

Дежаткина, Н.А. Проворова //Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2011. - № 206. - С. 179-185.

2. Kolb, E. Die Bedeutung des Vitamins A für das Immunsystem /E. Kolb //Übersichtsf. Berl.Berl u Munches tierartlWscr., Bd 108. H. 10. – 1995. – S. 385-390.

3. Paulo, M.G. An isocratic LC method for the simultaneous determination of vitamins A, C, E and beta-carotene /M.G. Paulo, Y.M. Margues, J.A. Morais, et al. – Pharm Biomed

Anal. – 1999. – 21. - №2. – P. 399-406.

4. Solomons, N.W. Plant sources of vitamin A and human nutrition: how much is still too little / N.W. Solomons. - Nutr Rev. – 1999. - № 11. – P. 350-353.

5. Мерзленко, Р.А. Вододисперсный комплекс жирорастворимых витаминов в животноводстве / Р.А. Мерзленко, Л.В. Резниченко, О.В. Мерзленко //Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2005. - № 7. – С. 58-60.

6. Фаритов, Т.А. Корма и кормовые добавки /Т.А. Фаритов. - СПб.: Издательство «Лань». – 2010. – 304с.

УДК: 619:618

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Хлынов Дмитрий Николаевич, научный сотрудник научно-образовательного центра УГСХА*

Богданов Ильгизар Исмаилович, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ВСЭ»*

Богданова Марина Анатольевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Морфология, физиология и патология животных» *

Фомин Александр Николаевич, кандидат технических наук, доцент**

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»

432017, г.Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел. 8(8422) 55-95-83,

e-mail: nicugsha@yandex.ru

**ООО «Научно-Технический Центр «ПромТехЭнерго»

432071, Ульяновская область, Ульяновск, ул. Федерации, 50; тел./факс:8 (8422) 44-35-11, e-mail: mail.cowtest@gmail.com

Ключевые слова: крупный рогатый скот, стельность, диагностика, лиофилизация.

В статье представлены результаты научно-исследовательской работы по разработке технологии получения и лабораторного тестирования лиофилизированного экспресс-теста для определения беременности крупного рогатого скота.

Введение

Успешное осуществление мероприятий по борьбе с бесплодием коров на каждой животноводческой ферме невозможно без строгого ветеринарно-зоотехнического контроля, позволяющего планировать на протяжении календарного года запуск, роды, осеменение животных и текущую внутрифермную работу; своевременно пополнять стадо молодняком, квалифициро-

ванно проводить выбраковку животных, непригодных к воспроизводству и т.д. Достижение этих целей возможно только на основе регулярных диагностических исследований на беременность и бесплодие, а также ежедневного учета в маточном стаде основных групп животных: беременных, в послеродовом периоде и осемененных [1,2].

Коллективом авторов (Богданов И.И., Богданова М.А., Багманов М.А., Хлынов Д.Н.,

Фомин А.Н.) разработан биопрепарат – экспресс-тест для диагностики беременности и бесплодия коров. Экспресс-тест основан на иммунологической реакции идентификации хорионического гонадотропина в моче коров [3,4,5].

Данный препарат показал себя как высокоэффективное диагностическое средство, позволяющее устанавливать беременность в достаточно ранние сроки. Следует отметить, что география потребителей препарата достаточно широка и включает регионы России и зарубежные страны с различными климатическими условиями, неблагоприятно отражающимися на качестве биопрепарата при его пересылке и транспортировке. Жидкие препараты требуют определенного режима хранения и транспортирования – от +2 до +4°C, нарушение которого как в сторону повышения, так и в сторону понижения температуры могут приводить к полной потере активности. В связи с этим возникает необходимость усовершенствования формы выпуска экспресс-теста, позволяющей исключить вышеуказанные отрицательные воздействия. В данном аспекте одним из решений проблемы является разработка лиофилизированной формы диагностикума.

Отсутствие унифицированной технологии лиофильного высушивания биологических объектов обуславливает необходимость проведения исследований по стабилизации каждого конкретного препарата.

Цель работы: Разработать технологию получения экспресс-теста для диагностики беременности и бесплодия домашнего скота в лиофилизированной форме.

В соответствии с поставленной целью необходимо было решить следующие задачи:

1. Разработать технологию и лабораторный регламент получения экспресс-теста в лиофилизированной форме для диагностики беременности домашнего скота;
2. Получить опытную партию диагностического препарата и провести его лабораторное испытание;
3. Разработать требования к качеству

разрабатываемых тест-полосок с учетом интересов потребителей, требований к продукции для жизни, здоровья людей и животных, окружающей среды.

Объекты и методы исследований

Объектом исследования являлась технология получения экспресс-теста для диагностики беременности и бесплодия домашнего скота в лиофилизированной форме.

