

**Научная деятельность в сфере АПК.
Возможности, перспективы
развития, идея создания проектных
групп**

Афонюшкин Василий Николаевич, к.б.н.
СФНЦА РАН, ИХБФМ СО РАН, г.
Новосибирск.

Кому нужны проектные группы и в чем проблема?

- 1. Испытывать препараты и схемы ветеринарных мероприятий дорого и выборки получаются нерепрезентативными 3 птичника с суммарным поголовьем 75 тыс. гол это $n=3$. 100 голов опытной группы в птичнике это $n=100$ сравниваемое с контрольной группой размером в 10 тысяч голов. Это намного надежнее и реперезентативнее, условия содержания опытной и контрольной групп идентичны, инфекционный фон – идентичен
 - 2. Желательно выбирать лучший препарат, из 3х - 4х а не один из одного... Как это бывает обычно.
- 3. Желательно выбирать лучший препарат, из 3х - 4х а не один из одного... Как это бывает обычно.
- 4. Недостатки:
 - А) Птицеводы не будут проводить ограниченные опыты по несколько групп в одном птичнике
 - Б) Фармкомпании не хотят рисковать. Ведь Если птицефабрика выберет лучший препарат/схему из пяти, то четыре компании проигрывают

Выход есть!

- Студенты, аспиранты, молодые специалисты и ученые!

• Энтузиазм!

Молодость

и задор!

- Бесплатный труд на благо аграрной науки!



Траектории развития проектных групп

- 5 препаратов, 5 студентов, одна проблема
- Обучение лабораторным методам контроля эффективности схем ветеринарных мероприятий на птицефабрике
- Разработка новых препаратов – под создание бизнес-процесса для фарм. компании /МИП, малого бизнеса (продукт, технология, персонал)
- Подготовка кадров для птицефабрики /фарм. компании (выбрать лучшего из

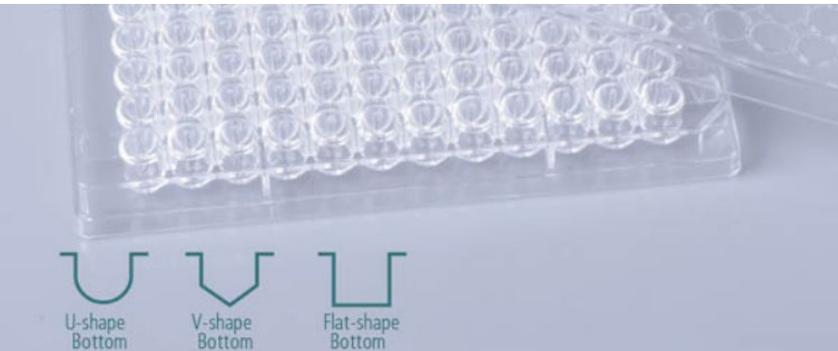
Что мы получаем?

- 5 дипломных работ
- Подготовленные кадры для с.-х. производства или торговой компании
- Одно решение проблемы
- 3-4 успешных опыта с подробным анализом механизмов и эффектов действия препарата
- Лаборатория, обслуживающая проект, тоже чего-нибудь зарабатывает
- Совершенствование лабораторной службы с.-х. производства

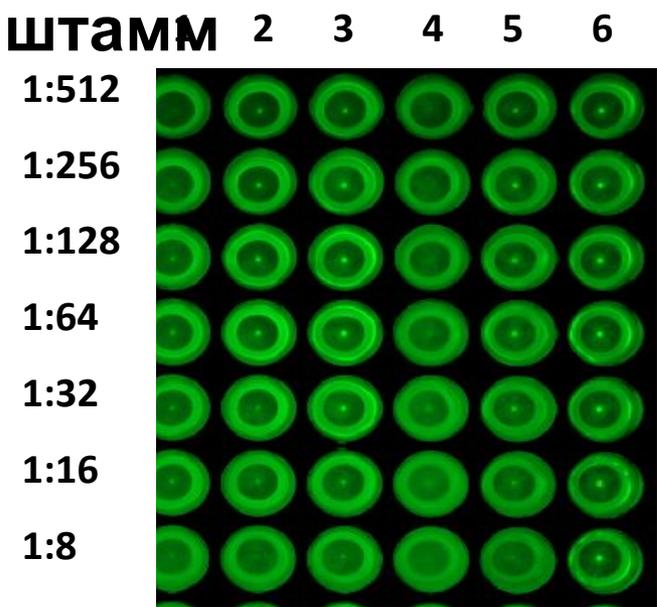
Материалы и методы:



- Антиген получали из предварительно убитой кипячением взвеси бактериальных клеток. Использовали инактивированные культуры сальмонелл серотипов Hamburg, Enteritidis, Reading, Typhimurium Virchow, Infantis а также культуру сальмонеллы которая была выделена из пищевой продукции. Для получения флуоресцентно-меченых антигенов, к взвеси инактивированных бактериальных клеток добавляли 0,1% раствор флуоресцентного красителя – акридиновый оранжевый.
- Изучали уровень антител в реакции иммунофлуоресцентной агглютинации. Предварительно определили оптимальную концентрацию антигенов. Для этой цели антигены разводили с шагом 1:2 и вносили в лунки 96 луночного микропланшета с V – образным дном, через 16 часов инкубации оценивали светимость антигенов с помощью трансиллюминатора GelDok BioRad. Затем проводили реакцию агглютинации с сыворотками крови, которые разбавляли с шагом 1:2.
- Для оценки процента серопозитивной птицы. исследовали 24 пробы сыворотки крови от цыплят-бройлеров в возрасте 40 дн в ИРА с антигеном сальмонеллы выделенной ранее на этой же птицефабрике. Часть положительных образцов были протестированы в РА с флуоресцентномеченными антигенами Hamburg, Enteritidis, Reading, Typhimurium, Virchow, Infantis для выявления перекрестных реакций с полевым штаммом. Реакцию ставили по методу [1].

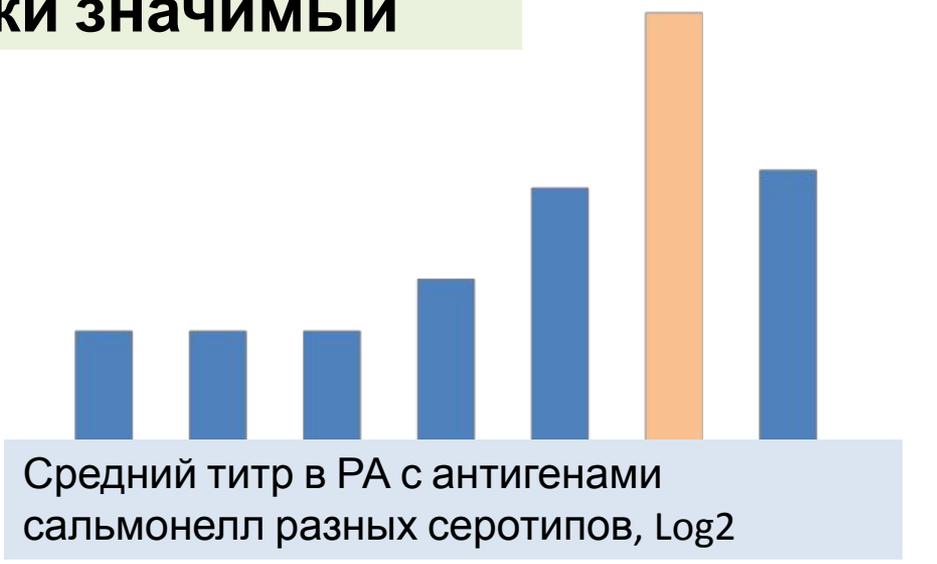


Прежде чем оценить эффективность противосальмонеллезных мероприятий – нужно выявить эпизоотически значимый штамм

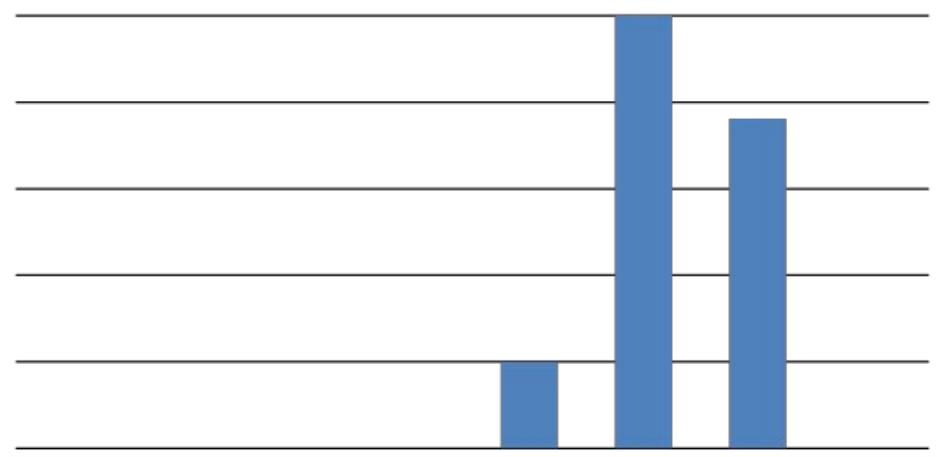


Реакция агглютинации с флуоресцентно-меченым антигеном

Использование серологических тестов на бройлерах для оценки эффективности мероприятий – можно по разнице процента серопозитивной птиц и/или среднего титра между опытными и контрольными птичками оценить эффективность противосальмонеллезных мероприятий за 10-14 дн до отбора проб крови

