

мицин, цефазолин, гентамицин, ципрофлоксацин, цефазолин) и некоторые сульфаниламидные препараты (сульфадимезин, норсульфазол). Однако в виду того, что у пастерелл вырабатывается устойчивость к этим препаратам, их использование оказывалось недостаточно эффективным.

В последнее время большое практическое значение в птицеводстве приобрело использование препаратов на основе фторхинолонов (энрофлоксацин, байтрил и другие). Эти препараты имеют широкий противомикробный спектр действия, к ним также чувствительны микоплазмы.

Заболевали пастереллезом чаще всего птицы в возрасте 1 года и старше. Лечение птицы начинали с подтитровки лекарственных препаратов на чувствительность к *Pasteurella multocida* методом диффузии в агар (метод бумажных «дисков»). Диски с препаратами изготавливали по общепринятой методике. Получили следующие результаты: наибольшим действием обладает энрофлоксацин 10%, зона задержки роста 29 мм, тилозин – 24,8 мм, окситетрациклин – 22,6 мм.

Лечебные мероприятия были проведены в трех опытных и одной контрольной группе по 30 голов в каждой, продолжительность лечения 5 дней.

1-й группе назначили окситетрациклин, его применяли в дозе 50 мг/кг с питьевой водой, выпаивали в течение 5 дней.

2-й группе назначили тилозин, его при-

меняли в дозе 1 г на 1 л питьевой воды, выпаивали в течение 5 дней.

3-й группе назначили энрофлоксацин 10%, его применяли в дозе 1 мл на 1 л питьевой воды, выпаивали в течение 5 дней.

4-й группе – контрольной – лечение не назначали.

При лечении помимо антибиотиков применяли и комплексные витаминные препараты – тетрагидровит и аминовитал. В состав последнего, кроме витаминов, входят и аминокислоты. Применение этих препаратов повышает общую резистентность организма и стимулирует работу иммунной системы.

Все четыре группы находились в одинаковых условиях кормления и содержания (таб.).

При лечении установлено: наилучшим терапевтическим эффектом обладает энрофлоксацин 10% (94,7%), который применяли в 3-й опытной группе. В 1-й и 2-й группах был значительный падеж птицы (73,3% и 56,7% соответственно), что указывает на низкую эффективность окситетрациклина и тилозина. В четвертой – контрольной группе падеж птицы составил 93,3%.

Таким образом, для лечения и профилактики пастереллеза птиц наиболее целесообразно использование энрофлоксацина 10%, так как своевременное его применение позволяет добиться выздоровления птицы от этого заболевания у 94,7% поголовья.

УДК 579.252.55: 615.332: 579.25: 577.212.3

В.И. Семенихин, С.А. Юрик, Д.А. Хузин, Х.Н. Макаев

*Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока
Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности
животных*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ

Одна из проблем при идентификации представителей *Fusobacterium necrophorum* состоит в том, что большинство их не проявляют себя в обычных микробиологических и морфологических тестах. *Fusobacterium necrophorum* морфологически схожи с родом *Bacteroides*, культуры которых можно выделить из пищеварительного тракта (слепая кишка, рубец), сточных воды и очагов инфекции и нагноения у животных и че-

ловека. Так, например, длинные нити образуют не только *F. necrophorum*, а и культуры *F. godiaformans*, *F. mortiferum*, *F. necrogenes*, *F. periodonticum*, выделенные от животных и человека. Поэтому с помощью морфологических признаков не возможно дифференцировать *Fusobacterium necrophorum* от других анаэробов.

При проведении диагностических исследований согласно «Методическим ука-

заниям по лабораторной диагностике некробактериоза» [1], наряду с *Fusobacterium necrophorum* выделяются и не идентифицированные (uncultured) *Fusobacterium*, а также *Fusobacterium pseudonecrophorum* и другие анаэробы, морфологически схожие с *F. necrophorum*, но обладающие несколько большей энергией роста. Об этом сообщали и зарубежные исследователи [2]. Доля чистых культур при этом способе составляет около одной трети от всех выделенных анаэробов. Нами в процессе исследования культур *Fusobacterium necrophorum*, выделенных от больных некробактериозом животных в разных регионах Российской Федерации [3, 4], согласно вышеуказанному «Методическим указаниям.....» было отмечено, что с увеличением числа проведенных пассажей на питательных средах (от 3-го к 23-му) количество положительно реагирующих культур в гнездовой ПЦР уменьшалось. Так, из 40 культур, выделенных от животных Приволжского региона в начале исследований только 4 культуры, несмотря на морфологическое сходство с *Fusobacterium* и патогенность для белых мышей, были отрицательны в ПЦР. В последующем, с увеличением числа пассажей, их стало больше, а количество положительно реагирующих стабилизировалось на 10 культурах. Аналогичную картину наблюдали и с культурами, выделенных в Западно-Сибирском регионе, где из 7 положительных культур в начале исследований, осталось стабильно положительными 2.

