

УДК 619:616.98:578.833.3-085.371

КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА «НУКЛЕОЗАН» И ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ТЕЛЯТ С ПОРАЖЕНИЕМ ОРГАНОВ ПИЩЕВАРЕНИЯ

****Красочко П.А., *Борисовец Д.С., *Ястребов А.С., *Толяронок Г.Е., *Морозов А.М., *Зуйкевич Т.А., **Яромчик Я.П.**

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

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

*Приведена технология конструирования комплексного иммуностимулирующего препарата и определен его оптимальный состав. Использование комплексного иммуностимулирующего препарата «Нуклеозан» при вирусно-бактериальных энтеритах телят позволяет снизить длительность течения болезни на 3,1 дня и уменьшить количество повторно заболевших телят на 25,5%. **Ключевые слова:** телята, инфекционные энтериты, интерферон, липополисахариды бактерий.*

CONSTRUCTION IMMUNOSTIMULATED MEDICINE «NUCLEOSAN» AND ITS EFFECTIVENESS IN TREATMENT OF CALVES WITH DIFEAT OF THE DIGESTIVE TRACT

****Krasochko P.A., *Borisovets D.S., *Yastrebov A.S., *Tolyaronok G.E., *Morozov A.M., *Zuykevich T.A., **Yaromchik Y.P.**

*RUE «Institute of Experimental Veterinary Medicine named after S. N. Vyshellessky»,
Minsk, Republic of Belarus

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

*The technology of constructing a complex immunostimulating medicine is described and also its optimal composition is determined. The use of the complex immunostimulating medicine «Nucleosan» for cure viral-bacterial enteritis of calves allows to reduce the duration of the disease by 3,1 days and to reduce the number of sick calves by 25,5%. **Keywords:** calves, infectious enteritis, interferon, bacterial lipopolysaccharides.*

Введение. Факторные болезни молодняка крупного рогатого скота инфекционной этиологии широко распространены в странах с развитой отраслью молочного и мясного животноводства и причиняют значимый экономический ущерб сельскохозяйственным организациям за счет непроизводительного выбытия молодняка, а также и затрат, связанных на проводимые меры борьбы по ликвидации регистрируемых инфекционных патологий и потерь генетического потенциала у получаемого приплода после переболевания [4, 5, 8, 16].

Чаще всего у телят первых дней жизни диагностируют болезни, протекающие с признаками поражения желудочно-кишечного тракта вирусной и бактериальной этиологии. В этиопатогенезе инфекционной патологии органов пищеварительной системы молодняка крупного рогатого скота особое распространение получили такие болезни вирусно-бактериальной этиологии, как рота- и коронавирусная инфекция, вирусная диарея крупного рогатого скота, эшерихиоз, протейная инфекция и клебсиеллез. Указанные болезни чаще всего протекают в ассоциации, что обуславливает более тяжелое течение и высокий процент летальности. Сопутствующими факторами, способствующими их возникновению, являются нарушения микробиоценоза кишечника на фоне неполноценности рационов и требований, предъявляемых к микроклимату в помещениях для содержания молодняка сельскохозяйственных животных [2, 5, 7, 8, 16].

Значимую роль в распространении и стационарности факторных болезней телят первых дней жизни в качестве постоянного источника возбудителя инфекции выполняют вирус- и бактерионосители остальных половозрастных групп скота. Доказана трансплацентарная передача возбудителей инфекции вирусной этиологии [4, 5, 8].

Для лечения болезней органов пищеварения у молодняка домашних животных в хозяйствах широко применяются антимикробные препараты, которые не всегда позволяют получить высокие результаты от их использования, что связано с появлением микроорганизмов, приобретающих устойчивость к ряду химиотерапевтических препаратов. Бессистемное применение антибиотиков приводит к появлению циркуляции антибиотикорезистентных форм патогенных микроорганизмов, а также к ограничениям на получаемую продукцию. В этой связи у практикующих ветеринарных врачей возникает потребность использовать высокоэффективные биологические препараты, которые позволяют активировать статус иммунной системы и общей резистентности организма, обладают высокой терапевтической эффективностью и не имеют ограничений на использование получаемой продукции при их применении [1, 5, 6, 10, 13, 14].