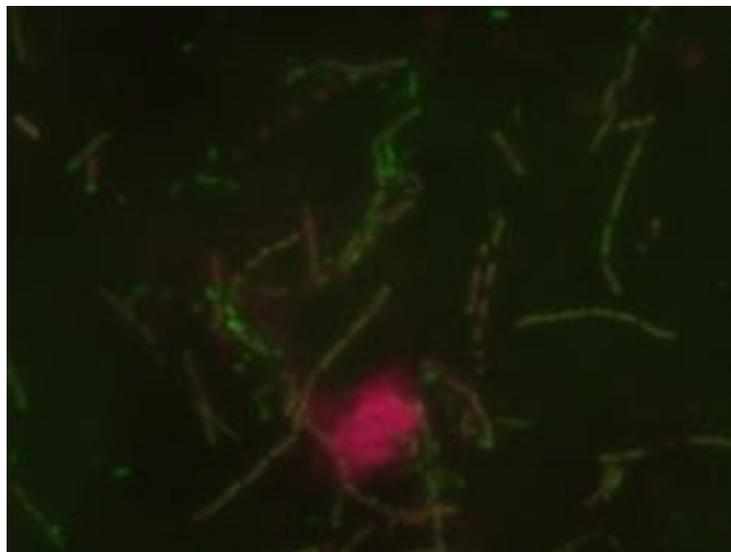
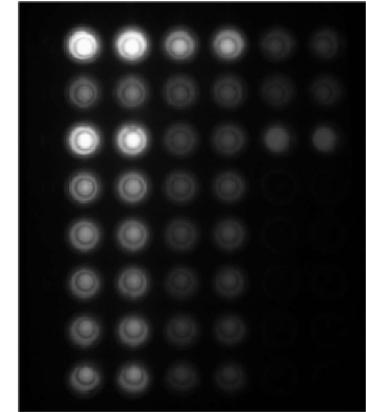
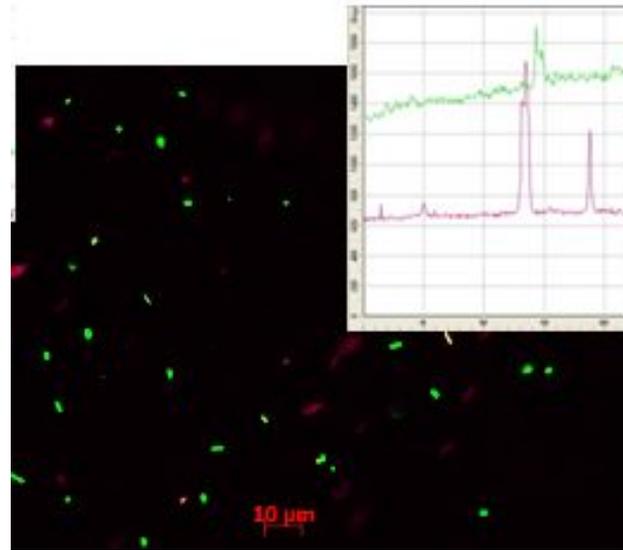
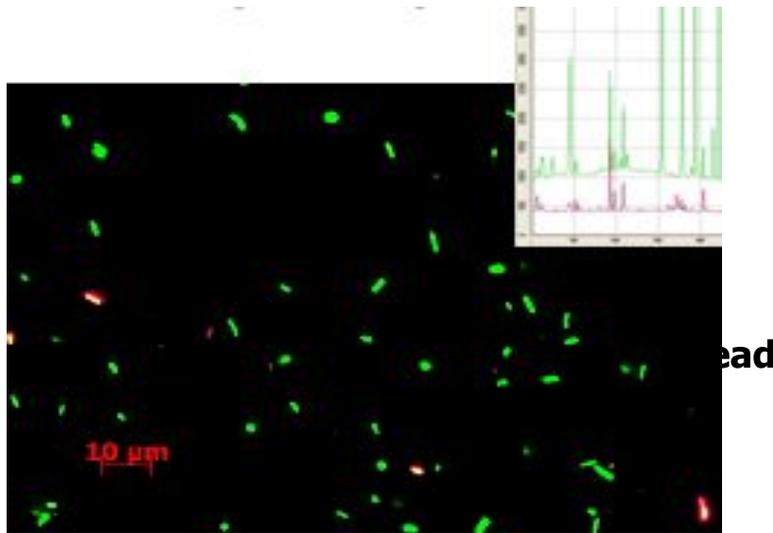


Средний титр в РА с антигенами сальмонелл разных серотипов, Log2

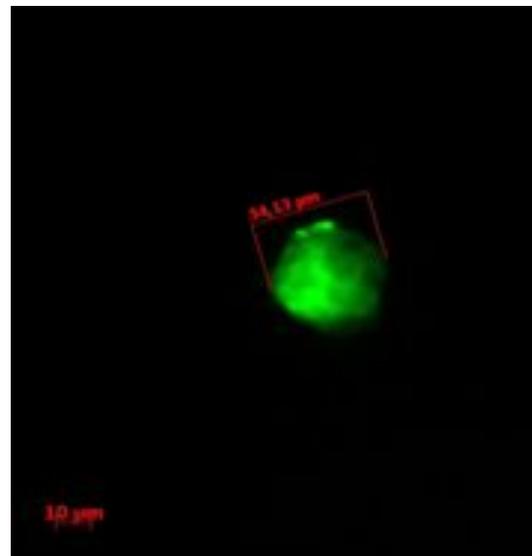


Процент серопозитивной птицы в РА к антигенам сальмонелл разных серотипов, %

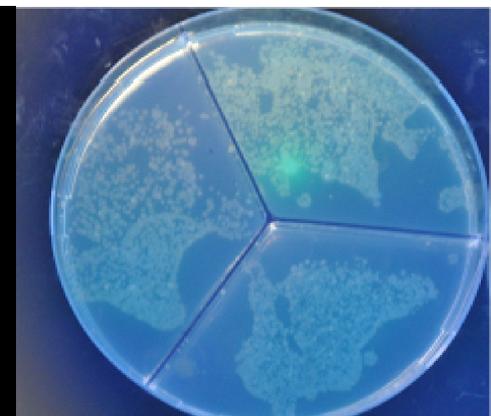
Флуоресцентные методы в микробиологии



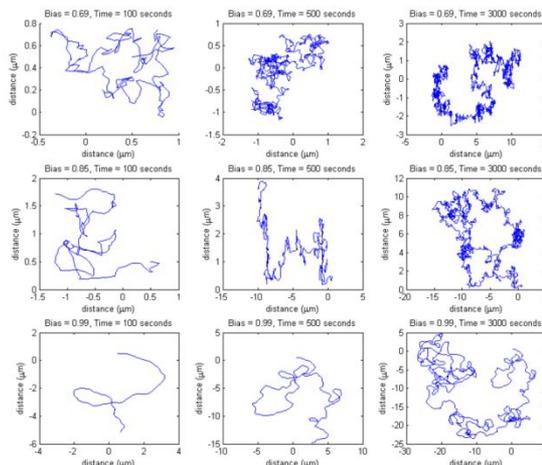
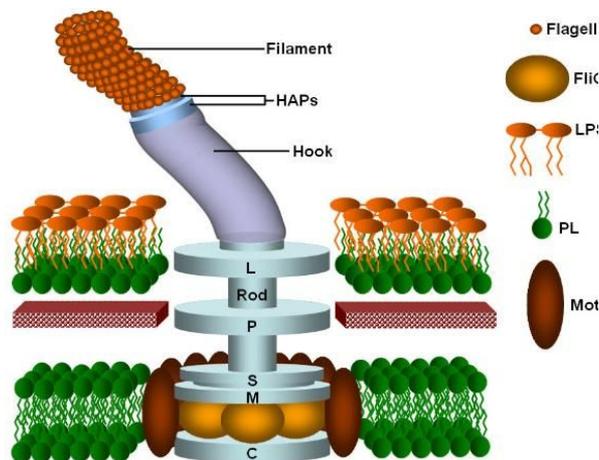
Флуоресцентно меченные (снаружи) сальмонеллы и фагоцит



Флуоресцентно меченные сальмонеллы имеющие *Sprv* оперон



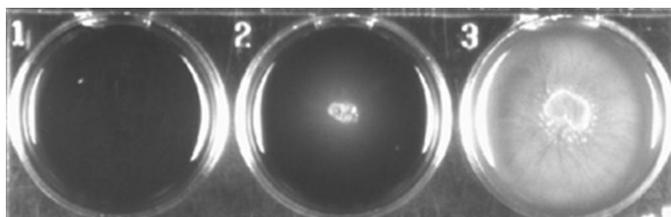
Постмаркетинговое исследование в биотехнологии: Флавофосфолипол – подавление факторов патогенности бактерий (подвижность)