Для конструирования диагностических тест-систем по выявлению специфического фрагмента ДНК использовали принцип мономорфного STSs-маркирования (sequence tagged sites) с помощью гнездовой и мультиплексной ПЦР.

В своей работе мы столкнулись с тем, что в отечественной литературе не было описано ни одного штамма *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum*. В своих работах ряд исследователей [5] так же отмечали отсутствие эталонных штаммов-референтов разных подвигов.

По результатам проведенного ДНК-маркирования имеющихся в нашем распоряжении культур с помощью различных типов ПЦР [6] были выбраны две культуры, как наиболее характерные представители *Fusobacterium necrophorum* – это № 8TS630501 и №12TSK630501.

Штамм № 8TS630501 был выделен 05.12.1999 года от больной телки из неблагополучного по некробактериозу хозяй-

ства Марковского района Саратовской области, а № 12TSK630501 – 02.12.95 года от больной первотелки Высокогорского района Республики Татарстан.

Выделенные штаммы бактерий некробактериоза вызывают хроническую инфекционную болезнь, характеризующуюся гнойно-некротическим поражением кожи, слизистых оболочек, конечностей и паренхиматозных органов. При росте бактерий в среде Китта-Тароцци с добавлением 10% нормальной сыворотки крупного рогатого скота под вазелиновым маслом при температуре 37° С и pH – 7,2–7,6 сначала видны нити, а затем разной длины палочки, которые окрашиваются грамотрицательно. В течение 24 часов после посева на среду в процессе роста вызывают обильное помутнение, в начале в нижних слоях, затем и всей среды. При последующем культивировании выпадают в рыхлый осадок и среда становится прозрачной.

Бактерии не спорообразующие, неподвижные. Колонии на агаровой среде розинчатые, серебристые, выпуклые, прозрачные, круглые, диаметром 2-4 мм; на кровяном агаре зона гемолиза 8-10 мм, агглютинируют эритроциты кур в разведении в титре до 1:128. В жидкой среде они продуцируют индол и сероводород. Ферментируют с образованием масляной кислоты и незначительного количества газа глюкозу, сахарозу, мальтозу, манит, дульцин, инулин. Слабо ферментирует лактозу. Образует термолабильный экзотоксин, вызывающий гибель белых мышей на 1-2 сутки после их внутрибрюшинного заражения.

При подкожном заражении суточной бульонной культурой первых пассажей белые мыши погибают на 4-5 сутки, кролики на 8-10 сутки с выраженным гнойно-некротическим поражением тканей на месте введения и поражениями паренхиматозных органов. В последующем после 23-25 пассажей бульонная культура вызывает на месте инъекции гнойно-некротический очаг или развивается сухой некроз. В реакции непрямой иммунофлуоресценции с гомологичной сывороткой титр антигена штамма № 8TS630501 составлял в разведении 1:10240 и с гетерологичными – 1:240-1:1280 и штамма №12TSK630501 соответственно – 1:5180 и с гетерологичными – 1:320-1:640.

Генетические особенности штаммов: прототроф, в качестве фактора роста используют нормальную сыворотку, устойчивы к стрептомицину, мономицину, неомицину.

На основании результатов изучения культуральных, морфологических, биохимических и биологических признаков штаммов № 8TS630501 и №12TSK630501 были идентифицированы по «Определителю микроорганизмов Берджи» [7], как вид *Fusobacterium necrophorum*.

