

А. Поляков, У. Я. Уканов, Г. А. Веселкин. – М. : Агропромиздат, 1990. – С. 239. 8. Руководство по ветеринарной паразитологии : производственно-практическое издание / А. И. Ятусевич [и др.] ; ред.: В. Ф. Галат, А. И. Ятусевич. – Минск : Техноперспектива, 2007. – С. 3–5. 9. Арахнозентомозы домашних жвачных и однокопытных : монография / А. И. Ятусевич [и др.]. – Витебск : УО ВГАВМ, 2006. – С. 5. 10. Выращивание и болезни тропических животных : практическое пособие. Ч. 1 / А. И. Ятусевич [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2016. – 524 с. 11. Выращивание и болезни тропических животных : практическое пособие. Ч. 2 / А. И. Ятусевич [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2016. – 766 с.

Статья передана в печать 14.04.2018 г.

УДК 619:615.37

#### ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ДВУСПИРАЛЬНОЙ РНК И ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ

\*Красочко П.А., \*\*Борисовец Д.С., \*\*Ястребов А.С., \*Яромчик Я.П., \*\*Зуйкевич Т.А.,  
\*\*Войшнарович Н.И., \*\*Морозов А.М.

\*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

\*\*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

*Приведены результаты получения комплексного противовирусного препарата на основе двуспиральной РНК и липополисахаридов бактерий с использованием разных технологий изготовления. Ключевые слова: двуспиральная РНК, липополисахариды бактерий, технология получения, противовирусный препарат.*

#### PREPARATION OF A COMPLEX IMMUNOSTIMULATING ANTIVIRAL MEDICINE BASED ON THE DOUBLE-STRANDED RNA AND BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE

\*Krasochko P.A., \*\*Borisovetch D.S., \*\*Yastrebov A.S., \*Yaromchik Y.P., \*\*Zuikевич T.A.,  
\*\*Voichnarovich N.I., \*\*Morozov A.M.

\*Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

\*\*Institute of Experimental Veterinary named after S.N. Vishel'sky, Minsk, Republic of Belarus

*The article presents the results of producing preparation complex antiviral medicine based on double-stranded RNA and lipopolysaccharide bacterias using different production technology. Keywords: double-stranded RNA, lipopolysaccharides bacterias, technology of producing, antiviral medicine.*

**Введение.** В настоящее время достаточно остро стоит проблема борьбы с инфекционными пневмоэнтеритами молодняка сельскохозяйственных животных в животноводстве. Интенсивные технологии, на основе которых базируется современное животноводство, обуславливают снижение общей специфической и неспецифической резистентности организма животных. На этом фоне у животных, и особенно у молодняка, в массовых масштабах проявляются вирусные пневмоэнтериты, вызванные вирусом диареи, инфекционного ринотрахеита, рота- и коронавирусами, с последующим наслоением условно-патогенной микрофлоры, которые сопровождаются большими потерями в виде низкого уровня сохранности поголовья и прироста живой массы. Также значительно снижается эффективность проводимых в хозяйстве мероприятий по специфической профилактике [7, 8, 9].

Наличие значительного количества факторов вирулентности, генетической изменчивости, наличие сходных ферментов у эпизоотических штаммов возбудителей болезней обуславливают значительную сложность в диагностике, лечении и своевременной профилактике инфекционных болезней сельскохозяйственных животных.

Для практического применения научных разработок при конструировании и применении препаратов, обладающих антигенной и иммуногенной активностью, использования эффективных средств лечения и профилактики требуется изыскание новых подходов при создании лекарственных средств. К сожалению, универсальных средств, обладающих широким спектром противои инфекционного действия и высокой эффективностью для лечения и профилактики этих заболеваний, нет. Используемые антибиотики широкого спектра не позволяют достичь желаемых результатов, так как их применение приводит к появлению лекарственно устойчивых форм бактерий. Наблюдается тенденция роста множественной лекарственной устойчивости бактерий. Устойчивость к пенициллинам патогенных штаммов бактерий, колонизирующих желудочно-кишечный тракт, достигает 42,7-57,6%, аминогликозидов – 7,8-100,0%, фторхинолонов – 56,1-80,0%, тетрациклинов – 14,8-81,5%, рифампицинов – 7,4-85,2% [8, 11].

