неблагополучных по гиподерматозу соседних стран. Поэтому, выяснение особенностей биологии, экологии, распространения, а также выбор эффективных средств борьбы с паразитом в приграничных регионах поможет правильно осуществлять противооводовые мероприятия на данной территории, способствуя снижению заболеваемости животных и получению экологически чистых продуктов животного происхождения.

В последние годы предложены различные способы диагностики подкожнооводовой инвазии крупного рогатого скота: реакции непрямой гемагглютинации, внутрикожной пробы, кольцепреципитации, латекс-агглютинации и двойной диффузии в агаровом геле (Белецкая ИИ, 1999, Степанова Е А, Якубовский М В, 2004). Однако, эти методы не обладают достаточно высокой чувствительностью и специфичностью. Кроме того, они не всегда пригодны для рутинных исследований. Поэтому, за рубежом широкое распространение получил иммуноферментный анализ (ИФА) для обнаружения личинок I стадии *H lineatum* и *H bovis* в организме животного (Sinclair, I, Wassall D A, 1983, Boulard C, 1985 и др). Существует коммерческий набор «Elisa hypodermosis serum screening» (институт «Pourquier», Франция) на основе непрямого варианта иммуноферментного анализа для выявления антигел к возбудителю гиподерматоза в сыворотках крови крупного рогатого скота. Создание высокоэффективной отечественной

тест-системы поможет решить проблему ранней диагностики гиподерматоза в Российской Федерации

Цель и задачи исследования. Изучение распространения, биологии и экологии подкожных оводов в Западном регионе (Брянская и Смоленская области) Российской Федерации, разработка и апробация средств лечения, диагностики и профилактики гиподерматоза крупного рогатого скота

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи

1 Изучить видовой состав и особенности распространения подкожных оводов крупного рогатого скота

2 Изучить сроки лета оводов, динамику подхода личинок под кожу животных, выпадение личинок на окукливание

3 Провести сравнительную оценку эффективности средств лечения и профилактики гиподерматоза крупного рогатого скота

4 Разработать технологию получения и очистки антигенов возбудителя гиподерматоза крупного рогатого скота

5 Изучить возможность применения этих антигенов в иммуноферментном анализе для выявления антител к *H bovis* и *H lineatum*

6 Разработать диагностическую тест-систему на основе непрямого иммуноферментного анализа для выявления антител к возбудителю гиподерматоза крупного рогатого скота

Научная повизна работы. Изучены особенности распространения, биологии и экологии подкожных оводов в Западном регионе России видовой состав, сроки начала и окончания лета имаго, динамика паразитирования личинок в организме крупного рогатого скота, выпадение личинок на окукливание. Проведен сравнительный анализ эффективности средств лечения и профилактики заболевания на данной территории

На основе очищенных антигенов из личинки I стадии *H lineatum* разработан отечественный метод ранней диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота на основе непрямого гвердофазного

иммуноферментного анализа В сравнительных исследованиях показана высокая чувствительность и специфичность разработанного метода и установлена положительная корреляция результатов с коммерческим набором «Elsa hypodermosis serum screening» (институт «Roquier», Франция)

Практическая значимость исследований. Результаты изучения особенностей распространения, биологии и экологии подкожных оводов в Западном регионе России, выбора эффективных средств борьбы с паразитом позволят правильно организовать противооводовые мероприятия на данной территории, способствуя, тем самым, получению экологически чистых продуктов животного происхождения

Разработанная тест-система на основе непрямого варианта иммуноферментного анализа может быть использована в исследовательских учреждениях и лабораториях для ранней диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота

Основные положения, выносимые на защиту Полученные экспериментальные данные позволяют вынести на защиту следующие основные положения

- результаты изучения распространения, биологии и экологии подкожного овода в Западном регионе России.

- результаты сравнительной оценки эффективности средств лечения и профилактики гиподерматоза крупного рогатого скота,

- результаты разработки и оценки иммуноферментной тест-системы для выявления антител к возбудителю гиподерматоза крупного рогатого скота

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета ВНИИВСГЭ (2006, 2007 гг) и межлабораторном совещании сотрудников ВНИИВСГЭ (2007 г)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано три научные работы

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 130 стр машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных результатов исследований, обсуждения, выводов, практических предложений, списка цитированной литературы и приложения. Материалы диссертации иллюстрированы 17 таблицами и 22 рисунками. Список литературы включает 148 источников отечественных и зарубежных авторов.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в 2004 - 2007 гг в группе по изучению инсектицидов, микробиологического синтеза лаборатории санитарной микробиологии ГНУ ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН (г Москва), а также в хозяйствах Брянской и Смоленской областей.

Анализ распространения подкожных оводов крупного рогатого скота в Западном регионе осуществлен на базе данных отчетности государственных ветеринарных учреждений области и районов за 2004 -2007 гг, а также ежегодных научных отчетов группы по изучению инсектицидов микробиологического синтеза лаборатории санитарной микробиологии ВНИИВСГЭ. Распространение гиподерматоза и определение степени пораженности животных личинками подкожных оводов проводили путем обследования крупного рогатого скота в хозяйствах Брянской и Смоленской областей в период клинического проявления инвазии (апрель - май).

