

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СТЕЛЬНОСТИ КОРОВ

Хлынов Дмитрий Николаевич, соискатель

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА,

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: 8(8422)55-95-75;

e-mail: dmitriy_khlynov@mail.ru

Ключевые слова: стельность, экспресс-тест, лиофилизация, крупный рогатый скот, диагностика.

В статье рассматривается работа по модификации иммунологического биопрепарата для диагностики стельности коров. При разработке лиофилизированной модификации препарата за основу была взята технология изготовления иммунологического экспресс-теста для диагностики стельности домашнего скота, разработанная Богдановой с соавторами. В исходный препарат были внесены криопротектор, формообразующий и стабилизирующий компоненты. Были подобраны оптимальные параметры лиофилизации иммунологического биопрепарата для диагностики беременности коров. На основании полученных данных предложено использование лиофилизации в течение 3 часов в сублимационной камере при -50°C с наименьшим давлением ($5,0 \times 10^{-2}$ мБар), после чего повышение температуры со скоростью $4^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ от -50°C до -10°C . Далее температуру в камере повышают от -10°C до $+4^{\circ}\text{C}$ при скорости $2^{\circ}\text{C}/\text{ч}$, и от $+4^{\circ}\text{C}$ до $+20^{\circ}\text{C}$ при скорости $5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. Затем препарат досушивают 3 часа при температуре $+20^{\circ}\text{C}$. Общее время лиофилизации составило 26 ч. Полученный модифицированный препарат представляет собой сухую пористую субстанцию оранжевого цвета, легко растворимую в моче. Проведено исследование по изучению срока годности модифицированного препарата, которое показало, что активность диагностикума сохраняется в течение 2 лет. В ходе исследования была определена диагностическая точность иммунологического биопрепарата для диагностики беременности коров в лиофилизированной форме и экономическая эффективность его применения. Результаты испытания модифицированного биопрепарата показали высокую диагностическую точность. Независимо от возраста животных, максимальная точность диагностических исследований (по Дюльгеру) наблюдается у коров, имеющих срок стельности 3 и более месяцев (от 96,3 до 100%), минимальная – при сроке стельности до 1 месяца (от 77,9 до 88,9%). При этом в месячный срок стельности наихудший результат был зафиксирован у коров в возрасте 7 и более лет.

Введение

Диагностика беременности и бесплодия является одним из важнейших мероприятий, позволяющих своевременно осуществлять мониторинг состояния воспроизводства, разрабатывать и выполнять необходимые ветеринарные воздействия [1, 2, 3].

В настоящее время применяется или рекомендуется к применению широкий арсенал методов определения беременности. Однако однозначного мнения об эффективности указан-

ных методов нет.

Все большее внимание уделяется лабораторным методам, которые позволяют определять в биологических жидкостях (сыворотка, моча, молоко) количественное содержание гормонов-регуляторов репродуктивной функции [4, 5, 6, 7].

Для ветеринарной практики был разработан иммунологический экспресс-тест, определяющий стельность крупного рогатого скота. Данный препарат показал себя как высокоэффек-