В последнее время все чаще появляются сообщения о высоких показателях лечебной эффективности препаратов интерферона и индукторов интерферона. Одним из таких препара-

тов является двуспиральная РНК (дсРНК), обладающая антивирусным и иммуностимулирующим действием [1, 3, 6, 9, 11, 15].

Нами разработана технология изготовления комплексного иммуностимулирующего препарата на основе индуктора интерферона на основе дсРНК и липополисахаридов бактерий, проведены испытания его терапевтической и профилактической эффективности при лечении энтеритов вирусно-бактериальной этиологии у молодняка крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследований. В отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» разработан комплексный иммуностимулирующий препарат на основе дсРНК и липополисахаридов бактерий «Нуклеозан». Двуспиральную РНК получали из хлебопекарных дрожжей по методике, предложенной Лебедевым Л.Р., Аликиным Ю.С. с соавторами в 2014 г. [11].

Методика получения препарата включала несколько стадий: разрушение клеточных стенок дрожжей додецилсульфатом натрия и хлороформом, экстракция дсРНК, концентрирование в растворе полиэтиленгликоля, фракционирование в растворах хлористого лития и осаждение этанолом.

Наличие дсРНК в образцах препарата определяли методом горизонтального электрофореза в агаровом геле и сравнивали с показателями дсРНК в аналогичных препаратах «Иммунат» производства ООО «НПЦ БелАгроГен» (Республика Беларусь) и «Провест» производства ООО «Диафарм» (РФ).

Липополисахариды (ЛПС) получали методом щелочного гидролиза *Bac. licheniformis* 1%-ным раствором натрия гидроокиси по методу, описанному П.А. Красочко с соавт. [12, 13].

Интерферониндуцирующую активность опытных вариантов иммуностимулирующего препарата «Нуклеозан» изучали в опыте на белых мышах. Для этого в опыт было взято 30 белых мышей живой массой 18-20 г, которых разделили на 5 групп (4 опытные и 1 контрольная) по 6 голов в каждой. Животным 1-й опытной группы вводили лабораторный образец препарата на основе дсРНК дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* внутривентрально в дозе 0,5 см³. Животным 2-й опытной группы – дсРНК сахаромикетов с пролонгированным действием, которое обеспечивалось добавлением поливинилпирролидона (ПВП), в вводимой дозе 0,5 см³. Животным 3-й опытной группы применяли разработанный препарат в составе – дсРНК+ПВП+ЛПС штамма бактерий *Bac. licheniformis*. Животным 4-й опытной группы ЛПС штамма бактерий *Bac. licheniformis* вводили также внутривентрально в дозе 0,5 см³. В качестве контроля служили 6 мышей, которым ввели по 0,5 см³ стерильного физиологического раствора. Препарат применяли однократно, отбирали кровь и получали плазму, в которой определяли уровень интерферона. Наличие интерферона в плазме крови белых мышей определяли по подавлению цитопатогенного действия вируса ТГС в дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 см³ в 2-суточной перевиваемой культуре клеток СПЭВ, выращенных в 96-луночных панелях. Результаты оценивали по проявлению цитопатогенного действия вируса ТГС через 6, 24 и 48 часов.

Показатели эффективности разработанного иммуностимулирующего препарата «Нуклеозан» изучали на телятах в хозяйствах Минской области, неблагополучных по болезням молодняка крупного рогатого скота с признаками поражения органов пищеварительного тракта.

Телятам группы опыта (n=20) комплексный иммуностимулирующий препарат «Нуклеозан» вводили внутримышечно трехкратно с интервалом в 2 дня, в дозе 20,0 см³. Телят группы контроля (n=20) лечили по схеме, принятой в хозяйствах.