Были использованы следующие реактивы и лабораторная посуда: препарат «Гонадотропин хорионический для инъекций», вазелиновое масло, ланолин, ализарин, дистиллированная вода, борная кислота (порошок), физиологический раствор 0,9%, глицин, маннитол, шприц инъекционный одноразовый с иглой, 2,5 см³, шприц инъекционный одноразовый с иглой, 5 см³, спирт, 96°, вата хирургическая нестерильная, пробирки, колбы мерные, пипетки пастеровские, пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0; 10 см³, флаконы емкостью 50, 100 см³

Использованное оборудование: холодильники бытовые, термостаты ТС-80М-2, автоклав ВК-75, аквадистиллятор, сушильный шкаф, сублимационный камерный аппарат марки Labconco, низкотемпературный холодильник (- 500С).

В качестве лабораторных животных были использованы кролики массой 1,5 - 2 кг.

Результаты исследований

Лиофилизация — способ мягкой сушки веществ, при котором высушиваемый препарат замораживается, а потом помещается в вакуумную камеру, где и происходит возгонка растворителя. Сухие препараты, полученные лиофилизацией, не претерпевают химических изменений и не теряют присущих им свойств при длительном хранении даже при положительных значениях температуры, вследствие чего упрощаются условия транспортировки и хранения, увеличивается срок годности. При лиофилизации большинство белков не подвергается денатурации и может длительно сохраняться при умеренном охлаждении (около 0 °С). Лيوфилизированные ткани и препараты при увлажнении восста-

навливают свои первоначальные свойства.

Лиофилизации, как правило, подвергаются микроорганизмы и бактериофаги. Она широко применяется для получения способной к долговременному хранению плазмы крови (сухая плазма) и ее отдельных фракций, иммунных сывороток, иммуноглобулинов, вакцин, антибиотиков, гормонов, трансплантатов тканей, поэтому для них отработаны разнообразные режимы замораживания и высушивания [6,7].

Отсутствие унифицированной технологии лиофильного высушивания биологических объектов обуславливает необходимость проведения исследований по стабилизации каждого конкретного препарата.

В качестве стабилизаторов при лиофилизации биопрепаратов используют:

• 0,5% сыворотки крови лошади или КРС

- 20,0%-ый раствор желатина
- 20,0%-ый раствор лактозы
- 40,0%-ый раствор пептона,
- 60,0%-ый раствор сахарозы
- 80,0%-ый раствор сорбита

Рекомендуются следующие прописи стабилизаторов:

1 серия – лактоза (4,0%), пептон (20,0%);

2 серия – ГЛА (2,5%), сахароза (5,0%), глутамат Na (1,0%);

3 серия – сахароза (50,0%), пептон (10,0%);

4 серия – пептон (20,0%), лактоза (4,0%);

5 серия – ГЛА (5,0%), сахароза (10,0%), желатин (1,0%)

В технической жидкости серии 1,2,3 соотношение стабилизатора и вирусного сырья 1:1. Техническая жидкость в сериях 4 и 5 содержала 40% стабилизатора и 60% вирусного сырья.

Известен способ лиофилизации биопрепарата, включающий этапы его замораживания и вакуумного обезвоживания. Однако процесс лиофилизации по данной технологии зачастую ведет к значительной (иногда полной) потере специфической активности препарата, а лиофилизированный

материал часто «размазан» по дну флакона вследствие малого содержания суммарного сухого остатка.

Предлагаемый метод лиофилизации, рекомендованный Henderson L.O. [8] и выбранный нами, включает добавление в раствор биопрепарата перед лиофилизацией стабилизаторов – смеси глицина и маннитола. Это позволит уменьшить падение биологической активности на этапе лиофилизации.

Разработанный нами метод изготовления лиофилизированного биопрепарата [9,10] в соответствии с подготовленным лабораторным регламентом включал следующие операции (этапы):

1. Изготовление жидкой формы биопрепарата.

2. Лиофилизация

Лиофилизация проводилась в сублимационных камерных аппаратах марки Labconco. Продолжительность режима лиофилизации - (25 ± 1) часов. Начальные параметры температуры конденсатора сублимационной установки составляли $-(60 \pm 2)^\circ\text{C}$, температура греющих полок - $-(42 \pm 2)^\circ\text{C}$, температура материала $-(50 \pm 1)^\circ\text{C}$, глубина вакуума - 5,3-5,9 Па.

Герметизацию ампул после лиофилизации осуществляли в атмосфере осушенного очищенного воздуха при нормальном атмосферном давлении.

3. Контроль качества лиофилизированного биопрепарата.

3.1. Определение внешнего вида и цвета.

3.2. Определение запаха препарата.

3.3. Определение стерильности

3.4. Определение диагностической точности

Диагностическую точность препарата определяли в лабораторных условиях. В качестве индикатора использован раствор препарата «Хорионический гонадотропин для инъекций» с удельной активностью 1000 МЕ/л.

Была получена партия экспериментального образца лиофилизированного биопрепарата в количестве 50 диагности-

Таблица 1

Органолептические, физико-химические и биологические свойства лиофилизированного биопрепарата для определения беременности и бесплодия коров

Показатель	Характеристика и норма
Внешний вид	Ампулы (пробирки) с сухим осадком (таблеткой) на дне
Цвет	Оранжевый
Запах	Без ярко выраженного запаха
Стерильность	Рост на питательных средах отсутствует
Диагностическая точность	100% при наличии гормона 100% при его отсутствии в пробе

ческих проб.