Видовой состав подкожных оводов и соотношение численности видов устанавливали путем сбора и определения вида личинок третьей стадии, извлеченных из свищевых капсул у животных. Видовая принадлежность личинок оводов определялась по методике Грунина К Я (1962). Было собрано и определено до вида 363 личинки III стадии.

Изучение динамики образования личинками свищевых капсул под кожей у крупного рогатого скота и экстенсивность поражения животных личинками проводили на 185 коровах и 34 телятах из хозяйств Брянской

области, и на 161 коровах и 51 телятах 1-2 летнего возраста из хозяйств Смоленской области. Появление свищевых капсул определяли путем осмотра и пальпации спины, поясницы, крестца, корня хвоста, холки, шеи, затылка и боковых частей груди и живота животных.

Изучение сроков выпадения личинок на окукливание проводили в СПК «Нива» Красногорского района Брянской области и в СПК «Дорогобужский» Дорогобужского района Смоленской области. Применяли ловушки, которые представляли собой марлю, склеенную в виде колпачка. Ловушки прикрепляли к животным с помощью клея и проверяли на наличие выпавших личинок ежедневно утром и вечером. После определения видовой принадлежности личинки высаживали в садки, которые были размещены под открытым небом. Для сбора имаго ячейки садков накрывали марлевыми колпачками, натянутыми на проволочные каркасы.

Сроки лета оводов определяли по времени вылета мух из куколок в садках, по появлению в стадах животных «зыка», а также по пораженности личинками оводов новорожденных телят, которых в разные сроки (июль - сентябрь) начинали выпасать на пастбищах.

Испытания **противогиподерматозных препаратов** (гиподектин инъекционный, гиподектин накожный, новомек, аверцид инъекционный и аверцид накожный, абамек инъекционный и абамек накожный) проводили в хозяйствах Брянской и Смоленской областей. Эффективность препаратов и методов их применения изучали как при ранней химиотерапии гиподерматоза, так и в период клинического проявления болезни. Учет результатов применения препаратов осуществляли по методике Непоклонова А.А. и Таланова Г.А. (1966).

Антигены получали из личинок I и III стадий *H. lineatum*, выделенных из слизистой оболочки пищеводов пораженных животных, а также с туш пораженных животных, поступивших на мясокомбинат. Для получения *лизата*, личинки I и III стадий промывали фосфатно-солевым буферным раствором (pH 7,2 - 7,4) и гомогенизировали в пробирке Гриффитса с 0,1 М

карбонатно-бикарбонатным буфером, pH 9,6 У личинок III стадии подкожного овода предварительно удаляли хитиновую оболочку Гомогенат обрабатывали ультразвуком и центрифугировали при 10000 g и +4⁰C Полученный надосадок использовали как антиген

Специфичные иммуноглобулины класса G (IgG) получали путем осаждения положительных на гиподерматоз сывороток крови (по клиническим признакам) равным объемом 20% раствора полиэтиленгликоля (M=6000 Да) и последующей ионно-обменной хроматографией надосадка на диэтиламиноэтил сефарозе 4В (DEAE-сефароза) (Pharmacia Fine Chemicals AB, Швеция) Фракцию IgG элюировали 0,01 М раствором Трис-НСl + 0,15 М NaCl, pH 8,6

Аффинно-очищенный антиген из лизата личинки I и / или III стадий H lineatum получали с помощью иммуносорбента на основе агарозы, активированной бромцианом (BrCN-агароза) BrCN-агарозный иммуносорбент, содержащий фракцию IgG из пула положительных на гиподерматоз сывороток крови крупного рогатого скота, изготовляли по методике фирмы-производителя (Pharmacia, Швеция) Осветленный лизат личинки I и / или III стадии, диализовали против 0,1 М раствора Трис-НСl + 0,15 М NaCl (pH 8,0) и инкубировали с уравновешенным тем же раствором иммуносорбентом при +4⁰C в течение 2 часов при перемешивании Целевой продукт элюировали содержащим глицин буферным раствором (0,1 М глицин + 0,1 М NaCl, pH 2,5) и нейтрализовали полученный продукт 8 М раствором NaOH до pH 7,0

Антигены, очищенные ионообменной хроматографией из лизата личинки I стадии H lineatum получали по модифицированному методу Lecroisey A & Boulard C, Keil B (1979) Осветленный лизат личинки I стадии диализовали против 0,1 М раствора Трис-НСl (pH 7,5) и наносили на уравновешенную тем же буфером DEAE-сефарозу 4В Применяли ступенчатую хроматографию, последовательно элюируя фракции 0,1 М

буферным раствором Трис-НСl (рН 7,5), содержащим 0,20 М, 0,25 М, 0,3 М и 0,4 М NaCl

Иммунохимическую активность полученных продуктов определяли в условиях непрямого иммуоферментного анализа и иммуноблоттинга с положительными и отрицательными сыворотками крови крупного рогатого скота