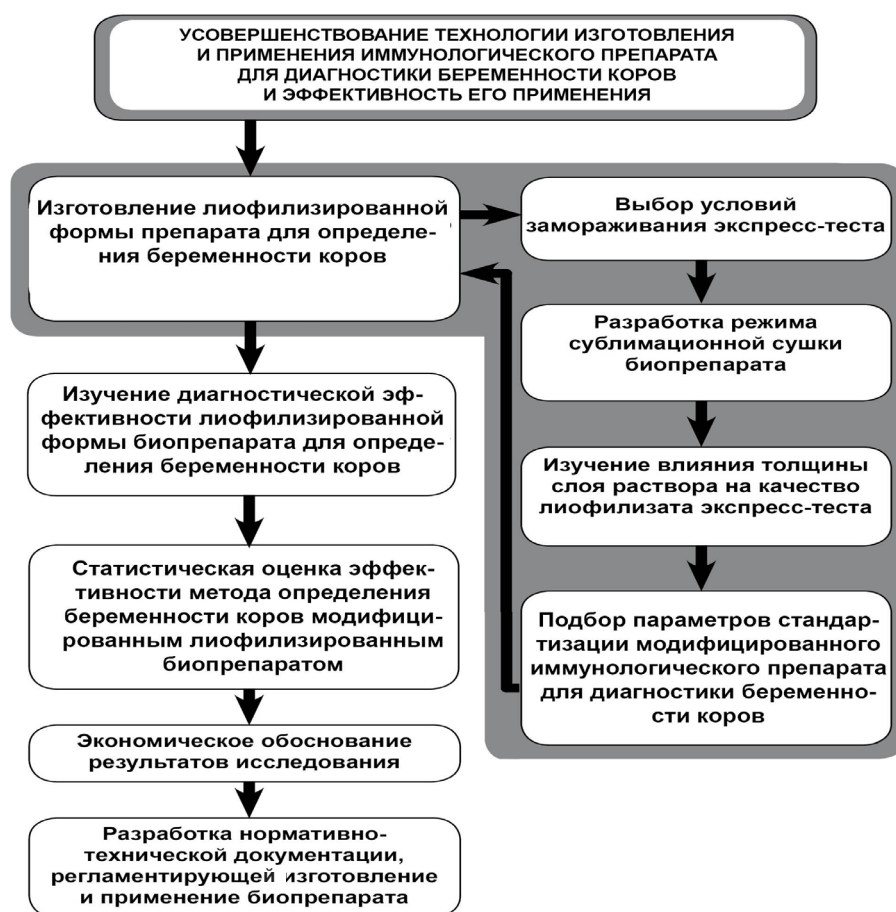


Рис. 1 – План-схема научных исследований

тивное диагностическое средство, позволяющее устанавливать беременность в достаточно ранние сроки [8]. Однако жидкая форма препарата требует определенного режима хранения и транспортирования – от +2 до +4°C, нарушение которого как в сторону повышения, так и в сторону понижения температуры может приводить к снижению его активности.

В связи с этим возникла необходимость совершенствования формы выпуска экспресс-теста, позволяющей исключить вышеуказанные отрицательные воздействия. В данном аспекте одним из решений проблемы является модифицирование диагностикума в лиофилизированную форму.

Учитывая вышеуказанную информацию, нами была поставлена **цель** – усовершенствование технологии получения экспресс-теста для диагностики беременности коров путем разработки лиофилизированной формы препарата.

Поставленная цель достигалась путём решения следующих **задач**:

- подобрать оптимальные параметры лиофилизации иммунологического биопрепарата

для диагностики беременности коров;

- определить диагностическую точность иммунологического биопрепарата для диагностики беременности коров в лиофилизированной форме и экономическую эффективность его применения;

- разработать нормативно-техническую документацию, регламентирующую изготовление и применение иммунологического биопрепарата для диагностики беременности коров в лиофилизированной форме.

Объекты и методы исследований

Исследования были проведены в период 2010–2017 гг. в рамках плановых научных исследований кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновской ГСХА (тема НИР: «Изучение нарушения гормональной регуляции репродуктивной функции животных и разработка методов определения ее патологии» (номер госрегистрации AAAA-A16-116041110204-1), а также тематических планов-заданий на выполнение научно-исследовательских работ федеральным государственным бюджетным образовательным учреж-

дением высшего профессионального образования «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А.Столыпина» по заказу Минсельхоза России за счет средств федерального бюджета на 2014 и 2015 гг. (№ госрегистрации: 01201460234; 115042810002).

Работа выполнялась на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА, ООО «НТЦ «Пром-ТехЭнерго», ООО «НТЦ «Биотек».

Для получения лиофилизированного препарата была использована лиофильная сушка FreeZone 1L, Labconco (США) компактная система для сублимации биологических объектов при отрицательных температурах

Изучение диагностической эффективности разработанного метода проводили в животноводческих хозяйствах Ульяновской области.

При разработке лиофилизированной модификации препарата за основу была взята технология изготовления иммунологического экспресс-теста для диагностики стельности домашнего скота, разработанная Богдановой с соавторами [8].

Далее технология изготовления подверглась модификации.

Схема исследования представлена на рис. 1.

Результаты исследований

В соответствии с рекомендациями, изложенными в литературных источниках, в исходный препарат были внесены криопротектор, формообразующий и стабилизирующий компоненты.