- Примеры траекторий движения бактерии

Средние концентрации флавофосфолипола ингибирующие рост и подвижность бактерий

- Строение жгутика



Подавление подвижности *P. aeruginosa* на среде МЮ при различных концентрациях (штамм *P. aeruginosa* 668)

параметр	МИС	Подавление подвижности
<i>Escherichia coli</i>		
M+m, мкг/мл	387,5±42,08	74,93±13,83
Cv, %	34,06	58
r=	0,95	
<i>Salmonella enterica</i>		
M+m, мкг/мл	119,7±30,75	46,87±9,05
Cv, %	62,6	47
r=	0,161	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
M+m, мкг/мл	83,33±25,61	41,66±12,8
Cv, %	32,27	16,13
r=	1.0	

Микропланшеты для ПЦР – удобны для изучения биопленок

Test co-cultivation *P. aeruginosa* and *Bacillus spp.* | Cultivation only *Bacillus spp.* | Monocultures *P. aeruginosa*

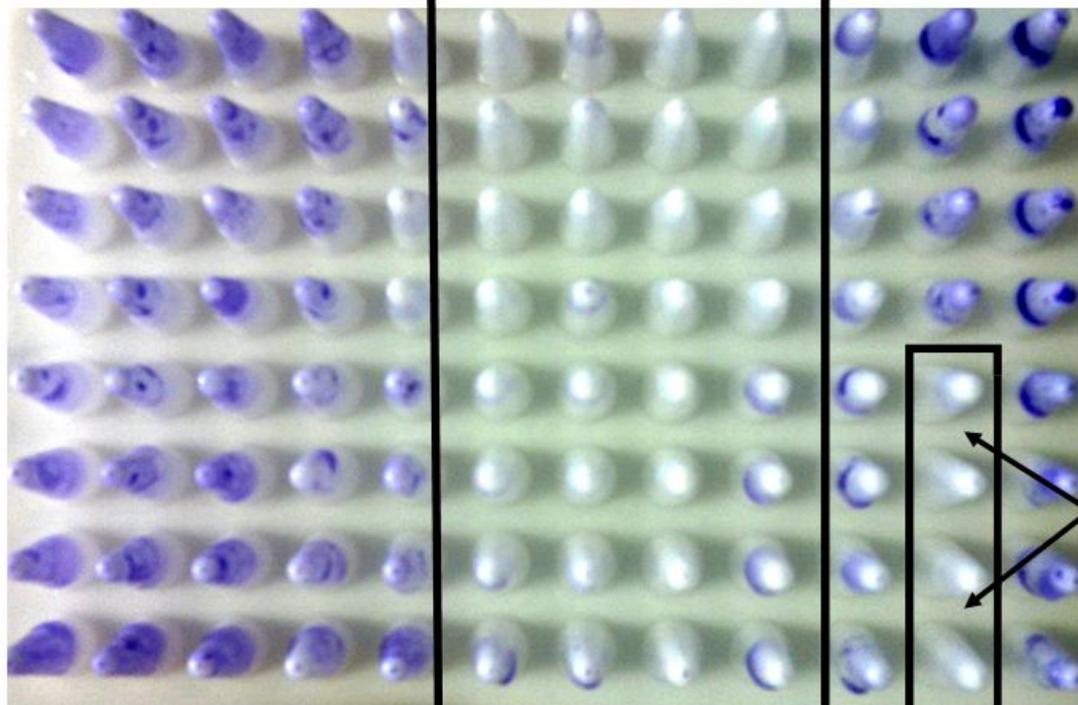


Fig. 1. PCR - microplate after growing biofilms and staining with crystal violet.

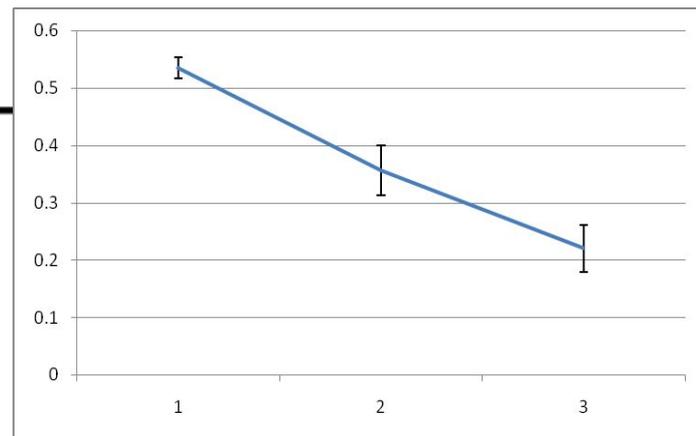
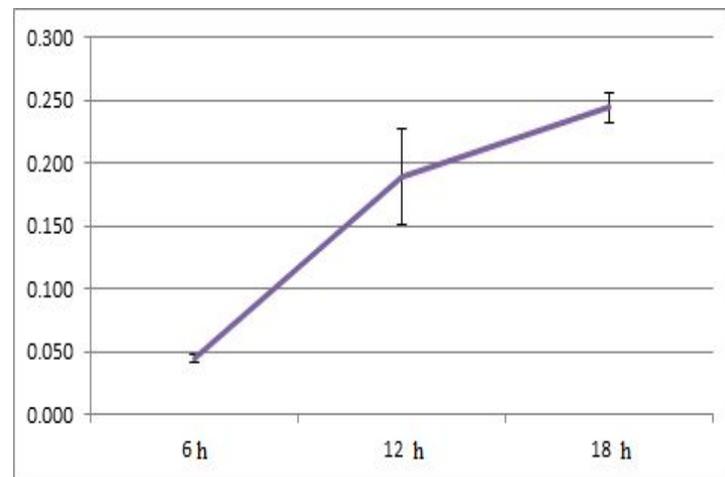


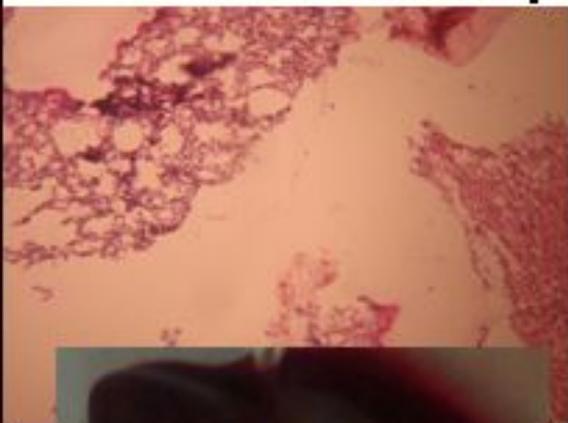
Figure 2 Change in optical density of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 biofilm in a test with crystal violet, OD450

Negative control



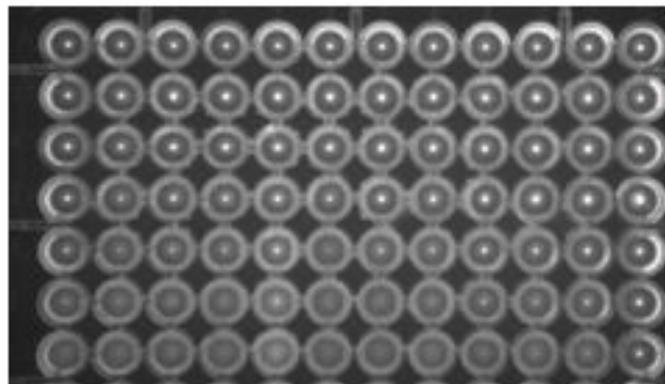
Biofilm growth dynamics, OD 450

Изучение новых проблем - создание новых рынков



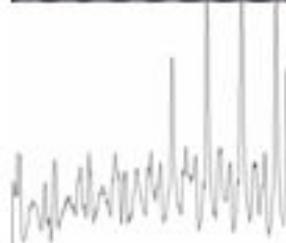
- Изменения в легких и селезенках у инфицированных мышей