Непрямой иммуоферментный анализ (ИФА) выполняли по общепринятой методике. Объем вносимых в лунки планшета реагентов составил 100 мкл. Антигены сорбировали на поверхность ячеек планшетов в 0,1 М КББ (карбонатно-бикарбонатный буфер, рН 9,5) и инкубировали в течение 18 ч при +4°C. Исследуемые пробы сыворотки крови крупного рогатого скота вносили в лунки планшета в разведении 1:20. Применяли меченые пероксидазой антитела к иммуноглобулину G (H+L) быка (филиал ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи «Медгамал», Россия) и субстратный раствор перекиси водорода с 3,3',5,5'-тетраметилбензидином. Для учета реакции использовали спектрофотометр, снабженный фильтром на длину волны 450 нм (Labsystems Multiscan Plus, Великобритания). Наличие антител к возбудителю гиподерматоза в исследуемой сыворотке крови крупного рогатого скота определяли по величине коэффициента связывания конъюгата ($K_{св}$) сывороточными антителами, которую вычисляли по формуле

$$K_{св} = \frac{(A_{450} ИС_{сп} - A_{450} K' -_{сп})}{(A_{450} K' +_{сп} - A_{450} K' -_{сп})} \times 100 \quad \text{где } - (A_{450} ИС_{сп}), (A_{450} K' +_{сп}) \text{ и } (A_{450} K' -_{сп}) - \text{ среднее}$$

(из двух повторов) арифметическое значение оптической плотности (A_{450}) для каждой исследуемой сыворотки (ИС), проб K' и проб K

Иммуноблоттинг использовали для определения специфичности получаемых антигенов. Белки после электрофоретического разделения переносили на нитроцеллюлозную мембрану «Immobilon-NC» (Millipore, США) в «полусухой» буферной системе (J. Kyhse-Andersen, 1984) на приборе «Multiphor II» (LKB, Швеция) при постоянной силе тока 200 мА в течение 1 часа при комнатной температуре. Иммунохимическое окрашивание

полученных реплик осуществляли с помощью непрямого варианта иммуоферментного анализа с соблюдением всех его стадий

Гомогенность полученных препаратов проверяли методом ДСН-ПААГ электрофореза в буферной системе Laemmli U K (1970)

Концентрацию белка в растворах определяли с использованием коммерческого набора “Micro BCA Protein Assay Kit” фирмы “Pierce” (США)

В качестве **испытуемых проб** использовали сыворотки крови крупного рогатого скота, полученные из хозяйств Московской, Смоленской и Брянской областей Сыворотку крови получали общепринятым способом и хранили при -20°C Всего было получено и исследовано 300 проб сывороток

При проведении сравнительных исследований по оценке эффективности разработанной тест-системы и подтверждении специфичности выделенного IgG использовали **коммерческий ИФА-набор** «Elisa hypodermosis serum screening» института Pourquier (Франция), предназначенный для выявления антител к возбудителю гиподерматоза Постановку реакции, учет и интерпретацию полученных результатов проводили согласно инструкции по применению, рекомендованной фирмой-производителем

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием программы Microsoft Excel для Windows Значение критерия достоверности оценивали по таблице вероятностей Стьюдента-Фишера в зависимости от объема анализируемого материала Вероятность различия считалась существенной при $P < 0,05$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Видовой состав подкожных оводов

Опыты, проведенные по изучению видового состава подкожных оводов, показали, что на территории Западного региона России распространены два вида подкожных оводов крупного рогатого скота – *H bovis* (строка) и *H lineatum* (пищеводник) В животноводческих хозяйствах Брянской и Смоленской областей строка является доминирующим видом –

81,05% и 79,1% Пищеводник в Западном регионе России распространен меньше – 18,95% (Брянская область) и 20,9% (Смоленская область)

2. Распространение подкожных оводов в Западном регионе Российской Федерации

Результаты ветеринарной отчетности о пораженности крупного рогатого скота личинками подкожного овода по районам в Брянской области за 2004 - 2006 гг свидетельствуют, что больные гиподерматозом животные регистрируются практически во всех районах области

Средняя экстенсивность поражения крупного рогатого скота подкожным оводом по районам (2004 - 2006 гг), граничащим с Украиной и Курской областью, составляет 1,7%, с Белоруссией – 1,6%, с Орловской областью - 1,3%, с Калужской и Смоленской областями, соответственно, - 0,4% и 1,3% В то же время, средняя экстенсивность поражения животных гиподерматозом в центральных районах области составляет 0,9%

С республикой Беларусь граничит Красногорский район Брянской области. Нами установлено, что процент пораженности крупного рогатого скота гиподерматозом в этом районе составил 4,0 % (5488 голов), а уровень инвазии среди животных, принадлежащих индивидуальным владельцам, значительно превосходит средний по району и составляет 20% (обследовано 131 животное). Причем, в некоторых хозяйствах процент пораженности скота гиподерматозом составлял 5,4 - 9,4% (СПК «Северный», «Труд», «Палужский», «Рубеж»), интенсивность инвазии 1 - 7 личинок на животное

Причиной распространения гиподерматоза в Красногорском районе является неполный охват осенними противооводовыми обработками всего поголовья скота, особенно животных частного сектора. В благополучные по гиподерматозу хозяйства подкожные овода заносились в личиночной стадии скотом, приобретенным у местного населения в этом же районе

Кроме этого, возможен занос овода с территории соседней республики. В частном фермерском хозяйстве «Вернигор» из 30 закупленных в Белоруссии бычков 25 животных были больны гиподерматозом