В качестве формообразующего компонента, криопротектора и стабилизатора в биопрепарат добавляли 6%-ый раствор сахарозы.

Последующие исследования были направлены на отработку различных способов заморозки, сублимации и досушивания. При этом использовали методики, разработанные Аршиновой [9].

Подбор параметров заморозки образцов являлся первым этапом разработки режима лиофилизации биопрепарата. Поочередно осуществляли: выбор способа заморозки препаратов; определение температуры заморозки; изучение воздействия длительности заморозки на качественные свойства экспресс-теста.

Заморозку препарата проводили на полках лиофилизационной установки FreeZone 1L, Labconco до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, используя метод быстрой и многофазной (медленной) заморозки:

1. Быстрая заморозка (рис. 2) – образец помещали в камеру лиофилизатора при $t +20$

$^{\circ}\text{C}$, затем снижали температуру до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и выдерживали в течение 1 ч (1 фаза). После этого температуру понижали от -20 до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ и со временем экспозиции 1 ч (2 фаза), далее снижали от -30 до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ с экспозицией еще 1 ч, затем камеру охлаждали до температуры образца $-45\ldots-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, время выдержки при данной температуре составляло 3 ч (3 фаза);

2. Многофазная (медленная) заморозка – образец помещали в камеру лиофилизатора при $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$, замораживали в течение 1 часа при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, далее 2 часа при $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 часа при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 часа при $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем температуру образца снижали до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ с выдержкой в течение 3 часов (рис. 3).

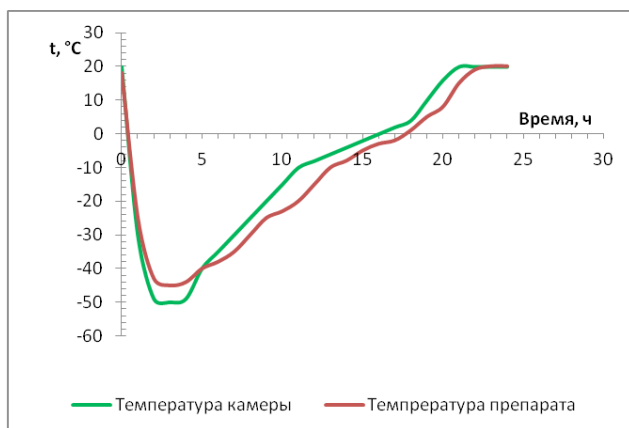
Внешне образцы, полученные при медленной и быстрой заморозке, одинаково представляли собой пористую сухую субстанцию оранжевого цвета. Остаточное влагосодержание для медленно замороженного образца составило 0,09%, для быстро замороженного – 0,10%. Показатель pH жидких препаратов, полученных при растворении сухой формы в дистиллированной воде, для медленно замороженного образца – 7,1, для быстро замороженного – 7,0. Лيوфилизаты легко растворялись в 5 мл дистиллированной воды в течение 2 мин. Из полученных данных видно, что оба способа заморозки не приводят к существенным изменениям основных характеристик лиофилизата иммунологического экспресс-теста. Последующим этапом проводили лиофильное высушивание образцов, полученных обоими методами, оценивали по физико-химическим свойствам.

Согласно плану научных исследований, вторым этапом явилась разработка режима сублимационной сушки биопрепарата.

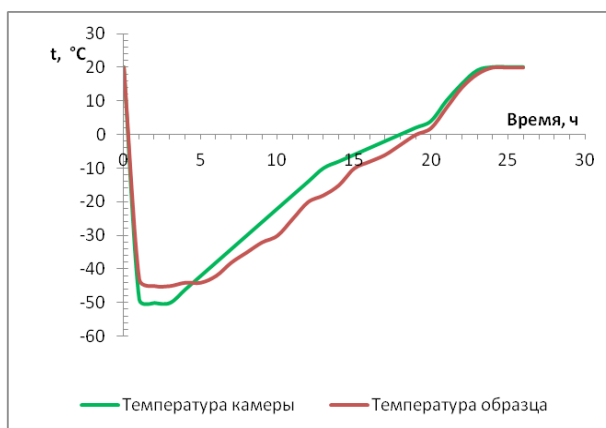
С целью изготовления стабильной формы препарата его лиофилизацию проводили в сублимационном аппарате FreeZone 1L, Labconco пятью способами (рис. 2):