1:512
1:256
1:128
1:64
1:32
1:16
1:8



▶ ОПЫТ

▶ КОНТРОЛЬ



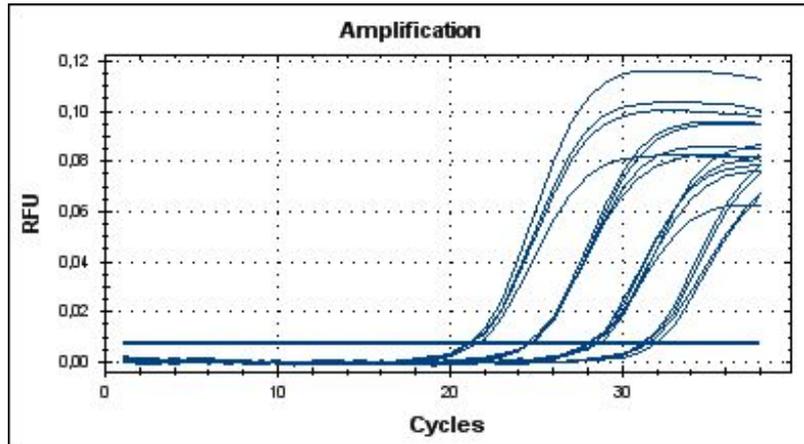
▶ -



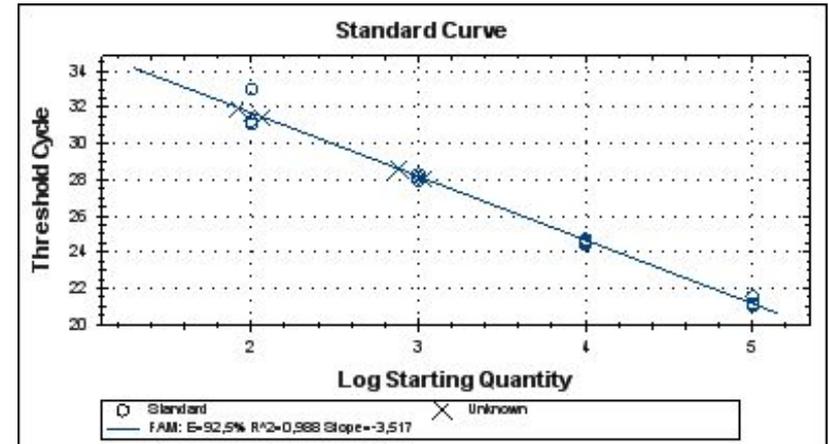
▶ +

Появление специфических антител в иммунофлуоресцентном варианте РА

ПЦР в режиме реального времени для детекции *Clostridium perfringens*

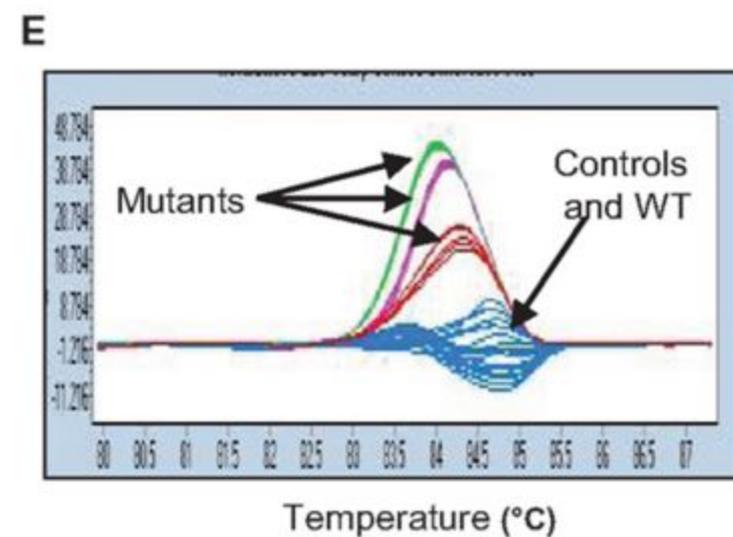
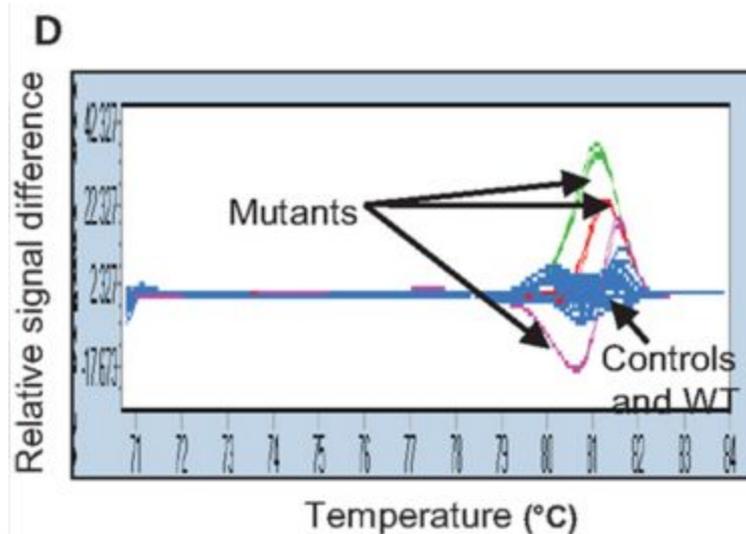


- Рисунок 1. Кинетика ПЦР в режиме реального времени при различных концентрациях геномной ДНК *C.perfringens*. Тесты поставлены в четырех повторностях и видно что реакция достаточно воспроизводима



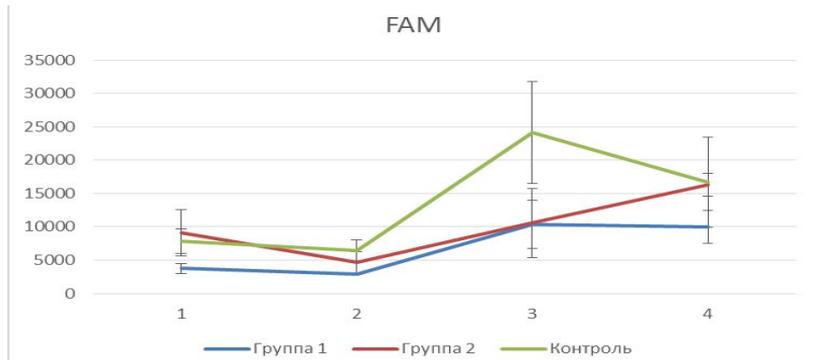
- Калибровочная кривая для ПЦР в режиме реального времени при различных концентрациях геномной ДНК *C.perfringens*. График характеризует возможность количественной оценки содержания клостридий в биоматериале и воспроизводимость таких исследований

Количественная ПЦР в ветеринарии, растениеводстве, животноводстве и селекции

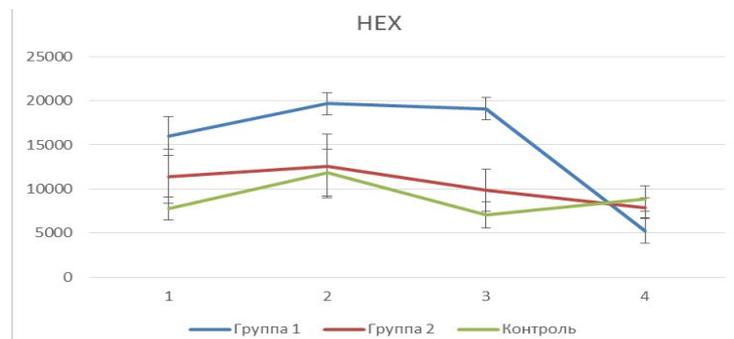


1. **Оценка биологических эффектов по изменению экспрессии целевых генов (кормление, фармакология, токсикология)**
2. **Изменение вирусной и бактериальной нагрузки**
3. **Выявление функционально-значимых мутаций (маркерная селекция)**
4. **Эпигенетика – изменение метилирования промоторов под действием кормления и т.д.**
5. **Верификация результатов GWAS**
6. **HRM!!!**

Использование реалтайм-амплификатора в режиме флуориметра

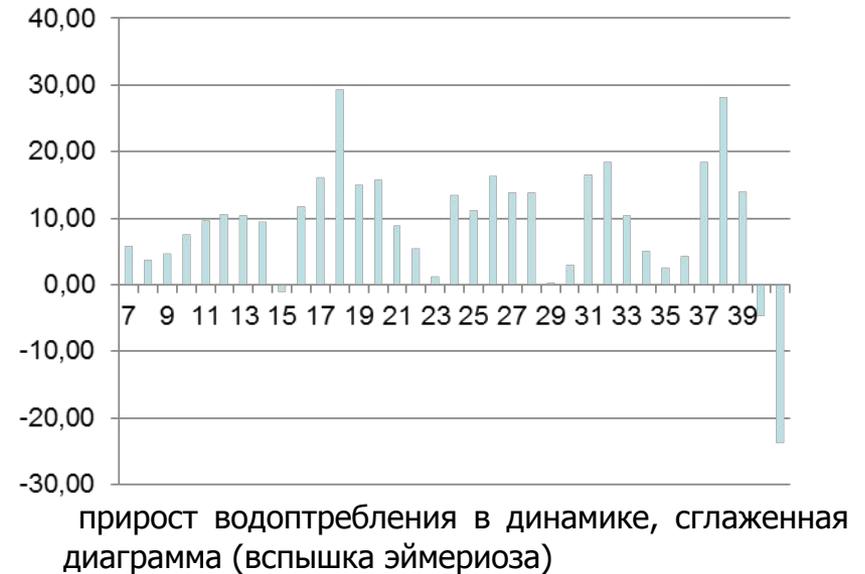
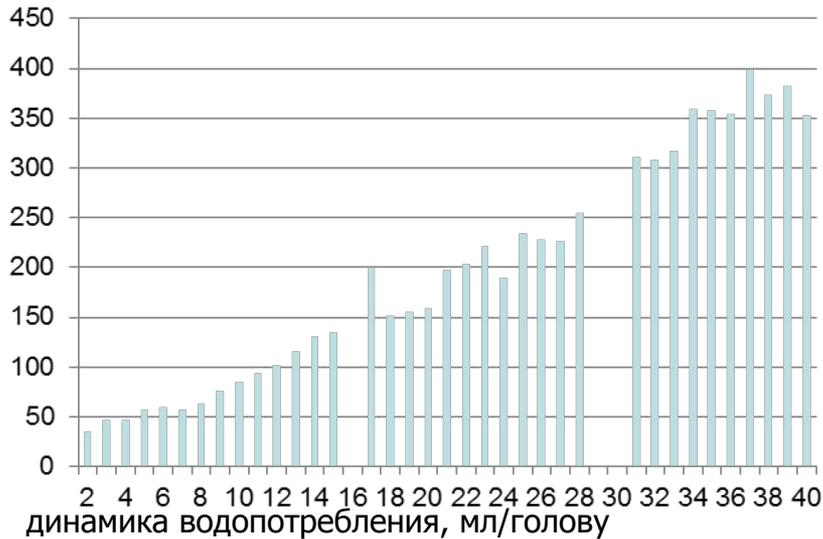


