

Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор

Усеня М.М., кандидат ветеринарных наук

Красочко И.А., доктор ветеринарных наук, профессор

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

РЕЗУЛЬТАТЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ ТЕЛЯТ

Резюме

Приведены результаты конструирования комплексного препарата для профилактики и терапии вирусно-бактериальных желудочно-кишечных инфекций телят, в состав которого входят иммуноглобулины из гипериммунной сыворотки, протаргол, тиосульфат натрия. Лечебная эффективность препарата достигала 71,4–100%.

Summary

Results of designing of a complex preparation for prevention and therapy of virus and bacterial gastrointestinal infections of calves which structure includes antibodies from gi-perimmunny serum, протаргол, sodium tio-sulfate. Medical efficiency of a preparation reached 71,4–100 %.

(Поступила в редакцию 07.05.2012)

ВВЕДЕНИЕ

Республика Беларусь в настоящее время является страной с переходной экономикой, в структуре которой, наряду с развитой промышленностью, большой удельный вес занимает сельское хозяйство. Одной из важнейших отраслей сельского хозяйства является животноводство. А одним из условий повышения рентабельности животноводческой отрасли является обеспечение охраны здоровья сельскохозяйственных животных и птицы. Известно, что в условиях промышленного содержания, при воздействии различных экстремальных факторов, в том числе алиментарных нарушений, высокой степени обсемененности помещений условно-патогенными бактериями и вирусами, загрязнения токсическими веществами, у животных развиваются иммунодефицитные состояния, приводящие к повышению уровня респираторных, желудочно-кишечных и других патологий [1,3].

Анализ данных ГУ «Белорусский государственный ветеринарный центр» и РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского», показывает, что в Беларуси заболеваемость животных с поражением органов дыхания составляет в среднем 45–50%, желудочно-кишечного

тракта – 55–85%. При этом отмечено, что наряду с возрастанием заболеваемости животных и птицы снижается эффективность терапевтических мероприятий [5,6].

Так, по данным Ю.Г.Зелюткова, П.А. Красочко и В.А. Машеро [1,4,5,6] указанные болезни носят факторный инфекционный характер и проявляются в виде ассоциативной инфекции с участием условно патогенной микрофлоры, вирусов, хламидий, микоплазм. Развивающиеся при этом патологические процессы характеризуются снижением локального и общего иммунного статуса животных и диктуют необходимость комплексного терапевтического подхода. В настоящее время, помимо организационных и технических мероприятий, обеспечивающих успешное решение данной проблемы, значительные усилия направлены на создание и практическое применение препаратов профилактического действия, способных корректировать состояние иммунной системы животных, тем самым предотвращать или снижать заболеваемость респираторными, желудочно-кишечными и др. инфекциями. Показано в частности, что применение иммунокорректирующих средств, особенно в критические периоды жизни, позволяет восстановить подавленные функции иммунной системы при

иммунодефицитах и повысить общую резистентность организма к действию патогенов. Более того, ряд средств, корригирующих стрессы и иммунодефициты, оказывают одновременно положительное воздействие на сохранность и продуктивность животных. Корректировка иммунологических параметров до состояния нормы, приводит на популяционном уровне к значительному (до 10–25%) повышению продуктивности сельскохозяйственных животных. Поэтому целесообразно рассматривать применение средств, корригирующих иммунодефициты снижающих влияние стрессов, и повышающих продуктивность взаимосвязано. Проводя коррекцию влияния стрессов и иммунодефицитов в критические периоды жизни, можно добиться значительного повышения сохранности и продуктивности животных, снизить затраты на получение единицы продукции и выйти на параметры рентабельного животноводства. Исходя из этого, очевидна необходимость использования, наряду с широко распространенной антибиотикотерапией, для профилактики и терапии желудочно-кишечных и респираторных заболеваний препаратов с иммуномодулирующим эффектом. Для этого необходимо разрабатывать лекарственные средства с учетом механизмов патогенеза болезни. Компоненты препарата должны сочетать многосторонний фармакологический эффект, этиопатогенетическую направленность и не должны вызывать побочных эффектов, т.е. быть комплексными и безвредными.