В результаты лабораторного испытания получены следующие показатели, характеризующие препарат (таб. 1)

Были также разработаны следующие требования к качеству разрабатываемого диагностического препарата с учетом интересов заказчиков (потребителей), требований к продукции для жизни, здоровья людей и животных, окружающей среды:

1) Требование к возможности использования экспресс-теста в условиях животноводческих ферм и частных подворий без использования специализированного оборудования

Экспресс-тест используется в условиях животноводческих ферм и частных подворий без использования специализированного оборудования;

2) Требование к безопасности процедуры диагностики стельности и бесплодия коров и исключению вероятности заражения ветеринарных специалистов и животных заболеваниями инфекционного происхождения

Процедура диагностики стельности и бесплодия коров должна быть безопасной и исключать, при соблюдении правил асептики и антисептики, вероятность заражения ветеринарных специалистов, других лиц, выполняющих диагностические манипуляции, и животных заболеваниями инфекционного происхождения;

3) Максимальное количество доз препарата, необходимых для разовой диагностики

Не более 1;

4) Минимальное значение срока стельности, при котором можно диагностировать стельность и бесплодие

Не менее 15 дней после осеменения.

5) Точность выполняемых диагностических мероприятий

Степень соответствия при постановке диагноза на наличие или отсутствие беременности у животных (диагностическая эффективность) должна составлять не менее 98%

6) Требование к удобству и простоте использования.

Для тестирования необходима пробирка и резиновая перчатка. Процедура постановки диагноза может быть выполнена как ветеринарными специалистами, так и вспомогательным персоналом или владельцем животного в частном подворье. Читка реакции визуально четкая, позволяющая правильно оценить результаты постановки тест-пробы.

7) Требование к длительности процедуры диагностики.

Не более 15 минут для диагностических манипуляций, не более 1 часа для оценки результатов тестирования (читки);

8) Требование к продукции по воздействию на окружающую среду

Компоненты экспресс-теста являются нетоксичными, их утилизация не требует специальных мер предосторожности. Утилизация препарата должна осуществляться в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76.

9) Требование к сроку хранения препарата

Не менее 3-х лет

10) Требование к стоимости препарата

Не более 100 руб. за 1 одну диагностическую пробу.

Тестирование функциональных характеристик и потребительских свойств экспериментального образца препарата будет осуществляться в рамках производственных опытов.

Выводы

В соответствии с поставленной целью была разработана технология получения экспресс-теста в лиофилизированной форме для диагностики беременности домашнего скота. Результаты испытания полученной опытной партии препарата подтверждают возможность использования диагностического средства. Разработаны, для дальнейшего тестирования, требования к функциональным характеристикам и потребительским свойствам препарата.

Библиографический список

1. Гордон, А. Контроль воспроизводства сельскохозяйственных животных / А. Гордон. – М.: Агропромиздат, 1988. – 415 с.
2. Бурдов, Г.Н. Ранняя диагностика стельности методом ИФА / Г.Н. Бурдов, Е.И. Марасинская, С.А. Селезнев, Е.А. Загрина // Ветеринарный врач. – 2001. – №3. – С. 30-31.
3. Богданов, И.И. Хорионический гонадотропин как индикатор беременности коров / И.И.Богданов, М.А.Богданова, А.Н.Фомин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. - №3. – С.68-73.
4. Богданов, И.И. Иммунологический экспресс-тест на беременность и бесплодие коров/ И.И. Богданов, М.А.Богданова, А.Н.Фомин // Вестник ветеринарии. - 2011. - Том 59. № 4. - С. 11-12.
5. Богданов, И.И. Перспективы применения экспресс-метода диагностики беременности и бесплодия коров / И.И. Богданов, М.А. Богданова, А.Н. Фомин, Д.Н. Хлынов // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2012. - №1. – С.74-78.
6. Loi, P. Towards storage of cells and gametes in dry form. / P.Loi, D.luso, M.Czernik, F.Zacchini, , G. Ptak, // Trends in biotechnology, 31(12), 688-695. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.09.004
7. Dong, A. Infrared spectroscopic studies of lyophilization-and temperature-induced protein aggregation / A. Dong, S. J.Prestrelski, S.D. Allison // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1995. – Т. 84. – №. 4. – С. 415-424.
8. Henderson, L.O. Preparation of lyophilized human serum-based reference materials with graded levels of apolipoproteins A-I and B/ L.O.Henderson, J.S.Hazlehurst, L.Taylor, W.H. Hannon// Clin.Biochem. - 1988. - v.21. - p.219-223.
9. Хлынов, Д.Н. Разработка тест-полосок для экспресс-диагностики беременности и бесплодия коров / Д.Н. Хлынов, И.И. Богданов, М.А. Богданова // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы V Международной научно-практической конференции. – 2012. – Том 1. – С.168-172
10. Хлынов, Д.Н. Подбор метода лиофильной сушки биопрепарата для диагностики беременности и бесплодия домашнего скота/ Д.Н.Хлынов, И.И.Богданов, М.А.Богданова // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы V Международной научно-практической конференции. - 2013. Том 2. - С. 200-202.