Измерение флуоресценции при помощи ПЦР амплификатора CFX (Bio-Rad) с использованием канала FAM. Примечание : 1 (2 часа опыта), 2- (3 часа), 3 – (4 часа) , 4 (5 часов).



Измерение флуоресценции при помощи ПЦР амплификатора CFX (Bio-Rad) с использованием канала HEX. Примечание : 1 (2 часа опыта), 2- (3 часа), 3 – (4 часа) , 4 (5 часов).

Оценка динамики прироста водопотребления – интегральный показатель воспалительных процессов в кишечнике?

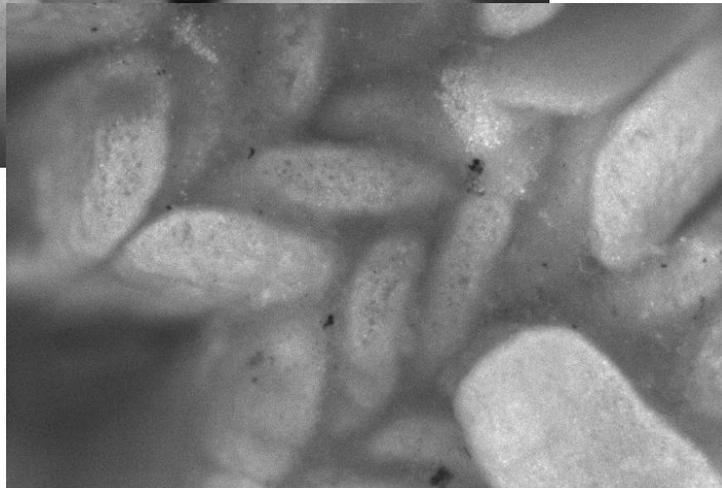
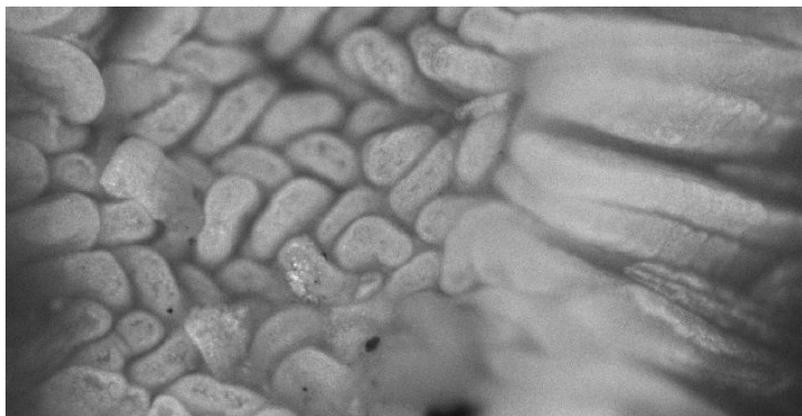


Проблемы с эймериозами в РФ

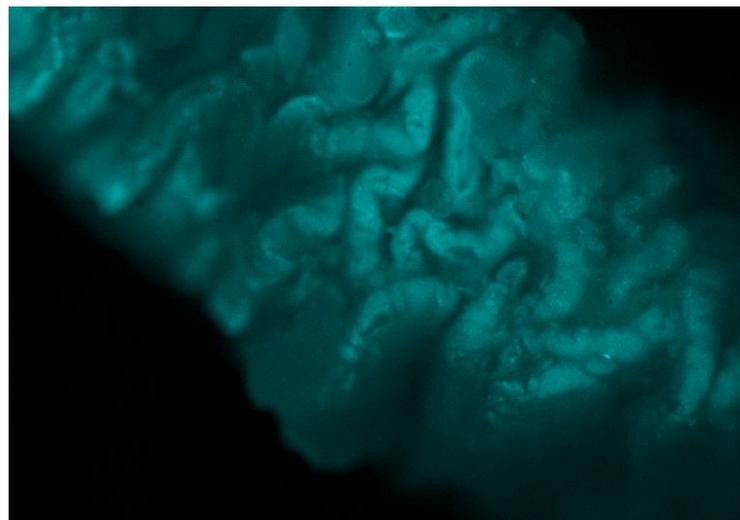
1. Риск восстановления патогенности вакцинных штаммов при использовании разных вакцинных штаммов
2. Развитие устойчивости к кокцидиостатикам
3. Эволюция в направлении роста интенсивности экссудативных процессов
4. Дифференциальная диагностика от бактериальных токсико-инфекций и вирусных энтеритов

Слизистая тощей кишки, вид сверху

НОРМА



ПАТОЛОГИЯ



строение

Таблица 1 – Размеры кишечных ворсин у цыплят-бройлеров, мкм.

Возраст	3 д.	12 д.	25 д.	27 д.	41 д.	48 д.
M	523,03	586,35	1154,16	898,15	1105,65	978,91
SD	81,89	275,65	86,74	531,79	388,34	515,14
m	12,95	104,18	30,98	137,3	91,53	137,68

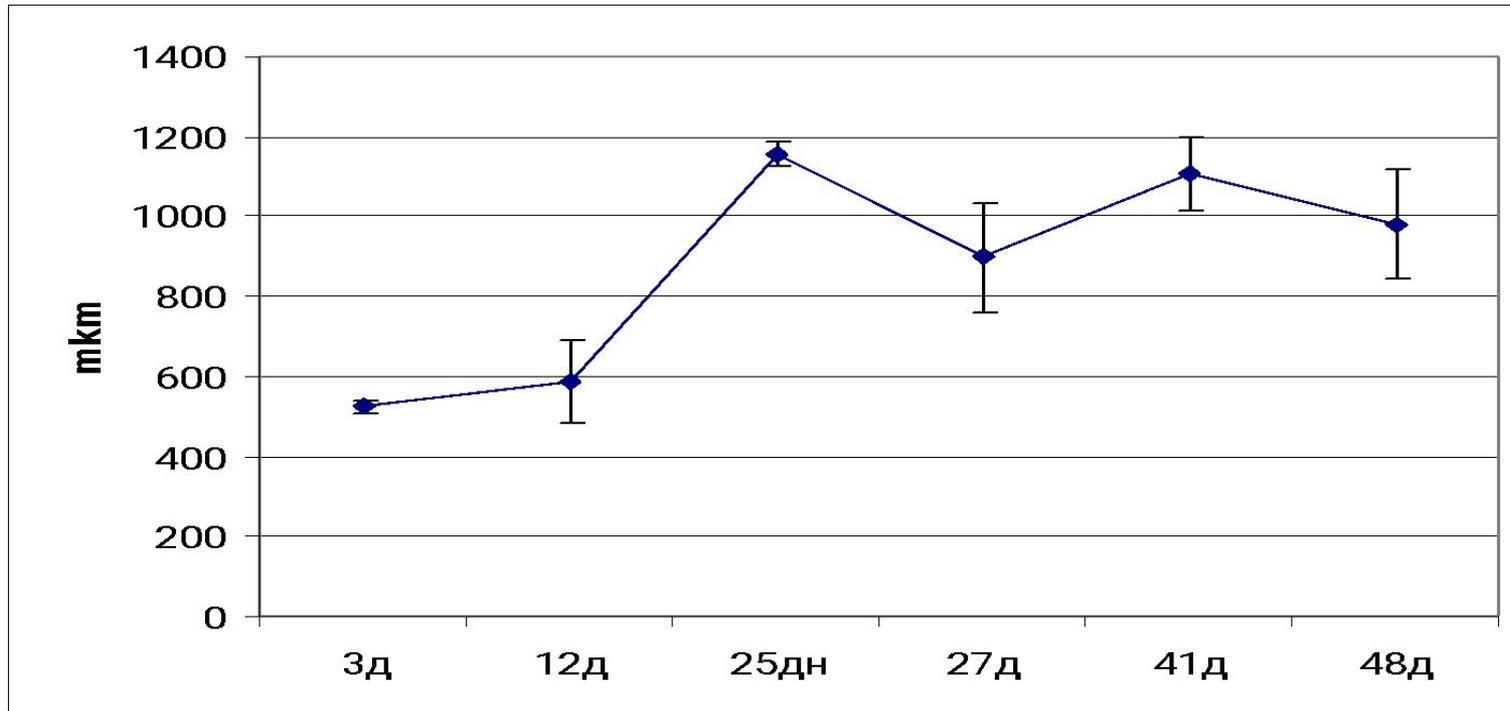
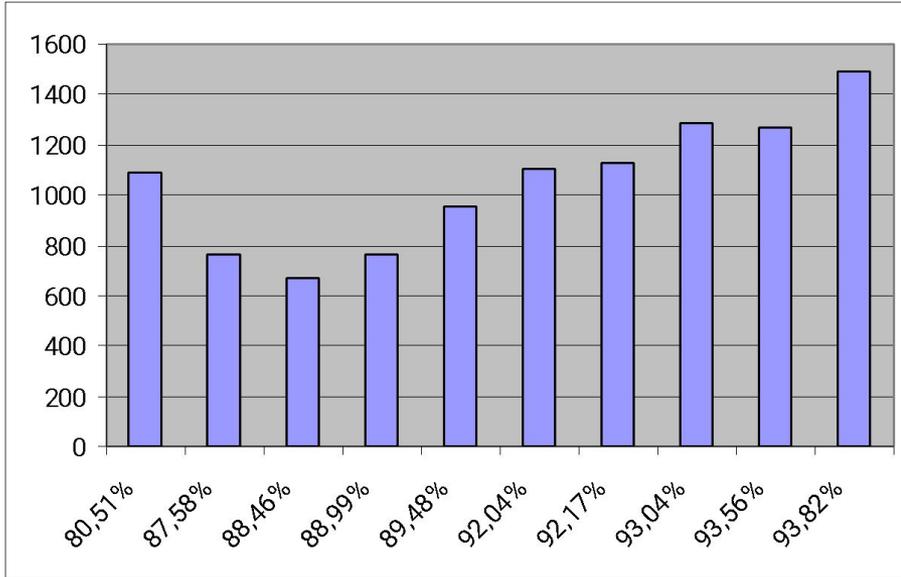