Все большую актуальность приобретают стимуляторы системы неспецифической резистентности, к которым относятся интерферон и индукторы интерферона синтетического и природного происхождения [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Однако, основным недостатком препаратов интерферона является их видоспецифичность и высокая стоимость. Перспективным в данном направлении является разработка индукторов интерферона, которые

представляют собой отдельный класс высоко- и низкомолекулярных соединений, способных запускать систему интерферона за счет синтеза в клетках эндогенных интерферонов [3].

При этом среди данной группы препаратов наиболее высокой активностью обладают препараты на основе дуспиральной РНК (дсРНК), которые стимулируют выработку эндогенного интерферона, не вызывают побочных эффектов и выделяются из экологически безопасного продуцента, что отвечает современным требованиям, предъявляемым к фармакологическим препаратам. Учитывая остроту проблемы, связанную с ассоциативными инфекционными заболеваниями животных, представляется перспективным разработка эффективных средств на основе дсРНК [3, 5, 6].

Исходя из вышеизложенного, актуальной задачей в настоящее время является создание комплексного противовирусного препарата на основе индуктора интерферона, позволяющего предотвратить вирусную инфекцию за счет выработки интерферона, а также создать защиту организма против наслонившейся бактериальной микрофлоры путем стимуляции клеточного иммунитета за счет увеличения количества лейкоцитов и их фагоцитарной активности.

В связи с этим мы задались целью сконструировать противовирусный иммуностимулирующий препарат на основе дсРНК и липополисахаридов бактерий для комплексной терапии и профилактики, ассоциированных пневмоэнтеритов молодняка сельскохозяйственных животных и испытать его эффективность в лабораторных условиях.

**Материалы и методы исследований.** Работа выполнялась на базе РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» отдела вирусных инфекций и в лаборатории кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины».

ДсРНК получали из дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*, используя метод (технология № 1) с применением 0,1%-ного пергидроля, протосубтилина, хлористого кальция и хлористого натрия.

Для этого дрожжи в количестве 100,0 г суспендировали в 100 см<sup>3</sup> дистиллированной деионизированной воды, вносили 0,1% пергидроля и 3,4 г хлорида натрия, устанавливали температуру плюс 40–45°C, перемешивали суспензию в течение 20 минут. Доводили рН до 8,5–9,0 с помощью едкого натрия, затем нагревали до температуры плюс 85–90°C в течение 30 минут на магнитной мешалке, охлаждали и путем центрифугирования осаждали клеточный субстрат. Затем рН надосадочной жидкости доводили до 6,9–7,2, вносили фермент протосубтилин из расчета 0,05% и перемешивали в течение 60 мин. при плюс 50°C. После этого снижали рН до 4,0, нагревали при плюс 85–90°C в течение 10 минут, охлаждали до температуры 18–25°C, вносили хлористый кальций (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) из расчета 3,762 г на объем надосадочной жидкости и перемешивали в течение 80 минут.

Затем рН раствора снижали до 1,5 с помощью соляной кислоты. При этом происходила коагуляция и быстрое осаждение РНК. Раствор декантировали, использовали осадок, в который вносили дистиллированную воду в объеме 100 см<sup>3</sup> и 2,2 г хлористого натрия, доводили рН до 4,9–5,1, перемешивали при комнатной температуре 10–20 минут, доводили рН до 6,0–6,2 и температуру до плюс 40–45°C, перемешивали раствор до полного растворения осадка, затем нагревали в течение 3–5 минут до плюс 78–80°C и охлаждали до плюс 30–40°C. В раствор вносили 50 об. % ацетона, активированный уголь в количестве 0,5% от объема водной части раствора, перемешивали в течение 20 минут и фильтровали. Получали прозрачный раствор нуклеиновой кислоты натрия, который охлаждали до 2–5°C и вносили ацетон в соотношении 1:1, охлажденный до такой же температуры. Не ранее чем через 30 минут образовавшийся осадок отделяли от раствора, промывали спиртом и ацетоном, высушивали при температуре плюс 20–25°C до удаления паров ацетона, затем в сушильном шкафу при температуре плюс 36–40°C.