Наиболее эффективным и действенным средством практической иммунологии являются лечебные сывороточные препараты. Лечебно-профилактическая полноценность гипериммунной сыворотки всецело зависит от наличия в ней оптимальной концентрации антител при отсутствии (или низком уровне) анафилоксигенности. Широкая практика применения иммунных сывороток против различных инфекционных болезней убедительно показала, что их профилактическое действие значительно превышает терапевтический эффект. По существу их лечебное действие проявляется в основном лишь на ранних стадиях болезни. Считается общепризнанным, что специфические антитела обезвреживают возбудителя и его токсины

за пределами чувствительных клеток, что в первую очередь проявляется при токсикоинфекциях и вирусных болезнях [8].

Использование антибиотиков и сульфаниламидов при респираторных заболеваниях ведет к снижению заболеваемости, однако эти препараты воздействуют преимущественно только на возбудителей бактериальной природы, и почти не действует на вирусы. При этом некоторые антибиотики, такие как пенициллин, стрептомицин, гентамицин оказывают угнетающее влияние на иммунную систему. К тому же практикой доказано, что применение антибиотиков нарушает кишечный микробиоценоз, и приводит к сдвигу в количественном и качественном составе условно-патогенной и нормальной кишечной микрофлоры, т.е. дисбактериозу, который является одним из основных факторов развития заболеваний с диарейным синдромом.

Целью нашей работы является конструирование комплексного, экологически безопасного и не оказывающего отрицательного влияния на качество животноводческой продукции, препарата с использованием сывороточных иммуноглобулинов, биоэлементов (коллоидного серебра) и иммуномодулирующих субстанций, для профилактики и терапии у молодняка крупного рогатого скота вирусно-бактериальных желудочно-кишечных инфекций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При конструировании препарата мы исходили из того, что в этиологической структуре желудочно-кишечных заболеваний телят ведущую роль играют вирусы диареи, рота- и коронавируса, а также условно патогенная микрофлора желудочно-кишечного тракта и в первую очередь *E.coli*. Для нейтрализации возбудителей инфекционных болезней, конструируемый препарат должен содержать специфические сывороточные иммуноглобулины, которые получают при комплексной гипериммунизации бычков. В условиях СПК «Вишневка 2002» Минского района проводили гипериммунизацию клинически здоровых бычков, находящихся на откорме, возрастом 12–14 месяцев живой массой 300–320 кг. Для этого использовали смесь вирусных и бактериальных компонентов - вирус диареи с титром $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$;

ротавирус 7,0 Ig ТЦД_{50/см³}, коронавирусы 6,0 Ig ТЦД_{50/см³}, E.coli с адгезивными антигенами K₈₈, K₉₉, A₂₀, F₄₁, O₁₈ с концентрацией 5,0 млрд. микробных тел в 1 мл. Для получения гипериммунных сывороток проводили подбор оптимальной схемы иммунизации животных. В таблице 1 представлены апробированные схемы гипериммунизации бычков.

Таблица 1 – Схемы гипериммунизации бычков для получения сывороточных иммуноглобулинов

введение	введение антигенов вирусных и бактериальных	
день опыта	вирусные	бактериальные
схема № 1		
1-й раз 1-й день	антигены ВД. рота и корона – 5,0 см ³	бактериальный компонент с адгезивными антигенами E.coli K88, K99, A20, F41 – 3.0см ³ .
2-й раз на 7 дней	антигены ВД. рота и корона (10,0 см ³).	-
3-й раз на 14 день	-	бактериальный компонент адгезивными антигенами E.coli K88, K99, A20, F41 (6,0 см ³).
4-й раз на 21 день	антигены ВД. рота и корона (15,0 см ³)	-
5-й раз на 28 день	антигены ВД. рота и корона (25,0 см ³)	-
6-й раз на 35 день	-	бактериальный компонент адгезивными антигенами E.coli K88, K99, A20, F41 (9.0 см ³).
схема № 2		
1-е введение 1 день	антигены ВД. рота и корона -5,0 см ³	бактериальный компонент адгезивными антигенами E.coli K88, K99, A20, F41 – 3,0см ³
2-е введение на 14 день	антигены ВД. рота и корона 15,0 см ³	бактериальный компонент адгезивными антигенами E.coli K88, K99, A20, F41 6,0 см ³
3-е введение на 28 день	антигены ВД. рота и корона 30,0 см ³	бактериальный компонент с адгезивными антигенами E.coli K88, K99, A20, F41 6,0 см ³
схема № 3		
1-е введение 1 день	антигены ВД. рота и корона	бактериальный компонент с адгезивными антигенами E.coli K88, K99, A20, F41 6,0 см ³
2-е введение 21 день	антигены ВД. рота и корона	бактериальный компонент адгезивными антигенами E.coli K88, K99, A20, F41 15.0 см ³

Для получения специфических сывороточных иммуноглобулинов взятие крови проводили на 21-й день после последнего введения антигенных компонентов.