Результаты исследований. Результаты исследования интерферониндуцирующей активности сконструированных вариантов препарата «Нуклеозан», предназначенного для лечения вирусно-бактериальных пневмоэнтеритов, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Интерферониндуцирующая активность лабораторных образцов комплексного препарата на основе дсРНК и бактериальных ЛПС на белых мышах

Разведения препарата	Разведение плазмы крови	Учет результатов (ЦПД вируса), часы		
		6	24	48
Опытная группа № 1	1:2	4/0	4/0	4/0
	1:4	4/0	4/0	4/2
	1:8	4/0	4/0	4/4
	1:16	4/0	4/0	4/4
	1:32	4/2	4/3	4/4
	1:64	4/4	4/4	4/4
	1:128	4/4	4/4	4/4

Продолжение таблицы 1

Разведения препарата	Разведение плазмы крови	Учет результатов (ЦПД вируса), часы		
		6	24	48
Опытная группа № 2	1:2	4/0	4/0	4/1
	1:4	4/0	4/0	4/4
	1:8	4/0	4/2	4/4
	1:16	4/2	4/3	4/4
	1:32	4/4	4/4	4/4
	1:64	4/4	4/4	4/4
	1:128	4/4	4/4	4/4
Опытная группа № 3	1:2	4/0	4/0	4/4
	1:4	4/0	4/2	4/4
	1:8	4/2	4/2	4/4
	1:16	4/3	4/4	4/4
	1:32	4/4	4/4	4/4
	1:64	4/4	4/4	4/4
	1:128	4/4	4/4	4/4
Опытная группа № 4	1:2	4/1	4/4	4/4
	1:4	4/2	4/4	4/4
	1:8	4/4	4/4	4/4
	1:16	4/4	4/4	4/4
	1:32	4/4	4/4	4/4
	1:64	4/4	4/4	4/4
	1:128	4/4	4/4	4/4
Контрольная группа	-	4/4	4/4	4/4
Контроль клеток	-	4/0	4/0	4/0
Контроль вируса	-	4/4	4/4	4/4

Примечание. В числителе – количество лунок с культурой клеток в опыте, в знаменателе – количество лунок, где вирус проявил ЦПД.

Данные таблицы 1 свидетельствуют о наиболее выраженной интерферониндуцирующей активности образца №1, при применении которого не наблюдается цитопатогенное воздействие вируса ТГС в разведении плазмы крови мышей в титрах 1:16 через 6 и 24 часов. При использовании образцов препарата №2 и №3 данный показатель был несколько ниже и установлен в разведениях плазмы крови мышей 1:8 и 1:4 соответственно.

Наиболее низкий показатель образования интерферона был определен у мышей опытной группы №4, которым вводили вариант препарата, содержащий компонент липополисахаридов штамма бактерий *Bac. licheniformis*.

Результаты по изучению показателей эффективности разработанного препарата для лечения телят с признаками поражения желудочно-кишечного тракта инфекционной этиологии представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Эффективность применения комплексного иммуностимулирующего препарата «Нуклеозан» при лечении телят с признаками поражения органов пищеварения

Показатели эффективности	Группы животных			
	опытная		контрольная	
	голов	%	голов	%
Количество выздоровевших телят от числа заболевших	17	85	14	70

Продолжение таблицы 2

Показатели эффективности	Группы животных			
	опытная		контрольная	
	голов	%	голов	%
Длительность лечения, дней	3,6		6,7	
Повторно заболело	3	17,6	6	42,8
Случаи падежа	0	0	2	14,3
Среднесуточный привес живой массы, г	638		483	

Как видно из данных, приведенных в таблице №2, применение комплексного иммуностимулирующего препарата на основе дсРНК и липополисахаридов бактерий «Нуклеозан» позволяет получить высокие показатели терапевтической эффективности при лечении телят. Использование в схемах лечения телят с признаками поражения желудочно-кишечного тракта позволяет снизить длительность лечения больных животных на 3,1 дня, уменьшить количество повторно заболевших телят на 30,0%, что позволяет повысить среднесуточный привес живой массы на 155,0 г.

Заключение.

1. Интерферониндуцирующая активность комплексного иммуностимулирующего препарата «Нуклеозан» на основе дсРНК в сыворотке крови мышей наиболее выражена в составе монокомпонента на основе дсРНК дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*, при применении которого не наблюдается цитопатогенного действия вируса ТГС в разведении плазмы крови мышей в титрах 1:16 на протяжении 24 часов наблюдения.