Рис.3 Динамика изменения длины ворсинок у цыплят бройлеров



Различия уровней антител (igM) к вирусу МПВИ в птичниках с разным уровнем смертности

Так как метапневмовирусная инфекция проявляется у бройлеров незадолго до убоя, то обнаружение антител класса igY(G) представляется проблематичным а их уровни в большей степени зависят не от вирусной нагрузки, а от времени контакта птицы с возбудителем

Разные варианты статистического анализа

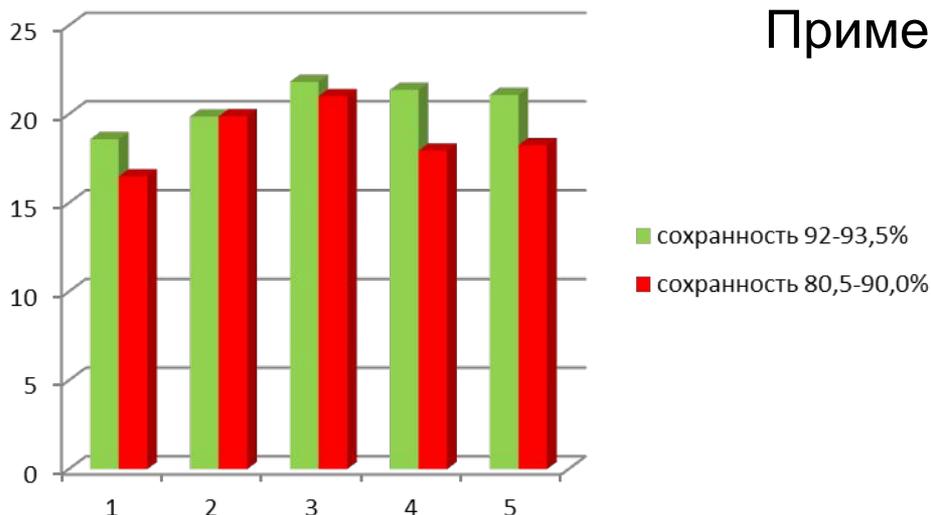
Параметр	Низкая сохранность	Высокая сохранность
M сохранность	87,00%	92,93%
M титры	849,6	1254,2
P (титры)=	0,0044128	
корреляция (по Пирсону)	0,491737	
корреляция (по Спирмену)	0.85	
Odds ratio (отношение шансов)	33.0000	P = 0.0460

Odds ratio (отношение шансов) можно рассчитать на этом сайте
https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php
Корреляцию по Спирмену можно рассчитать на этом сайте
<http://math.semestr.ru/corel/spirmen.php>

Большое количество птичников, в сочетании с отсутствием возможности пресекать циркуляцию инфекционных агентов методом пусто-занято, обеспечивают хорошую воспроизводимость инфекционных процессов, что позволяет экстраполировать данные с нескольких птичников на все остальное поголовье.

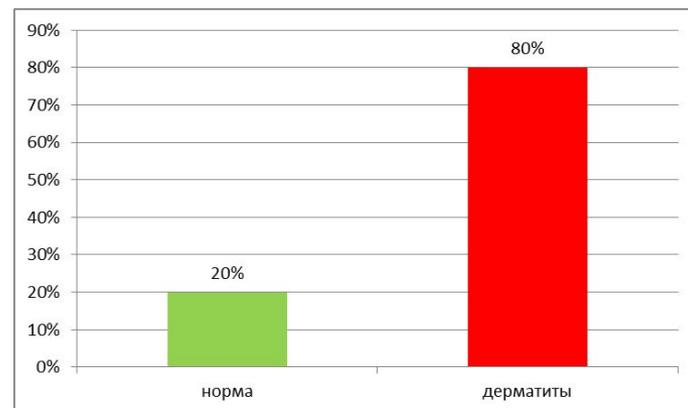
Эта же проблема позволяет одновременно отбирать образцы из птичников с разными показателями (сохранность, продуктивность) и сравнивать их по результатам лабораторных исследований.

- Таким образом, следует разделять серологические исследования (а также ПЦР и биохимии) на мониторинговые, скрининговые и ассоциативные.



• Рис. 1. Уровни альбумина в крови в двух группах птичников с наибольшей и наименьшей сохранностью. На фоне астровирусного нефрита цыплят

Примеры ассоциативных исследований

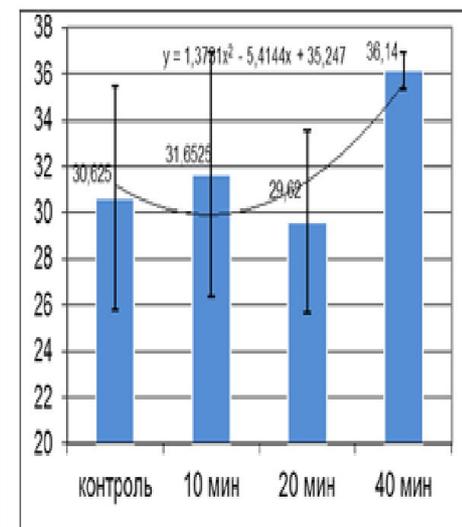
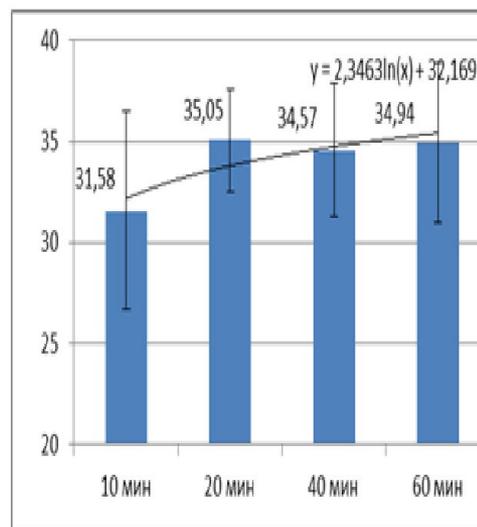


• Рис. 2. Инфицированность селезенки ВБМ у цыплят с дерматитами и без дерматитов

Испытание противовирусной эффективности препарата Тривирон на модели ИБК

Выживаемость цыплят при лечении «Тривироном» и в контрольной группе

группа	n	Па ло	Пневмо нии, %
Контроль (без лечения)	7	2	100%
Опытная группа, 10 минут экспозиции	6	1	66,6%
Опытная группа, 20 минут экспозиции	6	0	50%
Опытная группа, 40 минут экспозиции	5	0	40%
Опытная группа, 60 минут экспозиции	6	0	40%