Севский район Брянской области граничит с республикой Украина По данным районной ветеринарной отчетности, больных гиподерматозом животных в 2005 году не отмечено Однако, при обследовании 1099 животных из хозяйств данного района 82 были поражены личинками подкожного овода (7,5%) Так в хозяйстве СПК «Тимирязевский» все 50 голов (48 коров и 2 быка) были поражены оводом с интенсивностью инвазии 1 - 9 личинок на животное В СПК «Подывоть» уровень инвазии составил 7,2% с интенсивностью инвазии 1 - 10 личинки, в СПК «Юрасовский» уровень инвазии - 4,9%, а интенсивность инвазии - 1-6 личинки на одно животное Осмотр скота (57 голов) частного сектора в селе «Хинель» также выявил больных животных с уровнем инвазии 15,7% и интенсивностью 1 - 2 личинки Установленные нами неблагополучные хозяйства близко расположены к границе с Украиной

В центральных районах Брянской области (Выгоничский и Дятьковский районы) обследования крупного рогатого скота на пораженность подкожным оводом показали отсутствие больных животных или более низкий уровень инвазии

Исследования, проводимые нами в течение 3-х лет в хозяйствах Смоленской области, показали, что в 105 хозяйствах из 25 районов области из обследованных 22104 животных выявлено пораженных подкожным оводом в 2005 году - 166 голов (4,1%), в 2006 году - 99 голов (1,0%) и в 2007 году - 48 голов, (0,6%) Гиподерматоз не регистрируется в четырех районах области (Хиславичский, Смоленский, Кардымовский, Руднянский) Пораженность на уровне 1% и выше выявлена в хозяйствах Сычевского и Новодугинского районов Такой низкий уровень инвазии объясняется тем, что в области разработана и успешно реализуется программа оздоровления крупного рогатого скота от гиподерматоза

3 Изучение динамики образования свищевых капсул и сроков выпадения личинок на окукливание

Изучение динамики образования свищевых капсул показало, что среди молодняка больные гиподерматозом животные выявляются в конце января, а у коров – с первой декады февраля. Образование свищевых капсул у животных продолжается у молодняка 5 месяцев - с III декады января до конца мая, а у коров - с I декады февраля до конца июня (тоже 5 месяцев)

В хозяйствах Брянской и Смоленской областей массовое образование свищевых капсул у животных наблюдали со второй декады апреля до начала июня. В дальнейшем, за счет частичной гибели личинок и выпадения их на окукливание, число желваков снижалось. Общий период клинического проявления подкожноооцеровидной инвазии крупного рогатого скота длится с конца января по июль.

Выпадение личинок *H lineatum* на окукливание происходит на 8 - 12 дней раньше личинок *H bovis*. Период выпадения личинок обоих видов оводов в Западном регионе составляет у коров - 105 дней (с 25 апреля по 5 июля), у молодняка – 88 дней (с 25 апреля по 24 июня).

Массовый выход личинок во внешнюю среду у *H lineatum* наблюдается в I половине мая, а *H bovis* – с конца мая по июль месяц. У молодняка личинки пищевода выпадали со II декады апреля по май. У отдельных животных личинки строки III стадии в небольшом количестве покидали тело хозяина в первых числах июля. Общий период выпадения личинок продолжается в течение 42 дней, а массовое выпадение – с мая по июль.

4. Сроки лета имаго оводов

Начало массового лета оводовых мух в хозяйствах Западного региона России наблюдается с середины июня, а окончание лета - в конце сентября месяца.

Выплод оводовых мух в садках в Западном регионе России продолжался пищевода с 15 июня по 17 июля, а строки с 20 июня по 22

августа, что подтверждает данные о начале лета имаго овода, полученные нами при визуальном наблюдении.

5. Сравнительное изучение средств и методов борьбы с подкожными оводами в Западном регионе Российской Федерации

Эффективность гиподектина инъекционного при ранней химиотерапии гиподерматоза крупного рогатого скота изучали на 50 взрослых животных и на 40 головах молодняка 10 - 12 месячного возраста в СПК «Дубенецкий» Красногорского района Брянской области. Препарат, примененный подкожно в дозе 3 мл на животное массой более 200 кг и 2 мл на животное массой до 200 кг, показал 100% эффективность. Высокая эффективность гиподектина инъекционного была подтверждена и при клинической форме заболевания.

Изучение эффективности гиподектина накожного на мигрирующих в организме животных личинок I стадии проводили в СПК «Большевик» на 50 коровах и на 30 головах молодняка 1 - 2 летнего возраста в СПК «Яловка» Красногорского района Брянской области методом поливания на спину по позвоночнику от холки до крестца в дозах животным до 150 кг – 10 мл, более 150 кг – 15 мл. В контрольной группе животных весной обнаружили 8 пораженных телят и 21 корову. Появившихся весной в контрольной группе больных животных также обработали гиподектином накожным. Гиподектин накожный оказался очень эффективен против личинок I - III стадий подкожного овода, гибель которых составила 100%.

Препарат новомек, примененный внутрикожно в дозе 0,4 мл на голову двумя инъекциями по 0,2 мл, показал 100% эффективность как при ранней химиотерапии гиподерматоза, так и при клинической форме заболевания. Опыт проводился в СПК «Родина» Красногорского района Брянской области на 56 коровах и 39 телятах 12 месячного возраста. Контрольная группа состояла из 35 коров и 22 телят. В опытных группах пораженных животных не наблюдалось, в контрольной группе 95% животных были больны гиподерматозом.