2. Применение разработанного комплексного иммуностимулирующего препарата «Нуклеозан» телятам с признаками поражения органов желудочно-кишечного тракта позволяет сократить срок лечения животных на 3,1 дня, уменьшить, по сравнению с животными группы контроля, количество случаев повторно заболевших животных на 25,2%.

Литература. 1. Сравнительное изучение специфических препаратов на основе д-РНК / Ю. С. Аликин [и др.] // Вестник биотехнологии и физикохимической биологии им. Ю. А. Овчинникова. – М., 2006. – С. 21–28. 2. Физиологические основы проявления стрессов и пути их коррекции в промышленном животноводстве: монография : в 2 ч. Ч. 1 / Ф. И. Фурдуй [и др.] ; под ред. П. А. Красочко. – Горки : БГСХА, 2013. – 564 с. 3. Бояринцев, Л. Е. Разработка и применение препаратов интерферона и биологически активных добавок в ветеринарии : дис. ... д-ра ветеринарных наук / Л. Е. Бояринцев. – Воронеж, 2003. – 341 с. 4. Сеница, Н. В. Распространение инфекционного ринотрахеита среди крупного рогатого скота в Республике Беларусь / Н. В. Сеница, Я. П. Яромчик, А. Г. Гурьева // Проблемы и перспективы развития животноводства : материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию биотехнологического факультета (г. Витебск, 31 октября – 2 ноября 2018 г.). – Витебск : ВГАВМ, 2018. – С. 210–212. 5. Новые и возвращающиеся болезни животных // А. И. Ятусевич [и др.] // Витебск : ВГАВМ, 2016. – 400 с. 6. Определение интерферониндуцирующей активности комплексного противовирусного препарата / П. А. Красочко, Д. С. Борисовец, А. С. Ястребов, Я. П. Яромчик, Т. А. Зуйкевич, Н. И. Войшнарочич // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2018. – Т. 54, вып. 2. – С. 35–38. 7. Рекомендации по изучению микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных / П. А. Красочко [и др.] ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2008. – 20 с. 8. Оценка эпизоотической ситуации по инфекционным энтеритам телят в хозяйствах Витебской области / П. А. Красочко, Я. П. Яромчик, Ю. А. Шашкова, С. В. Даровских, А. М. Мисник // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2018. – № 2. – С. 35–39. 9. Получение комплексного иммуностимулирующего противовирусного препарата на основе двуспиральной РНК и липополисахаридов бактерий / П. А. Красочко, Д. С. Борисовец, А. С. Ястребов, Я. П. Яромчик, Т. А. Зуйкевич, Н. И. Войшнарочич, А. М. Морозов // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2018. – № 1. – С. 6–9. 10. Красочко, П. А. Этиологическая структура возбудителей сальмонеллеза и эшерихиоза крупного рогатого скота в Республике Беларусь / П. А. Красочко, Д. Б. Кулешов, Я. П. Яромчик // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК : материалы Международной научно-практической конференции, 25–27 сентября 2019 г. – М. : ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», 2019. – С. 203–209. 11. Выделение и очистка двуспиральной рибонуклеиновой кислоты из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Л. Р. Лебедев [и др.] // Биофарм. – 2014. – Т. 6, № 6. – С. 37–43. 12. Способ определения функциональной активности лимфоцитов крупного рогатого скота : а. с. СССР 1554590 / П. А. Красочко, Е. В. Баева, Т. И. Помирко. – Оpubл. 01.12.1989. 13. Способ повышения резистентности организма молодняка крупного рогатого скота : пат. ВУ 3913 / П. А. Красочко. – Оpubл. 15.01.2001. 14. Средства специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота и свиней : практическое пособие / П. А. Красочко, В. В. Максимович, В. А. Журба, Г. Э. Дремач, Н. В. Сеница, Н. С. Мотузко, Я. П. Яромчик, П. П. Красочко, М. А. Понаськов ; науч. ред. П. А. Красочко. – Минск : ИВЦ Минфина, 2018. – 368 с. 15. Шахов, А. Г. Интерфероновый статус животных в норме и при различных заболеваниях / А. Г. Шахов, Л. Е. Ба-

Яринцев, В. В. Клименко // Экологические проблемы патологии, фармакологии и терапии животных : материалы Международного координационного совещания. – Воронеж, 1997. – С. 159–161. 16. Яромчик, Я. П. Анализ отчетности ветеринарных диагностических учреждений Республики Беларусь по инфекционным энтеритам телят / Я. П. Яромчик // Молодые ученые - науке и практике АПК : материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых (г. Витебск, 5–6 июня 2018 г.) / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2018. – С. 47–49.