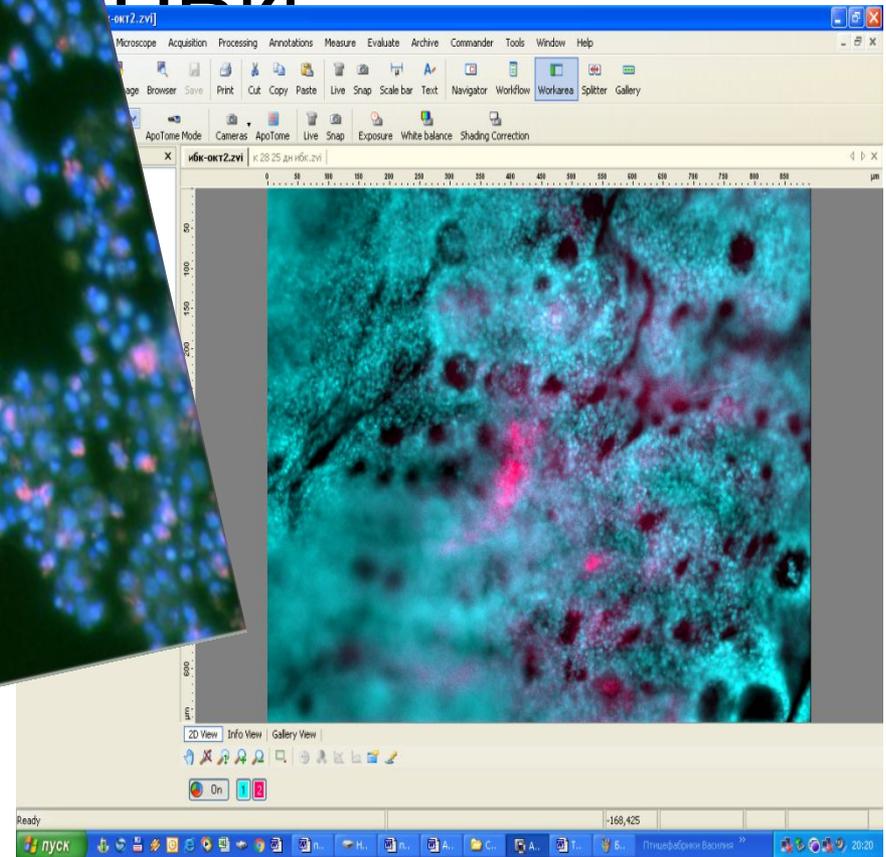
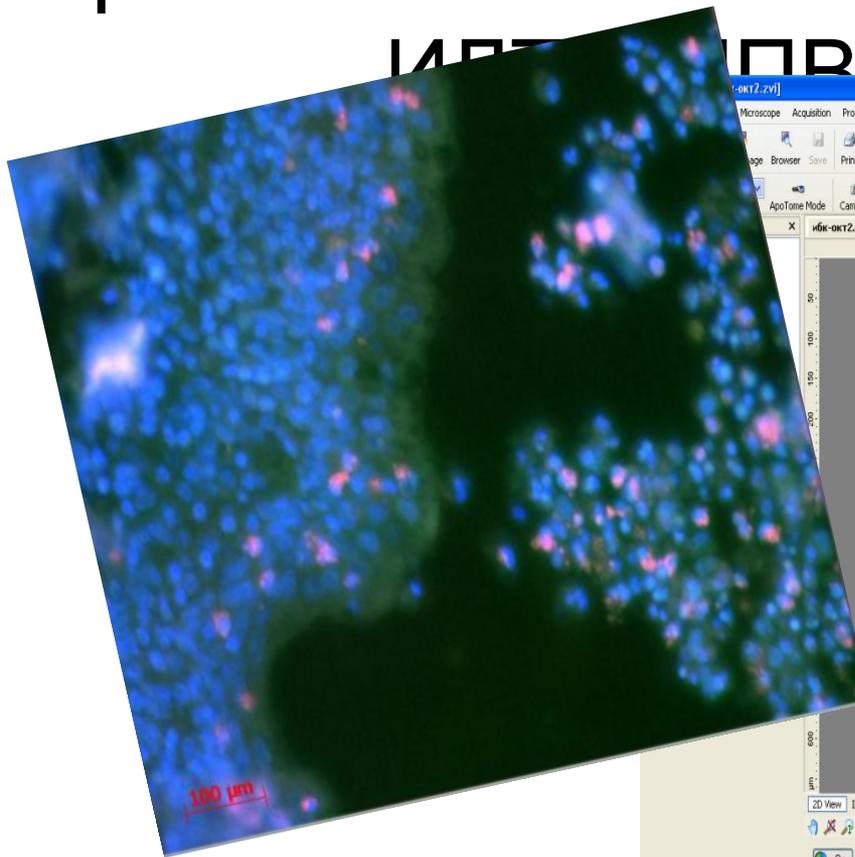
А

В

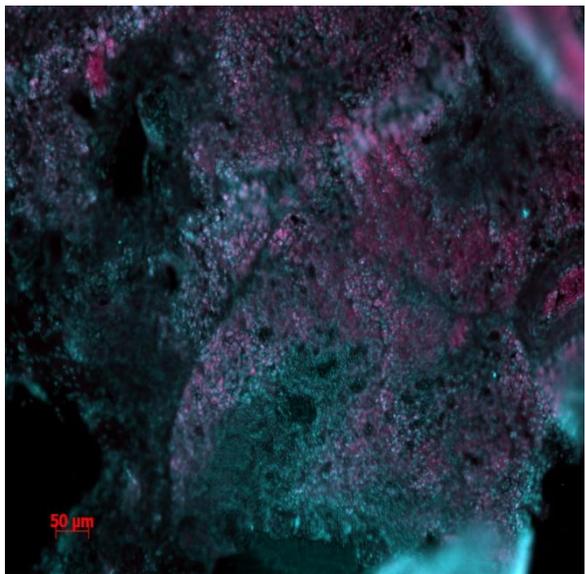
Изменение концентрации вируса ИБК в трахее (А), и бронхах (В) в зависимости от экспозиции $C_q \pm SD$
Примечание: чем больше C_q – тем меньше вируса

Профилактика ИБК – профилактика

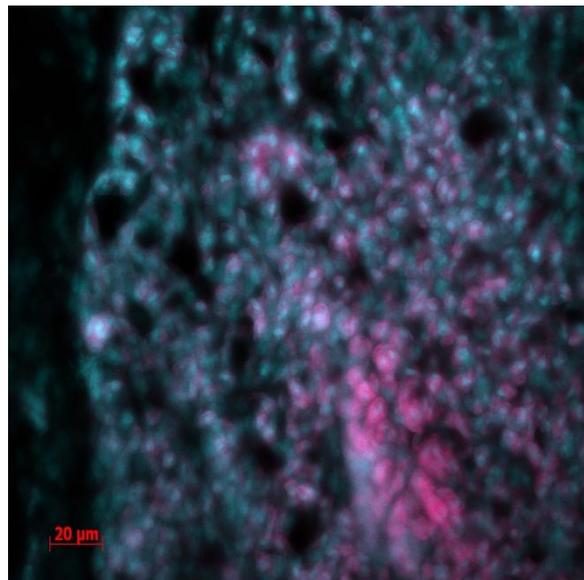
ИДТ ПВИ



Распределение антигена вируса ИБК по данным иммунофлюоресцентной микроскопии в опыте с аэрозольным применением «Тривирона»