Для окончательной дифференциации и определения подвида провели секвенирование фрагментов нуклеотидных последовательностей генов, полученных в результате проведения мультиплексной ПЦР: транспозазы, белка оболочки, топоизомеразы II (ДНК-гираза), гемагглютинаина и спейсера (16S-spacer-23S). Секвенирование продуктов амплификации фрагментов ДНК культур № 8TS630501 и № 12(12TSK630501) проводили по двум цепочкам ДНК, используя общепринятую методику Максама-Гилберта [8]. Затем провели сопоставление нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК соответствующих генов с нуклеотидными последовательностями опубликованных в GenBank+EMBL+DDBJ+PDB с помощью пакета программ Alignment Service V4.0 [9].

Нуклеотидные последовательности фрагментов ДНК, изучаемых генов, приведены в GenBank/NCBI locus: DQ417656 [gi: 89891991] (ДНК-гираза, топоизомераза II), DQ417657 [gi: 89891993] (спейсер), DQ335667 [gi: 84872488] (белок оболочки) и DQ341278 [gi:85002770] (гемагглютинин) [6].

После сравнения установили, что исследуемый фрагмент ДНК гена groV культуры № 8 (8TS630501) совпадает с последовательностью *Fn. subsp. necrophorum*

шт. ATCC25286 (AF527637) и культуры № 12(12TSK630501) на 30% с *Fn. subsp. funduliforme* шт. ATCC 51357 в районе 3'-конца и с центральной областью.

Нуклеотидная последовательность исследуемого фрагмента гена omrH (ген гемагглютинаина) культуры № 8(8TS630501)) совпадала полностью с последовательностью ДНК *Fn. subsp. necrophorum* шт. ATCC28256 (AF529887) и культуры № 12 (12TSK630501). Ген гемагглютинаина отсутствует у *Fn. subsp. funduliforme* и *Fusobacterium necleatum*.

Нуклеотидная последовательность исследуемого фрагмента гена фермента ДНК-гиразы (DNA gyrase B protein) культуры № 8(8TS630501) совпадала с нуклеотидной последовательностью штаммов *Fn. subsp. necrophorum* NCTC10576 (AY372007), Fn1 (AY370663) и *Fn. subsp. funduliforme* Fn45 (AY370665), а также с последовательностью культуры № 12 (12TSK630501).

Нуклеотидная последовательность исследуемой вставки 16S-spacer-23S лейкотоксина культуры № 8(8TS630501) совпадала с нуклеотидной последовательностью штаммов *Fn. subsp. necrophorum*: Fn 48 (AF410959) и JCM3716 (AF410965) и *Fn. subsp. funduliforme*: Fn 513 (AF410961) и JCM3717 (AF410967) и № 12(12TSK630501).

На основании генотипирования штаммы бактерий *Fusobacterium necrophorum* 8TS630501 и 12TSK630501 были отнесены к подвиду (*subspecies*) *necrophorum* и депонированы в НИИ ККМ ГНЦ ВБ «Вектор» под номерами соответственно В-1075 и В-1076.

РЕЗЮМЕ

Дана биологическая и генетическая характеристика депонированным штаммам бактерий *Fusobacterium necrophorum* subspecies *necrophorum* 8TS630501 и 12TSK630501, выделенных микробиологическими и биологическими методами

SUMMARY

The biological and genetic characteristic deposited strain bacteria *Fusobacterium necrophorum* subspecies *necrophorum* 8TS630501 and 12TSK630501, allocated is given by microbiological and biological methods

Литература

1. Методические указания по лабораторной диагностике некробактериоза. (Утвержд. ГУВ Госагропрома СССР 1 июня 1987). М. 1987.
2. Tajima K. Rumen Bacterial Community Transition During Adaptation to High-grain Diet / K. Tajima, S. Arai, K. Ogata, T. Nagamine, H. Matsui, M. Namakura, R.I. Aminov and Y. Benno// Anaerobe. 2000. №6. P273-284.
3. Семенihin В.И. Выявление гена гемагглютинаина *Fusobacterium necrophorum* с помощью полимеразной цепной реакции / В.И.Семенihin, Д.А. Хузин, С.А. Юрик, Х.Н. Макаев, Е.В. Дударева // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. Новосибирск. 2005. № 3. С. 83-87.
4. Семенihin В.И. Полиморфизм ДНК изолятов возбудителя некробактериоза крупного рогатого скота в Западной Сибири / В.И.Семенihin, С.А. Юрик, Ю.А. Горбунов, А.А. Самолов, С.В. Лопатин, Е.В. Дударева // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. Новосибирск. 2005. №2. С. 98-102.
5. Соломаха О.И. Биотипы возбудителя некробактериоза и подбор штаммов для изготовления вакцины против некробактериоза животных/ О.И. Соломаха, Л.В. Кириллов, Н.Н. Кружнов, Е.Г.Лавченко, З.М. Межнева // Аграрная Россия. 2000. №3. С.62-66.
6. Семенihin В.И. Разграничение *Fusobacterium necrophorum* на подвиды с помощью дуплексной одношаговой полимеразной цепной реакции / В.И.Семенihin, Е.А. Храпов, С.А. Юрик, М.А. Филипенко, Е.В. Дударева //Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. Новосибирск. 2005. № 3. С. 87-92.