Способ 1 В течение 3 часов образцы выдерживали в сублимационной камере при $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ с наименьшим давлением ($5,0 \times 10^{-2}$ мБар), после чего со скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ повышали температуру от $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Далее температуру в камере повышали от $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ при скорости $3^{\circ}\text{C}/\text{ч}$, и от $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ при скорости $6^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. Затем препарат выдерживали 3 часа при температуре $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и минимальном давлении ($5,0 \times 10^{-2}$ мБар). Общее время лиофилизации составило 24 ч.

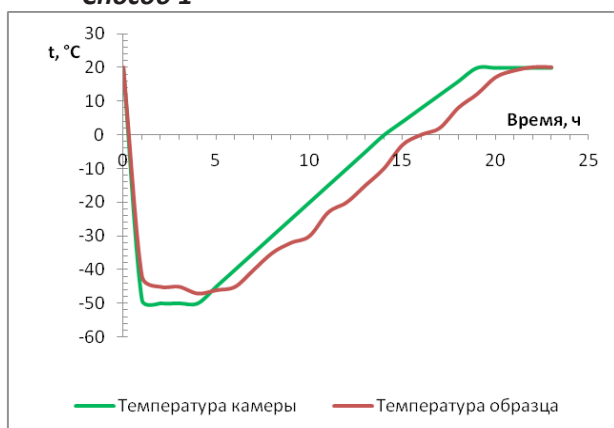
Способ 2 В течение 3 часов образцы выдерживали в сублимационной камере при $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$



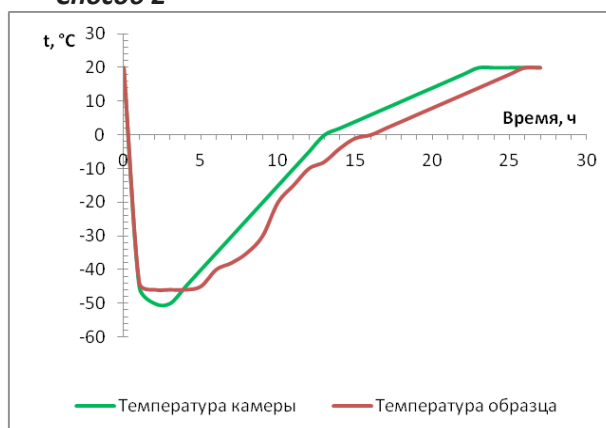
Способ 1



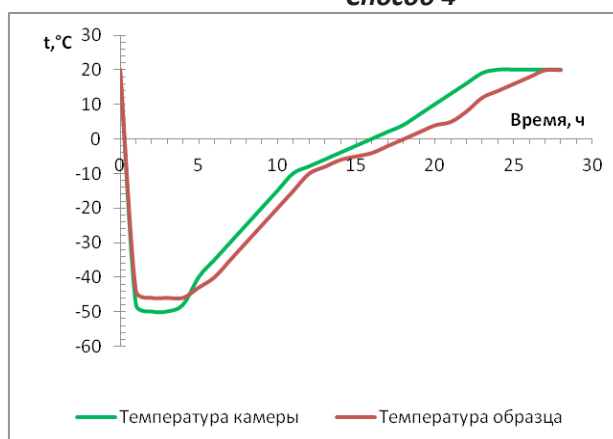
Способ 2



Способ 3



Способ 4



Способ 5

Рис. 2 - Способы лиофилизации

с наименьшим давлением ($5,0 \times 10^{-2}$ мБар), после чего со скоростью $4^\circ\text{C}/\text{ч}$ повышали температуру от -50°C до -10°C . Далее температуру в камере повышали от -10°C до $+4^\circ\text{C}$ при скорости $2^\circ\text{C}/\text{ч}$, и от $+4^\circ\text{C}$ до $+20^\circ\text{C}$ при скорости $5^\circ\text{C}/\text{ч}$. Затем препарат досушивали 3 часа при температуре $+20^\circ\text{C}$. Общее время лиофилизации составило 26 ч.