Выделение иммуноглобулинов из сыворотки крови иммунизированных животных проводили осаждением с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000) в концентрациях – 10 и 14%. Для этого после получения и фильтрации через марлевый фильтр сыворотки крови с целью отделения сгустков фибрина к ней добавляли полиэтиленгликоль в исследуемых концентрациях. Смесь выдерживали в течение часа при комнатной температуре, периодически перемешивая, и еще 10–12 часов в холодильнике при 6–8⁰С. После чего надсадок сливали, а осажденные иммуноглобулины ресуспензировали

0,9%-ным физиологическим раствором до 10%-й концентрации, консервировали 0,2% тиотропином и использовали для дальнейшей работы.

В состав комплексного препарата включен протаргол, который в значительной степени активизирует неспецифические гуморальные и клеточные факторы иммунитета, обладает иммуностимулирующими, противовирусными и антибактериальными свойствами. Характерной особенностью препаратов серебра является то, что при введении в организм ионы этого металла концентрируются в воспалительном очаге и действуют на возбудителей бактериальной и вирусной природы непосредственно в пораженном месте. Механизм действия серебра на бактериальную клетку заключается в том, что ион металла

при взаимодействии с мембраной бактерии препятствует проникновению в бактериальную клетку других ионов и питательных веществ, а противовирусный эффект заключается в том, что ионы серебра препятствуют проникновению вирусов в чувствительную клетку. При обработке препаратами серебра животных не происходит привыкания бактериальной флоры к препарату [8].

Для снятия токсикоза, вызываемого инфекционными и не инфекционными раздражителями, в состав конструируемого препарата включен тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$), который оказывает антиоксидантное, противовоспалительное и десинсибилизирующее действие. При этом он стимулирует функцию эндокринной и ретикулоэндотелиальной систем, усиливает выделение воды из клеток иммунной системы, а действуя восстанавливающе на белки, препятствует их выпадению [8].

Для проверки влияния протаргола и тиосульфата натрия на сохранность антител к вирусам в сывороточных препаратах нами исследовано 3 серии иммуноглобулина после введения в него указанных препаратов в различных концентрациях.

Для нормализации водно-солевого баланса в организме животных все вышеуказанные компоненты готовили на физиологическом растворе. На основании имеющихся литературных данных и результатов собственных исследований, мы считаем, что такая композиция компонентов пригодна для конструирования комплексного препарата для профилактики и терапии вирусно-бактериальных энтеритов телят.

Физико-химические свойства препарата (внешний вид, цвет, запах, pH) определяли согласно требованиям ГФ XI.

Проверку на контаминацию бактериями и грибами каждого антигенного компонента, а также стерильность готового образца препарата проводили путем посевов на селективные питательные среды МПА, МПБ, МППБ, агар Сабуро. Питательные среды с посевами выдерживали в течение 10 дней при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ (для агара Сабуро от 20 до 24°C).

Безвредность определяли на белых мышах при подкожном однократном введении в тест-дозе в объеме $0,5 \text{ см}^3$ (ГОСТ 28085-89) [7].

В условиях СПК «Щемяслица», «Восход», «Минская овощная фабрика» на телятах 3-15-дневного возраста проводили отработку терапевтической дозы компонентов и проверку лечебной эффективности изготовленного препарата при желудочно-кишечных нарушениях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Наработанные антигенные компоненты и готовый образец препарата не были контаминированы бактериальной и грибковой микрофлорой. Компоненты были безвредны для лабораторных животных в течение 10 дней наблюдения.

Полученные образцы комплексного препарата для профилактики и терапии вирусно-бактериальных желудочно-кишечных инфекций телят представляли собой жидкость светло-коричневого цвета с опалесценцией, со специфическим запахом без осадка. При встряхивании флакона с препаратом наблюдается незначительное вспенивание, pH в пределах 6,8–7,5.

При гипериммунизации животных-продуцентов вирусными и бактериальными антигенами в крови наблюдалось интенсивная выработка антител. Результаты представлены в таблице 2.