Препаративные формы на основе авермектина и абамектина были испытаны в хозяйствах Смоленской области. Препараты представляют собой 0,01% действующего вещества в растворителях.

Высокая экстенсивность (ЭЭ – 100%) и интенсивность (ИЭ – 100%) препаратов аверцида инъекционного и абамека инъекционного (аналоги гиподектина инъекционного) была установлена в опытах на 106 животных в МУСП «Заря» Хиславичского района Смоленской области. Препараты вводили коровам подкожно в дозе 3 мл на животное. В контрольной группе было оставлено 75 коров, из которых весной было поражено 26 животных.

Эффективность препаратов аверцида кожного и абамека кожного (аналоги гиподектина кожного) устанавливали при ранней химиотерапии гиподерматоза крупного рогатого скота у обработанных осенью животных (221 корова, ЗАО «Рассвет» Хиславичский район Смоленской области) препаратами аверцид и абамек методом однократного нанесения на волосяной покров крупного рогатого скота вдоль позвоночного столба в дозе 15 мл на животное. Весной не было обнаружено личинок III стадий подкожного овода. Среди 100 животных в контрольной группе 20 оказались больны гиподерматозом. Таким образом, препараты аверцид кожный и абамек кожный показали высокую эффективность (ЭЭ – 100%, ИЭ – 100%) при ранней химиотерапии гиподерматоза крупного рогатого скота.

6. Выделение, очистка и характеристика антигенов, предназначенных для использования в иммуноферментном анализе для ранней диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота

Лизат личинки I стадии H lineatum Лизат личинки I-й стадии содержит три белка с молекулярной массой 23 кДа, 24 кДа и 31 кДа (рис 1)

Выход белка от исходной биомассы составил 2,5%. Результаты иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга показали возможность использования лизата личинки I стадии в качестве антигена в

разрабатываемой иммуноферментной тест-системе для выявления антител к возбудителю гиподерматоза крупного рогатого скота.

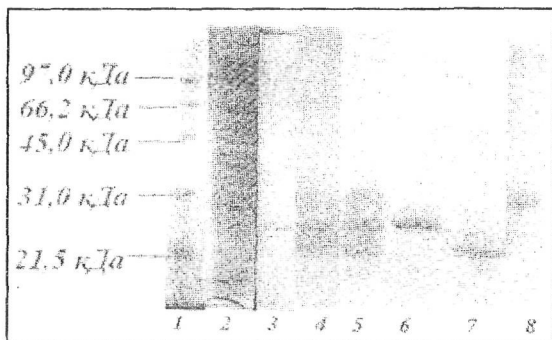


Рис. 1. SDS-электрофорез антигенов *H. lineatum* в 12% полиакриламидном геле: 1 - маркеры молекулярной массы белков; 2 - гомогенат личинки III стадии; 3 - аффинно-очищенный АГ из личинки III стадии; 4 - аффинно-очищенный АГ из личинки I стадии; 5 - гомогенат личинки I стадии; 6 - 8 очищенный ионообменной хроматографией антигены личинки I стадии (фракция, элюированная трис-буферным раствором pH 7,6 с 0,30 M NaCl (6); с 0,40 M NaCl (7); 0,25 M NaCl (8).

Лизат личинки III стадии H. lineatum. Осветленный лизат личинки III стадии содержал большое количество разнородных белков с молекулярной массой от 12 кДа до 60 кДа, и, практически, не содержал характерных для личинки I стадии компонентов (рис.1). Результаты иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга показали, что основные белки, содержащиеся в гомогенате личинки III стадии, не специфичны. Они взаимодействуют как с положительными, так и с отрицательными сыворотками крови крупного рогатого скота. Из результатов исследований следует, что лизат личинки III стадии *H. lineatum* нельзя использовать в иммуноферментной тест-системе для выявления антител к возбудителю гиподерматоза крупного рогатого скота.

Аффинно-очищенный антиген из лизата личинки III стадии H. lineatum. Анализ очищенного белка элюированного с сорбента 0,1 M раствором глицина + 0,1 M NaCl, pH 2,5 показал, что антиген имеет молекулярную массу 24 кДа (рис.1). Анализ антигена в иммуноблоттинге и в непрямом иммуноферментном анализе с разведенными в 500 раз IgG из пула

положительных на гиподерматоз сывороток крови крупного рогатого скота и отрицательной сывороткой показал, что этот аффинно-очищенный белок обладает антигенной специфичностью. Для получения достоверных результатов иммуноферментного анализа необходимо его наносить на планшет в концентрации не менее 10 мкг/мл, что практически совпадает с результатами, полученными для аффинно-очищенного антигена из личинки I стадии. Однако, несмотря на принципиальную возможность аффинной очистки антигена из личинки III стадии и применения его в иммуноферментном анализе, использование его для разработки иммуноферментной тест-системы на антитела к возбудителю гиподерматоза нецелесообразно из-за низкого содержания его в личинке (0,05% от исходной биомассы).