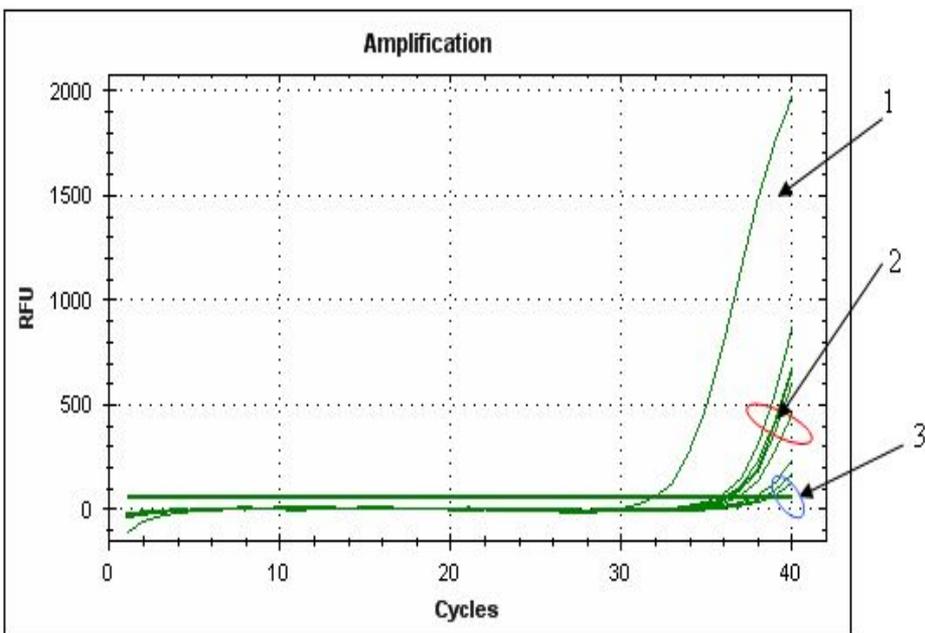


- 10 минут
ЭКСПОЗИЦИИ



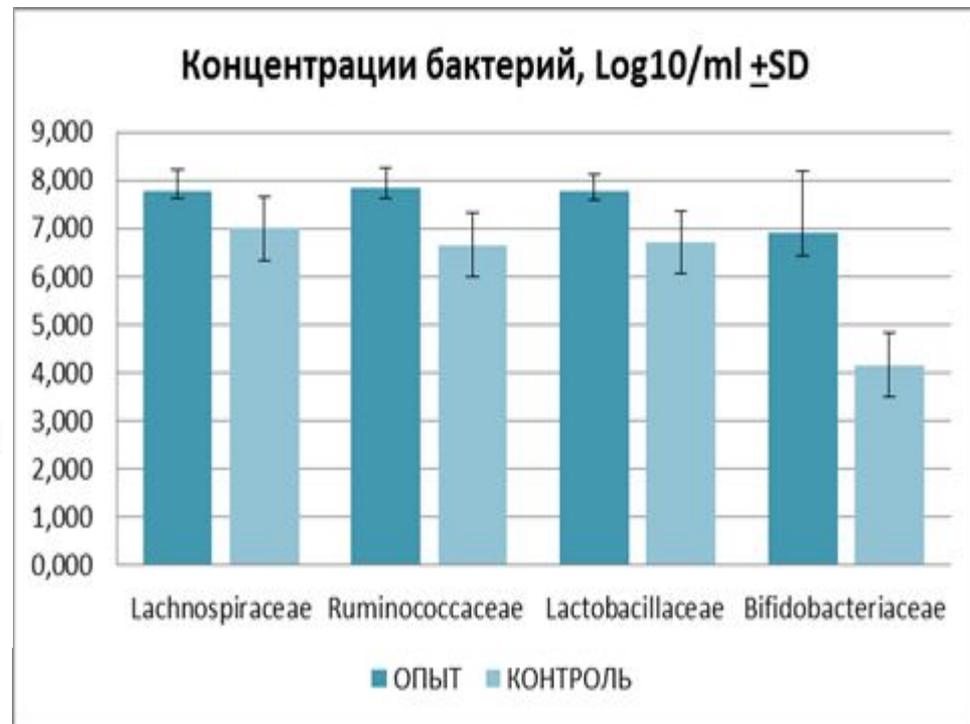
- 40 минут
ЭКСПОЗИЦИИ

Формирование микробиоты кишечника цыплят, "созревание слизистой кишечника" – почему это важно?



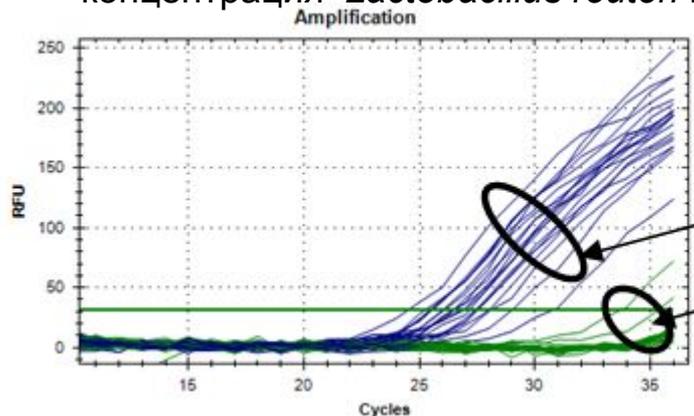
ПЦР в режиме реального времени на наличие вируса герпеса индеек FC126

Примечание: 1 контроль (исходный образец вакцины), 2- отрицательный контроль (разведенная вакцина без «Провагена»), 3-вакцина + «Проваген» в концентрации 8 Log₁₀ кое/мл. Чем раньше появляется сигнал на графике, тем больше вируса было в образце.



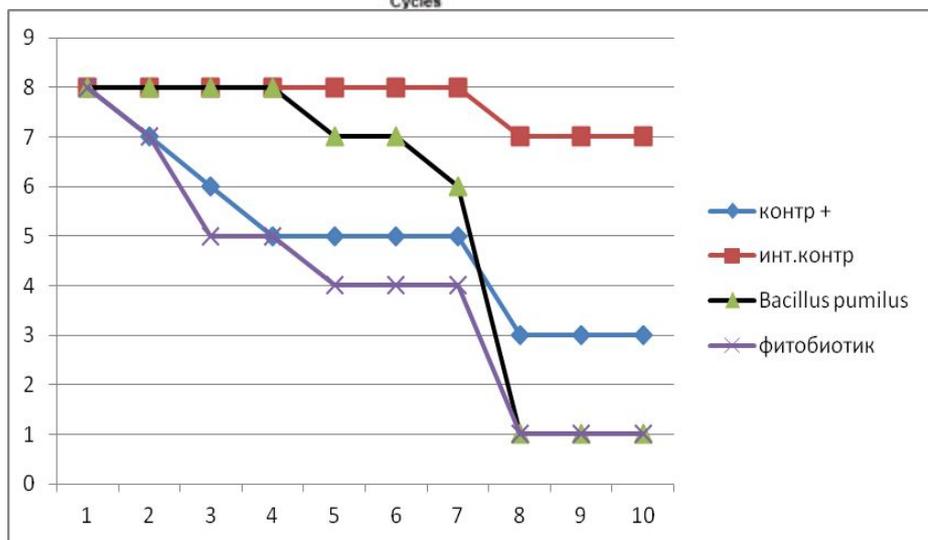
Концентрации микроорганизмов разных таксономических групп у цыплят (в возрасте 9 дн.) получавших "Проваген" и контрольной группы.

концентрация *Lactobacillus reuteri* Log10 GE/5 мкл у животных опытных и контрольной групп.

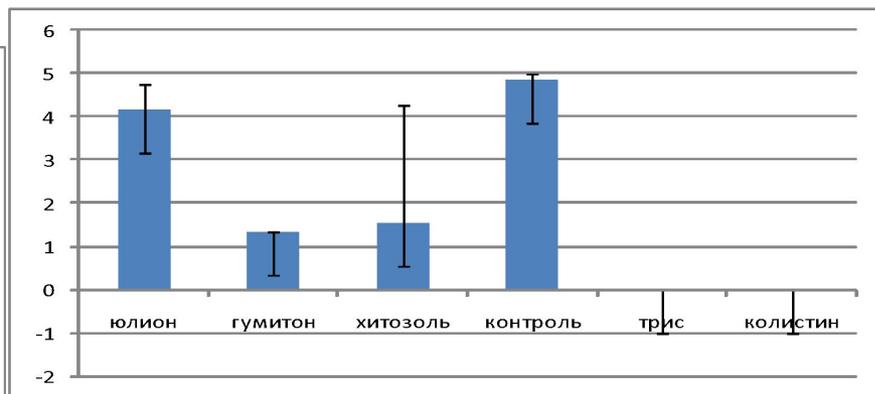


После использования колистина (синие линии)

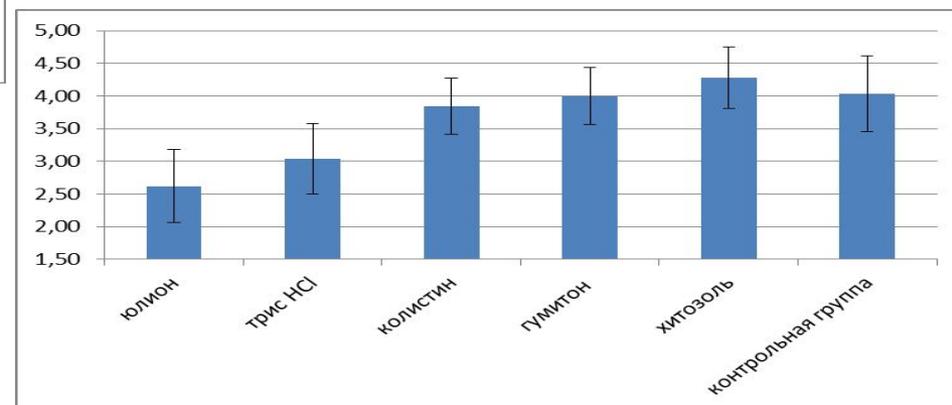
До применения колистина (зеленые линии)



Кривые выживания в группах получавших пробиотик и фитобиотик в сравнении с контрольными группами



Средние значения концентрации *E. coli*



концентрация *Lactobacillus reuteri* Log10 GE/5 мкл у животных опытных и контрольной групп.