Способ 3 В течение 3 часов образцы вы-

держивали в сублимационной камере при -50°C с наименьшим давлением ($5,0 \times 10^{-2}$ мБар). Далее со скоростью $5^\circ\text{C}/\text{ч}$ повышали температуру в камере от -50°C до 0°C и со скоростью $4^\circ\text{C}/\text{ч}$ от 0°C до $+20^\circ\text{C}$. Затем препарат выдерживали 3 часа при температуре $+20^\circ\text{C}$ и минимальном давлении ($5,0 \times 10^{-2}$ мБар). Лيوфилизация продолжалась 23 ч.

Способ 4 В течение 3 часов образцы вы-

держивали в сублимационной камере при -50°C с наименьшим давлением ($5,0 \times 10^{-2}$ мБар). Далее со скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ повышали температуру в камере от -50°C до 0°C и со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ от 0°C до $+20^{\circ}\text{C}$. Затем препарат выдерживали 4 часа при температуре $+20^{\circ}\text{C}$ и минимальном давлении ($5,0 \times 10^{-2}$ мБар). Лиофилизация продолжалась 28 ч.

Способ 5 В течение 3 часов образцы выдерживали в сублимационной камере при -50°C с наименьшим давлением ($5,0 \times 10^{-2}$ мБар). Далее повышали температуру в камере со скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ от -50°C до -10°C ; со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ от -10°C до $+4^{\circ}\text{C}$ и $5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ от $+5^{\circ}\text{C}$ до $+20^{\circ}\text{C}$. Затем препарат досушивали 4 часа при температуре $+20^{\circ}\text{C}$. Общее время лиофилизации составило 28 часов.

Для оптимизации производства модифицированного биопрепарата изучали воздействие длительности лиофильного высушивания, скорости подведения тепла к образцам, а также температуры и времени досушивания.

Качество полученного диагностикума определяли по следующим характеристикам: внешний вид (однородность, пористость, цвет), потеря в массе при сублимации, содержание биопрепарата в пробирке, растворимость в дистиллированной воде и моче коров, значение pH после растворения в воде.

Полученные данные стали обоснованием того, что из всех вышеуказанных способов сублимации только 2 и 5 способы соответствуют требуемым характеристикам.

На основании полученных данных предложено использование 2-ого способа сублимации, для которого необходимо меньше времени, а следовательно, и меньше затрат электроэнергии, этот способ применяли в производстве иммунологического препарата.

Влияние толщины слоя раствора на качество лиофилизата экспресс-теста

Для установления толщины слоя жидкого биопрепарата при изготовлении лиофилизата раствор разливали в пробирки объемом 15 мл по 1,0, 2,0 и 5,0 мл и сублимировали подобранным ранее способом. Качество лиофилизата характеризовали по внешнему виду и остаточной влажности.

При лиофилизации 5 мл иммунологического биопрепарата значение остаточной влажности в среднем составило $3,2 \pm 0,1\%$. При сублимации 2 мл препарата остаточная влажность высушенного образца была не выше $1,0 \pm 0,15\%$. При лиофилизации 1 мл остаточная влаж-

ность составила $0,3 \pm 0,12\%$, препарат был в виде сухой крошковидной массы.

Исходя из приведенных выше результатов, следует, что заполнение пробирки 2 мл биопрепарата является оптимальным.

Третий этап - подбор параметров для стандартизации модифицированного лиофилизированного иммунологического препарата для диагностики беременности коров

Основные критерии характеристик выбирали на основе требований (ГОСТ 24061-89) к препаратам биологическим сухим.

Установлено, что биопрепарат для диагностики беременности коров представляет собой сухую пористую массу светло-оранжевого цвета, растворимую в 5 мл мочи в течение 20-40 секунд до однородной ярко-оранжевой консистенции. Учитывая физико-химические свойства модифицированного биопрепарата для диагностики стельности, применяли упаковку в виде цилиндрических пластиковых пробирок с завинчивающимися крышками. Такая упаковка наиболее приемлема для процесса лиофилизации (является термостабильной и не бьется), также удобна для хранения, транспортировки. Пробирка с лиофилизатом препарата является сосудом для проведения диагностической тест-реакции.