*Аффинно-очищенный антиген из лизата личинки I стадии *H lineatum**
Концентрация белка аффинно-очищенного антигена из лизата личинки I стадии *H lineatum* составила 1,3 мг/мл (0,12% от исходной биомассы), что значительно превышает его концентрацию при аффинной очистке антигена из гомогената личинки III стадии. Очищенный целевой продукт, проверенный в ДСН-ПААГ электрофорезе, содержал две полосы, соответствующие молекулярной массе белка 23 кДа и 24 кДа (рис 1). Специфичность очищенного антигена подтверждена методом иммуноблоттинга и непрямого иммуноферментного анализа с положительной и отрицательной на гиподерматоз сыворотками крови крупного рогатого скота.

*Антигены, очищенные ионообменной хроматографией из лизата личинки I стадии *H lineatum**
Было получено три белковых фракций. Антигенная активность и специфичность очищенных ионообменной хроматографией белков подтверждена методом непрямого иммуноферментного анализа с положительной и отрицательной сыворотками крупного рогатого скота (рис 2) и иммуноблоттингом с IgG из пула положительных сывороток.

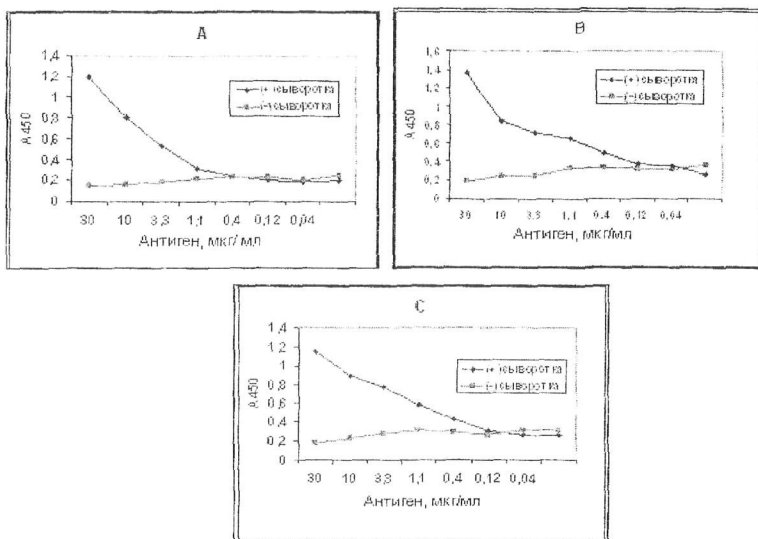


Рис. 2. Взаимодействие положительной и отрицательной на гиподерматоз сывороток крови крупного рогатого скота с фракциями антигена, полученными при его очистке ионообменной хроматографией. А – фракция, элюированная трис-буфером с 0,25 М NaCl; В - фракция, элюированная трис-буфером с 0,30 М NaCl; С - фракция, элюированная трис-буфером с 0,40 М NaCl;

С IgG реагируют фракции всех трех белковых пиков, но наибольшей активностью обладают фракции, элюированные трис-буферным раствором, содержащим 0,3 М NaCl. Анализ очищенных ионообменной хроматографией фракций проводили методом ДСН-ПААГ электрофореза (рис.1). Молекулярная масса очищенных белков составила 23 кДа, 24 кДа и 31 кДа, что соответствует массе гиподермина В, С и А (Webster K.A., Giles M., Dawson C., 1996).

7. Разработка непрямого твердофазного иммуноферментного анализа для выявления антител к возбудителю гиподерматоза крупного рогатого скота

Получение и характеристика положительного и отрицательного контролей. Для получения положительного и отрицательного контролей были проведены исследования сывороток крови (n=92), полученных от клинически здоровых и больных животных, направленные на определение

специфических антител к возбудителю гиподерматоза (*H lineatum* и *H bovis*) с помощью ИФА-набора «Elisa hypodermosis serum screening» института Pourquier (Франция) Таким образом, были получены контрольные образцы, представляющие собой сыворотки крови, содержащие и не содержащие специфические антитела, соответственно

Условия сенсibilизации лунок антигеном и оптимального разведения антивидового конъюгата При отработке условий постановки иммуноферментного анализа для фиксации антигена рабочие разведения контролей и антивидового конъюгата определяли в предварительных экспериментах методом «шахматного» титрования, делая последовательные разведения компонентов по горизонтальным и вертикальным рядам одной микропанели (табл 1) В качестве ферментного конъюгата использовали антитела диагностические против IgG (H+L) быка, меченые пероксидазой хрена (филиал ГУ НИИЭМ им Н Ф Гамалеи «Медгамал», Россия) Для фиксации антигена на поверхность ячеек полистироловой микропанели использовали 0,1 М карбонатно-бикарбонатный буфер при 18 часовой инкубации при +4°C Оптимальной концентрацией антигена и рабочими разведениями компонентов гест-системы считали их конечные значения, обеспечивающие в лунках с положительным контролем оптическую плотность (ОП) $450 \geq 1,0$, а в лунках с отрицательным - $\leq 0,2$

Исходя из представленных в таблице 1 результатов выбрана концентрация антигена - 10 мкг/мл, рабочее разведение сывороток - 1/20, а антивидового конъюгата - 1/2000

Оптимальным буфером для промывки лунок является фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1% Tween 20 Для разведения проб сывороток использовали фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,1% поливинилпирролидона, а для разведения антивидового конъюгата - фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,5% бычьего сывороточного альбумина В буферы для разведения проб сыворотки и конъюгата добавляли и 5% сыворотки крови лошади