Статья передана в печать 29.11.2019 г.

УДК 619:615. 373

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ АССОЦИИРОВАННОЙ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ КОЛИБАКТЕРИОЗА (ЭШЕРИХИОЗА) И САЛЬМОНЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

*Медведев А.П., *Вербицкий А.А., **Кулешов Д.Б.

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

**ОАО «БелВитунифарм», п. Должа, Республика Беларусь

В статье приведены сведения о получении сыворотки поливалентной ассоциированной против колибактериоза и сальмонеллеза крупного рогатого скота и оценке ее качества. **Ключевые слова:** сыворотка, эшерихии, сальмонеллы, штаммы, культивирование, гипериммунизация, волы, антиген, инактивация, стерильность, безвредность, активность.

THE DEVELOPMENT OF A POLYVALENT SERUM AGAINST BOVINE COLIBACILLOSIS AND SALMONELLOSIS

*Medvedev A.P., *Verbitsky A.A., **Kuleshov D.B.

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

**OJCM «BelVitinipharm», Dolzha, Republic of Belarus

The article presents data on development of a polyvalent associated serum against bovine salmonellosis and colibacillosis and its quality assessment. **Keywords:** serum, Escherichia, salmonellae, strains, cultivation, hyperimmunization, oxen, antigen, inactivation, sterility, safety, activity.

Введение. Эпизоотическая ситуация в сельхозпредприятиях Республики Беларусь по некоторым инфекционным болезням остается неблагоприятной. Например, первое место среди них занимает эшерихиоз, второе – сальмонеллез. Действительно, по данным ветеринарной отчетности, только в Витебской области, по колибактериозу и сальмонеллезу крупного рогатого скота зарегистрировано в 2016 году 25 неблагоприятных пунктов по эшерихиозу и 39 - по сальмонеллезу, в 2017 году - 26 и 12 пунктов и в 2018 году – 23 и 12 пунктов, соответственно. Количество павших животных за указанные три года от колибактериоза составило 63 головы, от сальмонеллеза – 37 голов, т. е. эти болезни наносят значительный экономический ущерб, складывающийся из падежа животных, затрат по их профилактике и лечению больных.

По мнению специалистов, наиболее эффективными средствами в борьбе с колибактериозом и сальмонеллезом, являются специфические препараты – вакцины и лечебно-профилактические гипериммунные сыворотки.

Промышленное производство сыворотки против колибактериоза и сальмонеллеза крупного рогатого скота представляет собой сложный технологический процесс, состоящий из следующих этапов:

- определение биологических свойств производственных штаммов эшерихий и сальмонелл на соответствие паспортным данным;
- реакторное культивирование бактерий для наращивания необходимой бакмассы;
- инактивация эшерихий и сальмонелл формалином;
- проверка полноты инактивации бактерий и их токсинов;
- составление эшерихиозно-сальмонеллезного антигена и контроль его качества;
- гипериммунизация волов ассоциированным антигеном;
- взятие крови у волов, ее сепарация, дефибринация полученной сыворотки, ее консервация и отстой;
- расфасовка сыворотки во флаконы, их укупорка и этикетировка;
- контроль качества препарата.

Известно, что чаще всего для получения лечебно-профилактических сывороток используют крупных животных, что экономически оправдано. Поэтому для получения ассоциированной лечебно-профилактической сыворотки мы использовали волов.

Материалы и методы исследований. Для получения культур сальмонелл применяли производственные штаммы: *Sal. dublin* 373, *Sal. choleraesuis* 370, *Sal. typhimurium* 371, а для