Была проанализирована активность модифицированного биопрепарата путем внесения в пробирку с лиофилизатом мочи от заведомо беременной коровы. После 20-40 секунд активного встряхивания содержимое пробирки растворялось до однородной консистенции ярко-оранжевого цвета. В течение 15 минут цвет раствора становился темно-фиолетовым. Затем в течение 40 минут начинал выпадать черно-фиолетовый осадок, надосадочная жидкость просветлялась.

Для определения срока годности препарата изготовили 6 серий лиофилизированного экспресс-теста, согласно технологии, описанной ранее. Затем полученные образцы заложили на хранение при температуре от 10°C до 20°C в защищенное от света место. Через каждые 6 месяцев анализировали заложенные на хранение серии препаратов. Определяли активность экспресс-теста в диагностической реакции с мочой беременной и не беременной коров. Параллельно проводили исследования активности жидкой формы биопрепарата, полученного на основе тех же серий. Сроки хранения исследовали в течение 2 лет. Результаты исследования показали, что жидкая форма биопрепарата не

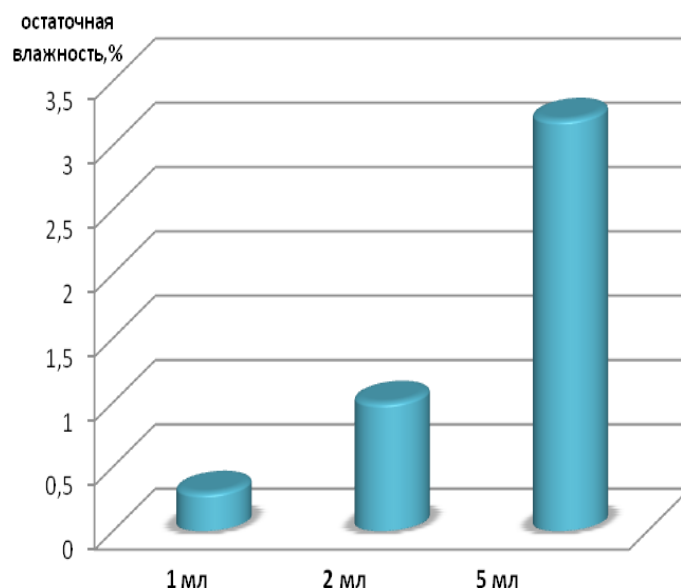


Рис. 3 - Отношение объема жидкого препарата перед сублимацией к значению остаточной влажности лиофилизата

выдерживает длительного хранения, диагностическая активность утрачивается по истечении 1 года хранения. Качество серий иммунологического препарата, произведенного по разработанной технологии, не снижается на протяжении 2 лет. Этот факт доказывает стабильную активность модифицированного диагностикума в виде лиофильновысушенной формы по сравнению с жидкой формой.

На основании проведенных исследований нами была усовершенствована технология получения лиофилизированного препарата для диагностики стельности, включающая 3 основных этапа:

1. изготовление жидкой формы;
2. лиофилизация;
3. контроль качества.

Испытание модифицированного биопрепарата для диагностики стельности проводили

на коровах на различных сроках стельности.

В качестве объекта исследования служила моча коров.

Мочеиспускание вызывали рефлекторно, методом массажа. Для диагностического исследования мочу брали однократно, в утренние часы. Мочу (объем 10 мл) собирали в чистые флаконы, закрывали резиновыми пробками, в последующем переливали в подготовленные пробирки.

Результаты испытания модифицированного биопрепарата представлены в табл. 1.

Апробация показала, что независимо от возраста животных максимальная точность диагностических исследований (по Дюльгеру) наблюдается у коров, имеющих срок стельности 3 и более месяцев (96,3%), минимальная – при сроке стельности до 1 месяца (88,3%).

Проведенное экономическое обоснова-

Таблица 1

Результаты производственного испытания модифицированного биопрепарата для определения беременности домашнего скота (n=141)

Срок стельности	Количество животных в группе	Результат теста			Диагностическая точность, %
		полож.	отр.	сомнит.	
до 1 месяца	34	30	3	1	88,3
2 месяца	38	34	4	0	89,5
3 месяца и более	54	52	1	1	96,3
Всего	126	116	8	2	92,1
бесплодные	15	0	14	1	93,3

Примечание: $p > 0,05$

ние результатов исследования показало, что внедрение модифицированного иммунологического теста для диагностики беременности коров позволяет сократить значительные экономические потери сельскохозяйственных товаропроизводителей и получить высокий экономический эффект, который составляет 13,3 руб. на 1 руб. затрат.