Таблица 1

Результаты титрования антигена и антивидового конъюгата в
разрабатываемом методе

Разведение конъюгата	1 500	1 1000	1 1500	1 2000	1 4000
	ОП 450 положительной / отрицательной пробы*				
Концен антигена (мкг/мл)					
40	2,84/0,41	2,53/0,35	2,43/0,27	1,77/0,20	0,94/0,15
20	2,34/0,33	2,31/0,33	2,23/0,25	1,50/0,18	0,78/0,15
10	2,21/0,34	2,1/0,22	2,16/0,23	1,16/0,15	0,630/0,11
5	1,99/0,3	1,91/0,23	1,66/0,21	1,01/0,15	0,68/0,12
2,5	1,86/0,3	1,76/0,21	1,60/0,19	0,98/0,11	0,66/0,11
1,25	1,76/0,26	1,62/0,2	1,56/0,19	0,75/0,13	0,54/0,11

Примечание - положительные и отрицательные сыворотки крови крупного рогатого

скота использованы в разведении 1 20

При соблюдении этих условий и использовании специфических реагентов в следующих концентрациях (разведениях) антигена – 10 мкг/мл, контролей – 1 20 и конъюгата – 1 2000 при 60 минутной инкубации на каждом этапе, неспецифическое взаимодействие компонентов исключалось, а показатели ОП 450 в лунках с положительными и отрицательными пробами были $\geq 1,1$ и $\leq 0,2$ соответственно

Оптимизация условий проведения иммуноферментного анализа при исследовании проб в одном разведении Были проведены исследования по определению закономерностей распределения значений ОП 450 и коэффициента связывания (Ксв) отрицательных и положительных (содержащих антитела к возбудителю гиподерматоза) сывороток, те значения позитивно-негативного порога (ПНП), разграничивающего положительную и отрицательную реакции Проведенные исследования показали, что для получения достоверных результатов в разработанной тест-системе испытываемые пробы сывороток крови крупного рогатого скота необходимо исследовать в разведении аналогичном контролям, те 1 20

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что при значении ОП 450 положительного и отрицательного контролей 1,0 - 1,3 и 0,10 - 0,15, соответственно, величина ОП 450 всех заведомо отрицательных проб была в пределах 0,13 - 0,40, при этом значения Ксв составляли от 0 до 25%.

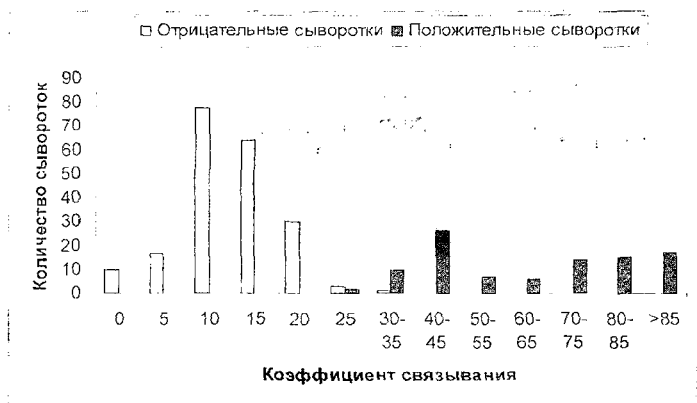


Рис. 3. Распределение количества отрицательных и положительных сывороток в зависимости от $K_{св}$

Для заведомо положительных сывороток крови значение ОП 450 превышало 0,40, а значения Ксв - от 25% до 163%.

Таким образом, как следует из представленных на рисунке 3 результатов, пороговое значение $K_{св} = 25\%$, т.е. в диапазоне значений $K_{св}$ меньше 25% проверяемые сыворотки серонегативны, выше 25% - серопозитивны. Исходя из этого, величина ПНП для Ксв, являющаяся критерием дифференциации положительных и отрицательных проб и при котором минимально количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов, составляет 25%.

Оценка диагностических параметров разработанной иммуноферментной тест-системы. Основными параметрами всех диагностических тест-систем является их чувствительность и специфичность. С целью оценки чувствительности и специфичности разработанной тест-системы результаты иммуноферментного анализа сопоставляли с таковыми,

полученными при использовании зарубежного коммерческого набора. Были исследованы сыворотки крови крупного рогатого скота (300 проб), предварительно охарактеризованные на наличие антител к возбудителю гиподерматоза ИФА-набором «Elisa hypodermosis serum screening» (Франция). Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2.
Сравнительная оценка результатов разработанной тест системы и зарубежного ИФА-набора

Результаты в разработанной тест-системе, количество проб:		Результат тест-системы института Pourquier (Франция), количество проб:	
		положительных (n=97)	отрицательных (n=203)
	положительных	94	4
	отрицательных	3	199

Анализ полученных данных показал положительную корреляцию результатов по определению сывороточных антител к возбудителю гиподерматоза, полученных с помощью разработанного иммуноферментного анализа и коммерческого набора института Pourquier ($r=0,93$; $P<0,05$) (рис.4), сходимость результатов составила 97,7%.