Так же нами был апробирован альтернативный метод получения дсРНК (технология № 2), основанный на разрушении клеток дрожжей при помощи растворителя (хлороформа) и детергента (додецилсульфата натрия).

На первом этапе данного метода получения дсРНК для разрушения дрожжевых клеток и удаления из экстракта липидного и частично белкового материала клеточную массу суспендировали в буфере (10 мМ трис, 20 мМ ЭДТА, 0,5 М NaCl, рН 7,4) из расчета 2 мл раствора на 1 г клеток при плюс 20°C, делили на аликвоты, добавляли додецилсульфат натрия до 0,5%, перемешивали в течение 20 минут при плюс 20°C и добавляли хлороформ до 25%, снова перемешивали при тех же режимах, не допуская пенообразования.

По истечении времени лизиса пробу центрифугировали при 6000 об./мин. в течение 20 мин., отбирали водную фазу и добавляли дополнительно додецилсульфата натрия до 0,5%. Пробу вновь тщательно перемешивали в течение 20 минут при плюс 4°C, не допуская пенообразования, и центрифугировали при 6000 об./мин. в течение 20 мин.

Для очистки дсРНК от белков и оцРНК, удаления из раствора додецилсульфата натрия и следов хлороформа к лизату клеток добавляли сухой ПЭГ-6000 до 10%, перемешивали 20 минут до полного растворения, выдерживали 5 ч при плюс 6°C для формирования осадка и центрифугировали 20 мин. при 6000 об./мин. Полученный после концентрирования осадок растворяли в воде.

С целью очистки дсРНК от оцРНК и удаления ПЭГ к полученному водному раствору добавляли охлажденный раствор LiCl (2М), перемешивали и выдерживали 5 ч при плюс 6°C для формирования осадка, затем центрифугировали 20 мин. при 6000 об./мин., а затем осуществляли сбор водной фазы.

Осаждение дсРНК производили в 3,5 М растворе LiCl, выдерживали 5 ч при 4°C, затем центрифугировали 20 мин. при 6000 об./мин. Полученный осадок дсРНК растворяли в воде.

Для удаления солей и «следовых» количеств додецилсульфата натрия проводили осаждение дсРНК в 50%-ном растворе этанола.

Эффективность использованных методов оценивали по выходу дсРНК в полученных образцах, который определяли методом горизонтального электрофореза.

Липополисахариды (ЛПС) бактериальной стенки штамма бактерий *Bac. licheniformis* получали методом щелочного гидролиза бактерий 1%-ным раствором гидроксида натрия.

Предварительно проводили накопление бактериальной массы *Bac. licheniformis* на питательной среде с добавлением мелассы свекловичной и глюкозы.

Для получения ЛПС вносили сухой порошок гидроксида натрия из расчета 10 г порошка на 1 дм<sup>3</sup> бактериальной суспензии, растворяли перемешиванием с последующим кипячением при 100°C в течение 50-60 минут. После остывания гидролизат бактерий центрифугировали при 5300 об./мин. в течение 10 минут, осадок удаляли, в работе использовали надосадочную жидкость, которая была подвергнута осветляющей фильтрации через фильтр с размерами пор 450 мкм. После фильтрации к надосадку добавляли 10%-ный раствор соляной кислоты до значения pH 4,5-5,0.

**Результаты исследований.** Результаты получения дсРНК при использовании нескольких технологий ее выделения представлены в таблице.

**Таблица - Выход дсРНК при использовании различных технологий ее выделения из дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae***

№ п/п	Технология получения дсРНК	Выход дсРНК*, %
1	Технология № 1 (с применением 0,1% пергидроля, протосубтилина, хлористого кальция и хлористого натрия)	78±3
2	Технология № 2 (с применением растворителя (хлороформа) и детергента (додецилсульфата натрия))	91±3

*Примечание.\* - сравнительное процентное содержание в образцах.*

По результатам проведенных исследований, представленных в таблице, установили, что выход дсРНК из 1 гр. клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при использовании технологии № 2 составлял не менее 91% от ее исходного содержания – 0,8-0,9 мг в 1 гр. клеток, что на 13% выше в сравнении с технологией № 1.