По результатам исследований разработаны следующие нормативно-технические документы, регламентирующие изготовление и применение лиофилизированного препарата:

1. Опытнo-промышленный регламент производства иммунологического теста для диагностики на ранних стадиях беременности домашнего скота (лиофилизированный препарат) COWTEST®L, (утверждены директором НТЦ «ПромТехэнерго» от «5» июня 2015 г.);

2. ТУ Иммунологический экспресс-тест для диагностики на ранних стадиях беременности домашнего скота (лиофилизированный препарат) COWTEST®L, (утверждены директором НТЦ «ПромТехэнерго» от «5» июня 2015 г.);

3. Инструкция по применению иммунологического экспресс-теста для диагностики на ранних стадиях беременности домашнего скота (лиофилизированный препарат) COWTEST® (утверждены директором НТЦ «ПромТехэнерго» от «5» июня 2015 г.).

Выводы

Таким образом, в целом оценивая результаты выполненной научно-исследовательской работы, можно отметить, что все задачи, вытекающие из поставленной цели, были выполнены. Подобраны оптимальные параметры лиофилизации модифицированного иммунологического биопрепарата для диагностики стельности коров. Усовершенствованный лиофилизированный экспресс-тест прошел успешную апробацию в условиях производства и зарекомендовал себя как достаточно точный, удобный и недорогой диагностический препарат.

Библиографический список

1. Дегтярёв, В. П. Зависимость воспроизводительных способностей тёлочек и коров от сроков осеменения / В. П. Дегтярёв, В. Н. Масалов, Е.А. Михеева // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2009. – Т. 17. – №. 2. – С.18-21.
2. Дегтярев В. П., Леонов К. В., Клименко А. И. Этиопатогенез и коррекция нарушений репродукции у коров: методические рекомендации / В.П. Дегтярев, К.В. Леонов, А.И. Клименко. Москва. – 2006. – 25 с.
3. Богданов, И. И. Иммунологический экспресс-тест на беременность и бесплодие коров / И.И. Богданов, М.А. Богданова, А.Н. Фомин // Вестник ветеринарии. – 2011. – Т. 59. – №. 4. – С. 11-12.
4. Клинский, Ю.Д. Гонадотропин-рилизинг-гормон и регуляция половой функции у животных / Ю.Д. Клинский, С.Д. Бутоко, А.Н. Алексеенко // Сельское хозяйство за рубежом. 1978. - №1. – С.43 – 45.
5. Дегтярев, В.П. Этиопатогенез и коррекция нарушений репродукции у коров: методические рекомендации / В.П. Дегтярев, К.В. Леонов, А.И. Клименко, И.М. Дунин. – Москва, 2006 – 15 с.
6. Клинский Юрий Дмитриевич. Биологические свойства гонадотропина сыворотки крови жеребых кобыл и его применение в каракулеводстве / Автореф. дис. ... докт. биол. Наук / Ю.Д. Клинский. - М.: Дубровицы, 1971. – 43 с.
7. Клинский, Ю.Д. Соотношение прогестерона и эстра-диола при различных физиологических состояниях коров в норме и патологии / Ю.Д. Клинский, А.М. Чомаев // Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных. 2007. - №7. - С. 224-227.
8. Богданова, М. А. Результаты испытания нового метода диагностики стельности / М.А. Богданова, М.А. Багманов, И.И.Богданов //Ветеринарная патология. 2007. - №3 – С. 39 - 41.
9. Аршинова, О. Ю. Особенности лиофилизации липосомальных лекарственных препаратов (обзор) / О.Ю. Аршинова // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 46. – №. 4. – С. 29-34.

TECHNOLOGY IMPROVEMENT OF PRODUCTION AND APPLICATION OF IMMUNOLOGICAL COMPOUND FOR COW PREGNANCY DIAGNOSTICS

Khlynov D.N.
FSBEI HE Ulyanovsk SAA
432017, Ulyanovsk, Novyi Venets bld., 1;
8 (8422) 55-95-75; E-mail: dmitriy_khlynov@mail.ru

Key words: pregnancy, express test, lyophilization, cattle, diagnostics.