7. Определитель бактерий Берджи/ Под редакцией Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. М.: Мир. 1997. Т.1. С. 295-300, 328-330.
8. Maxam F.M., Gilbert W. In: Methods in Enzymology. 1980. Vol. 65. Part. I. P. 499-550.

9. Resenchuk S.M. Alignment service: creation and processing of alignments of sequences of unlimited length/ S.M. Resenchuk, V.M. Blinov// Comput. Appl.Biosci. 1995. №11. P. 7-11.

П.В. Соловьев

ВНИИ Ветеринарной Санитарии, Гигиены и Экологии РАСХН, Москва

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ЛЕЧЕНИЯ ДЕМОДЕКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МАКРОЦИКЛИЧЕСКИХ ЛАКТОНОВ И ПИРЕТРОИДОВ

Введение

Борьба с демодекозом крупного рогатого скота с применением препаратов на основе макроциклических лактонов (МЦЛ) имеет свои преимущества и недостатки. Из преимуществ, следует отметить высокую эффективность обработок и низкие затраты труда. К недостаткам относятся сравнительно высокая себестоимость и длительное выведение остаточных количеств МЦЛ, что ограничивает их применение для обработок дойного скота. Некоторая недостаточная эффективность, о которой сообщает ряд исследователей, даже при применении доз МЦЛ, превышающих рекомендованную, может иметь различные объяснения. Одно из объяснений приводит Ларионов С. В.: «инкапсуляция демодекозных колоний – своеобразная защитная реакция организма животного-хозяина, как это не парадоксально, служит дополнительной защитой для клещей, препятствуя проникновению в колонию акарицидов». Но даже в колониях, куда проник акарицид, гибель яиц клещей и всех особей предимагинальных фаз, пребывающих в пассивном состоянии может не наступить, так как они имеют большую устойчивость к акарицидам в сравнении с имаго и предимагинальными стадиями, находящимися в активном состоянии».

Ларионов С. В. считает, что эмпирическое применение все новых и новых акарицидов бесперспективно и поиск новых методов лечения демодекоза возможен только после всестороннего изучения биологии возбудителя [2].

Мы считаем, что помимо этого необходимо также учитывать и более детально

изучать фармакокинетические свойства препаратов рекомендованных для лечения и профилактики демодекоза.

Известно, что время нахождения активно – действующей концентрации МЦЛ в тканях, где локализуется паразит, связано с концентрацией МЦЛ в плазме крови и распределением этой концентрации между плазмой и тканями [9,12].

МЦЛ включают два семейства: авермектинов (абаемектин, ивермектин, дорамектин, эприномектин и селамектин) и милбимицинов (немадектин, моксидектин, D-милбемицин и т.д.) которые представлены на рынке в виде препаратов для инъекций, пур-онов и оральных препаратов для скота и домашних животных.

Превосходный спектр активности авермектинов и милбимицинов против некоторых нематод и членистоногих привел к всеобъемлющему названию «эндектоциды», которым они теперь классифицированы [14].

Так как ивермектин выдающийся эндектоцид, он является предметом большого количества фармакокинетических исследований. Фармакокинетика ивермектина сильно отличается в зависимости от способа введения, препаративной формы применяемого препарата и вида животного.

Используя особенности кинетики ивермектина, можно варьировать длительность его нахождения в организме, уровень и скорость достижения максимальной концентрации в плазме и тканях, а также скорость снижения концентрации за счет уменьшения вводимых доз, выбора той или иной препаративной формы ивермектина, а также способа и места его введения в орга-