При изготовлении комплексного иммуностимулирующего противовирусного препарата концентрацию дсРНК до 4 мг/см<sup>3</sup> создавали также с использованием физиологического раствора хлорида натрия.

Концентрацию выделенных ЛПС штамма бацилл, после определения массы сухого вещества, в последующем доводили стерильным физиологическим раствором хлорида натрия до 1 мг/см<sup>3</sup>.

Для дальнейших исследований сконструированы лабораторные образцы комплексного иммуностимулирующего противовирусного препарата с соотношением компонентов дсРНК и ЛПС: 1:1; 1:2 и 2:1.

**Заключение.** Исходя из проведенных нами исследований, можно сделать вывод, что отработанная нами технология извлечения дсРНК из дрожжевых клеток с применением растворителя (хлороформа) и детергента (додецилсульфата натрия) позволяет получить не менее 91% от исходного содержания дсРНК.

По результатам проведенной работы отработана технология получения липополисахаридов бактериальной стенки штамма бактерий *Bac. licheniformis* путем применения метода щелочного гидролиза бактерий 1%-ным раствором гидроксида натрия.

Получены лабораторные образцы комплексного иммуностимулирующего противовирусного препарата с разным соотношением компонентов дсРНК и ЛПС.

**Литература.** 1. Антонова, А. Н. Изучение видового состава и чувствительности к антибиотикам бактерий, выделенных при дисбактериозах кишечника молодняка сельскохозяйственных животных / А. Н. Антонова, Е. М. Левченко // Разработка инновационных инструментальных методов исследования внутренних болезней животных. – Москва : ИК МГУПТ, 2015. – С. 19–23. 2. Использование адаптогенов природного происхождения при совершенствовании технологии выращивания телят / Д. С. Борисовец [и др.] // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сборник научных трудов / Гродненский государственный аграрный университет / редкол.: В. К. Пестис [и др.]. – Гродно : ГГАУ, 2017. – Т. 36. – С. 27–32. 3. Лукьянова, И. А. Применение иммуностимуляторов вестин и провекст для профилактики вирусных респираторных инфекций / И. А. Лукьянова, В. И. Плешакова, В. С. Власенко // Ветеринария Кубани. – 2012. – № 4. – С. 7–9. 4. Масычева, В. И. Индукторы интерферона: производство и применение продуктов микробиологических производств / В. И. Масычева, Е. Н. Морозова. – Москва : ВНИИСЭНТИ, 1990. – 21 с. 5. Повышение эффективности вакцинации свиней против РРСС с использованием стимулятора иммунитета / А. С. Ястребов [и др.] // Современные инновационные подходы к решению актуальных ветеринарных проблем в животноводстве : материалы Международной научно-практической конференции, г. Омск, 23 марта 2017 г. / ФГБОУ ВО Омский ГАУ ; ред.кол. : В. И. Плешакова (гл. ред.) [и др.]. – Омск : ФГБОУ ВО Омский ГАУ, 2017. – С. 349–355. 6. Середа, А. Д. Иммуностимуляторы. Классификация, характеристика, область применения / А. Д. Середа, В. С. Кропотков, М. М. Зубанров // Сельскохозяйственная биология. – 2001. – № 4. – С. 83–92. 7. Хантов, Р. М. Современные иммуностимуляторы. Классификация. Механизм действия / Р. М. Хантов, Б. В. Пинегин. – Москва : Фармарус принт, 2005. – С. 27. 8. Яромчик, Я. П. Ситуация по вирусной диарее и ротавирусной инфекции телят в Республике Беларусь / Я. П. Яромчик, Д. С. Борисовец // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства : материалы VI Международной научно-практической конференции, г. Витебск, 22-23 мая 2008 г. – Витебск : ВГАВМ, 2008. – С. 45. 9. Яромчик, Я. П. Специфи-

ческая профилактика ротавирусной инфекции и колибактериоза крупного рогатого скота : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 06.02.02 / Я. П. Яромчик ; Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского. – Минск, 2010. – 24 с. 10. Kneyber, M. Treatment and prevention of respiratory virus infection / M. Kneyber, H. Moll, R. Groot // Eur. J. Pediatr. – 2000. – Vol. 159 (6). – P. 399–411. 11. Antimicrobial therapy for wound infected after catastrophic earthquakes / I. N. Mishkin [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2010. – Vol. 363. – P. 2571–2573.