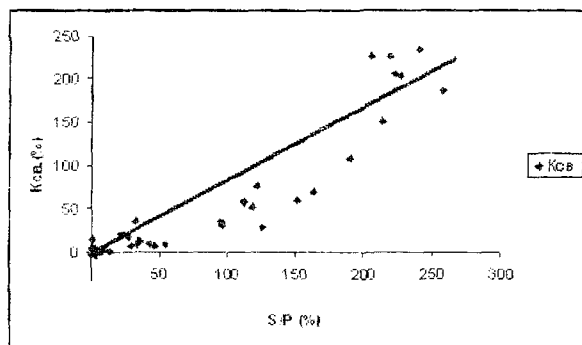


Рис. 4. Корреляция результатов анализа сывороток крови крупного рогатого скота набором «Elisa hypodermosis serum screening» и разработанной тест-системой ($r=0,93$; $P<0,05$).

Диагностическая чувствительность разработанной нами иммуноферментной тест-системы по отношению к коммерческому ИФА-набору составила 96,9%, специфичность – 98,8%

Таким образом, разработанная тест-система может быть использована для широких производственных испытаний

Выводы

1 Установлены биологические особенности подкожного овода крупного рогатого скота связанные с его экологией в Западном регионе Российской Федерации

- в Западном регионе России обитают два вида подкожных оводов крупного рогатого скота – *Hypoderma bovis De Geer* (строка) и *Hypoderma lineatum De Vill* (пищеводник),

- период клинического проявления гиподерматоза крупного рогатого скота в Западном регионе России составляет 5 месяцев - с первой декады февраля по июль,

- лет оводов продолжается с середины июня до начала октября Личинки III стадии выпадают на окукливание у пищеводника с 25 апреля по 14 июня, у строки с 2 мая по 5 июля Период выпадения личинок обоих видов оводов составляет у коров 105 дней, у молодняка – 88 дней,

- одной из причин распространения гиподерматоза в Западном регионе России является ее приграничное расположение и неполный охват поголовья животных осенними профилактическими обработками

2 Препараты кожного применения гиподектин кожный (на основе ивермектина), аверцид кожный (на основе авермектина) и абамек кожный (на основе абамектина) обладают высокой эффективностью (ЭО - 100%, ИЭ - 100%) при применении методом поливания на спину в дозе 15 мл на животное для ранней химиотерапии гиподерматоза и при клинической форме заболевания

3 Инъекционные препараты гиподектин инъекционный (на основе ивермектина), аверцид инъекционный (на основе авермектина) и абамек

инъекционный (на основе абамектина) обладают высокой эффективностью (ЭЭ - 100%, ИЭ - 100%) при введении подкожно в дозе 3 мл на животное массой более 200 кг и 2 мл на животное массой менее 200 кг с целью ранней химиотерапии и при клинической форме гиподерматоза

4 Подтверждена высокая эффективность внутрикожного применения препарата новомек в дозе 0,4 мл (0,2 x 2 мл) с целью профилактики и терапии гиподерматоза

5 Получены и изучены иммуноспецифичные антигены из личинок I и III стадий *H lineatum* Установлено, что в личинках I стадии содержание активного антигена к антителам возбудителя гиподерматоза составляет 0,14 - 2,5% от биомассы, в личинках III стадии этот антиген отсутствует или его содержание существенно ниже (0,05% от биомассы)

6 Разработана иммуноферментная тест-система для выявления антител к возбудителю гиподерматоза (*H lineatum* и *H bovis*) в сыворотках крови крупного рогатого скота Установлена оптимальная иммобилизирующая концентрация антигена – 10 мкг/мл Определен критерий дифференциации положительных и отрицательных результатов иммуноферментного анализа (Ксв) равный 25%

7 Диагностическая чувствительность разработанной тест-системы по отношению к референтному ИФА-набору «Elisa hypodermosis serum screening» (Inst Pourquier, Франция) составляет 96,9%, специфичность – 98,1%, сходимость результатов – 97,7%

Практические предложения

Разработанная тест-система на основе непрямого варианта иммуноферментного анализа может быть использована в исследовательских учреждениях и лабораториях для ранней диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота

Разработаны и утверждены методические рекомендации по ранней диагностике гиподерматоза на основе непрямого иммуноферментного

анализа (ИФА) (Утв Отделением ветеринарной медицины Россельхозакадемии 24 января 2008 г)

Препаративные формы на основе авермектина и абамектина в виде 0,01% раствора могут быть использованы для ранней химиотерапии и лечения гиподерматоза крупного рогатого скота

Список опубликованных работ

1 Маврин, Н А Антигены из личинок *Hypoderma lineatum* и возможность их использования в иммуноферментном анализе для выявления специфических антител в сыворотке крови крупного рогатого скота, больного гиподерматозом / Н А Маврин, А А Непоклонов, В С Богданова // Ветеринария – 2007 г - № 9 - С 11 - 14

2 Маврин, Н А Иммуноферментный анализ для ранней диагностики гиподерматоза крупного рогатого скота / Н А Маврин, А А Непоклонов, В С Богданова, О А Верховский // Ветеринария – 2007 г - № 11 - С 9 - 11

3 Mavrin, N A Purification of *Hypoderma lineatum* antigens and opportunity of their application for diagnostic of cattle hypodermosis / N A Mavrin, A A Nepoklonov // Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics, dedicated to 120th anniversary of N I Vavilov 20 - 22 September 2007, Kyiv, Ukraine

ВНИИВСГЭ, 2008 г

Москва, Звенигородское ш , 5

Заказ 276/3 Тираж 80 экз