The article deals with the work on improvement of immunological biocompound for cow pregnancy diagnostics. When developing the lyophilized modification of the compound, the technology to produce an immunological express test for livestock diagnostics was used, developed by Bogdanova and co-authors. The cryoprotectant, the form-generating and stabilizing components were introduced into the initial compound. Appropriate parameters of lyophilization of immunological biocompound for cow pregnancy diagnostics were selected. Based on the data obtained, the usage of lyophilization for 3 hours in a sublimation chamber at -50°C with the lowest pressure ($5,0 \times 10^{-2}$ mbar) was suggested, which was followed by a temperature increase of 4°C/h from -50°C to -10°C . Then the temperature in the chamber is increased from -10°C to $+4^{\circ}\text{C}$ at the rate of 2°C/h , and from $+4^{\circ}\text{C}$ to $+20^{\circ}\text{C}$ at the rate of 5°C/h . Then the medication is dried for 3 hours at a temperature of $+20^{\circ}\text{C}$. The total lyophilization time was 26 hours. The compound obtained looks like a dry porous substance of orange color, easily soluble in urine. A study was conducted to study the expiration date of the modified compound, which showed that the activity of the diagnosticum lasts 2 years. In the course of the study, the diagnostic accuracy of the immunological biocompound was determined to diagnose the pregnancy of cows in lyophilized form and the economic effectiveness of its usage. The test results of the modified biocompound showed high diagnostic accuracy. Regardless of the animal age, the maximum accuracy of diagnostic studies (according to Dulgher) is observed in cows with a pregnancy period of 3 months or more (from 96,3 to 100%), the minimum - with a pregnancy period of less than 1 month (from 77,9 to 88, 9%). Herewith, at 1- month pregnancy period, the worst result was recorded in cows aged 7 years old and more.

Bibliography

1. Degtyaryov V.P., Masalov V.N., Mikheeva E.A. Dependence of the reproductive abilities of heifers and cows on the insemination time // *Vestnik of Orel State Agrarian University*. - 2009. - V. 17. - No. 2.
2. Degtyarev V. P., Leonov K. V., Klimenko A. I. Etiopathogenesis and correction of cow reproductive disorders // *Methodological recommendations*. - 2006.
3. Bogdanov, I.I. Immunological express test for pregnancy and infertility of cows. / I.I. Bogdanov, M.A. Bogdanova, A.N. Fomin // *Vestnik of veterinary medicine*. - 2011. - V. 59. - No. 4. - P. 11-12.
4. Klinskiy, Y. D. Gonadotrophin-releasing hormone and regulation of animal genital function / Y.D. Klinskiy, S.D. Butoko, A.N. Alekseenko // *Agriculture abroad*. 1978. - No. 1. - P.43 - 45.
5. Degtyarev, V.P. Etiopathogenesis and correction of cow reproduction disorders / V.P. Degtyarev, K.V. Leonov, A.I. Klimenko, I.M. Dunin // *Methodical recommendations*. - Moscow, 2006 - 15 p.
6. Klinskiy, Y. D. Biological properties of gonadotrophin of blood serum of foal mares and its application in karakul sheep breeding. - Author's abstract of dissertation of Doctor of Biology, Moscow: Dubrovitsy, 1971. - 43 p.
7. Klinskiy, Y.D., Chomaev, A.M. The proportion of progesterone and estradiol at various physiological states of cows in normal state and pathology / Y.D. Klinskiy, A.M. Chomaev // *Up-to-date problems of biology of animal reproduction*. 2007. - No. 7. - P. 224-227.
8. Bogdanova, M.A. The test results of a new method for pregnancy diagnostics/ M.A. Bogdanova, M.A. Bagmanov, I.I. Bogdanov // *Veterinary pathology*. 2007. - No 3 - P. 39 - 41.
9. Arshinova, O. Y., et al. Peculiarities of lyophilization of liposomal medication (review) / O.Y. Arshinova et al. // *Chemical and Pharmaceutical Journal*. - 2011. - V. 46. - No. 4. - P. 29-34.