Статья передана в печать 29.03.2018 г.

УДК 619:579.842.14

## ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ БАКМАССЫ САЛЬМОНЕЛЛ ПРИ ИХ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Медведев А.П., Вербицкий А.А., Асташонок Ю.О., Огурцова К.А.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

В статье показана динамика накопления бакмассы сальмонелл при их глубинном культивировании, что является основанием для целенаправленной корректировки этого процесса. **Ключевые слова:** сальмонеллы, выживаемость, рост, концентрация, фазы роста, реактор, культивирование, серотип, динамика.

## THE DYNAMICS OF SALMONELLA ACCUMULATION DURING IN-DEPTH CULTIVATION

Medvedev A.P., Viarbitski A.A., Astaschonok Y.O., Ogurchova K.A.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

The article presents information on dynamics of in-depth accumulation of salmonella bionmass that serves as ground for optimization of this process. **Keywords:** salmonella, viability, growth, concentration, growth phase, reactor, cultivation, serotype, dynamics.

**Введение.** Впервые глубинный метод выращивания патогенных бактерий был апробирован Н.Е. Лебедевым (1950). Автор доказал возможность культивирования бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в реакторах с применением принудительной аэрации растущей культуры и ее перемешивания [12, 18].

Использование метода глубинного культивирования явилось революционным достижением в биологии. Метод дал возможность наращивать большое количество биомассы за короткий промежуток времени и тем самым поставил производство биопрепаратов на промышленные рельсы [12, 14, 15, 16].

В условиях производства выращивание патогенов, как правило, осуществляется в жидкой питательной среде в реакторах с использованием периодического способа культивирования. Динамику роста бактерий и их размножение при периодическом культивировании подразделяют на несколько фаз: лаг-фазу, логарифмического роста, фазу стационарного роста и гибели бактерий [1, 4, 5].

Известно, что количество жизнеспособных клеток при периодическом культивировании не остается постоянным, а значительно варьирует в зависимости от фаз роста и длительности выращивания.

В лаг-фазе число клеток остается постоянным ввиду отсутствия клеточного деления, которое начинается в первой половине фазы логарифмического роста. Для большинства бактерий длительность этой фазы, как впрочем, и других фаз, составляет примерно четыре часа. Состояние бактериальных клеток позволяет оценивать эту фазу как период приспособления, адаптации бактерий к питательной среде. Продолжительность этого периода зависит от возраста засеваемой культуры, количества посевного материала, состава среды, условий культивирования [3, 5].

Логарифмическая или экспоненциальная фаза характеризуется максимальной скоростью деления клеток. Продолжительность генерации в этой фазе различна для разных видов бактерий. Например, для сальмонелл она равна 20–30 минут, кишечной палочки – 15–17 минут, стафилококков – 25–35 минут, туберкулезной палочки – 19–20 часов.

Стационарная фаза характеризуется постоянством концентрации микробных клеток в среде, что объясняется равновесием скорости размножения и отмирания бактерий [16, 17].

В фазе гибели бактерий число погибших микроорганизмов нарастает в связи с истощением питательной среды, накоплением продуктов метаболизма, что ведет к потере способности к размножению и росту клеток [12, 18].

При периодическом культивировании в экспоненциальной фазе роста микроорганизмам присуще нормальное функциональное состояние. Однако в этой фазе культуры менее устойчивы к воздействию различных факторов: повышенной температуре, изменению pH, ионизирующему облучению и др. [5].

В стационарной фазе происходит истощение питательной среды, накопление продуктов метаболизма, что вызывает остановку роста, бактерии переходят в состояние покоя, снижается их физиологическая активность, утрачивается ряд ферментов, уменьшаются размеры и уплотняются оболочки клеток. Снижение физиологической активности бактерий сопровождается повышением их устойчивости к воздействию внешних неблагоприятных факторов [5].

Глубинное культивирование, по сравнению со статистическим и поверхностным, ускоряет рост и раз-