Наиболее оптимальной является гипериммунизация бычков по схеме № 1. Титр антител у иммунизированных животных повышался в 2–8 раз, тогда как при использовании схем № 2 и 3 титр зачастую оставался на том же уровне или повышался только в 2–3 раза.

Установлено, что наиболее эффективное осаждение иммуноглобулинов происходит с помощью полиэтиленгликоля в 14% концентрации. Так, в сыворотке крови до осаждения, концентрация альбуминов была 36,74 и 42,33%, иммуноглобулинов – 20,17–23,77%, то после осаждения – концентрация альбуминов стала 7,23 и 2,93%, иммуноглобулинов – 50,81 и 54,27%.

Таблица 2 – Результаты гипериммунизации бычков вирусными и бактериальными антигенами

Вид антигена	Титр антител (\log_2)							
	Схема № 1		Схема № 2		Схема № 3		Контроль	
	До иммунизации	Через 3 недели после последнего введения антигенов	До иммунизации	Через 3 недели после последнего введения антигенов	До иммунизации	Через 3 недели после последнего введения антигенов	До иммунизации	Через 3 недели после последнего введения антигенов
Вирус диареи	4,57±0,20	5,63±0,18	5,67±0,33	5,75±0,25	5,00±0,58	4,71±0,29	4,00±0,58	3,67±0,33
Ротавирус	2,67±0,21	5,43±0,30	3,00±0	5,00±0,22	3,00±0	5,14±0,14	3,00±0	3,00±0
Коронавирус	2,50±0,34	4,25±0,16	2,67±0,67	4,88±0,13	3,00±0	4,57±0,2	3,00±0	4,00±0,58
E.coli, A ₂₀	9,57±0,43	10,63±0,63	8,67±0,33	9,33±0,42	9,00±1,53	8,50±0,43	6,33±1,20	8,00±0,58
E.coli F ₄₁	9,50±0,85	11,57±0,65	9,00±1,0	10,86±0,40	8,00±0,58	11,86±0,51	10,67±0,89	8,33±0,33
E.coli K ₉₉	8,67±0,33	9,17±0,31	7,67±0,33	8,86±0,14	8,33±0,33	9,43±0,20	8,33±0,33	8,00±0

Таблица 3 – Влияние тиосульфата натрия и протаргола на титры антител в крови бычков к вирусам диареи и ротавирусу

№ п/п	Концентрация (%)		Титры антител в \log_2 в сериях к:					
	протаргола	тиосульфат натрия	№ 1		№ 2		№ 3	
			РТВ	ВД	РТВ	ВД	РТВ	ВД
1	—	—	7	7	8	7	8	9
2	—	2.5	7	7	8	7	8	9
3	—	5.0	7	7	8	7	8	9
4	—	10.0	7	7	8	7	8	9
5	0.25	—	7	7	8	7	8	9
6	0.5	—	7	7	8	7	8	9
7	0.8	—	6	5	8	6	7	7
8	0.5	5.0	7	7	8	7	8	9
9	0.5	10.0	6	7	7	7	7	8
10	0.8	5.0	6	6	7	5	6	7
11	0.8	10.0	6	6	6	5	7	8

Как видно из таблицы 3, высокие концентрации протаргола (0,8%) совместно с тиосульфатом натрия снижают титры антител в конструированном препарате. Наиболее оптимальной концентрацией является 0,5% протаргола и 10,0% тиосульфата натрия. Данные концентрации ингредиентов не влияют на наличие антител в препарате.

Для отработки оптимальной терапевтической дозы компонентов конструируемого

препарата на телятах в условиях производства поставлен ряд опытов. Для этого в каждом из трех СПК были сформированы по 6 групп телят 3–15 дневного возраста с признаками расстройства пищеварения разной степени, по 5–7 голов в каждой группе. Препарат животным вводили внутрь один раз в день 3–4 дня подряд в пяти нижеприведенных вариантах (таблица 4).

Таблица 4 – Состав комплексного препарата для лечения телят с диарейным синдромом

Вариант №1	Вариант №2	Вариант №3:	Вариант №4	Вариант №5:
Сывороточный иммуноглобулин-5,0% Проторгол – 0,25% Тиосульфат натрия – 5,0% Водно-солевой раствор – до 100%	Сывороточный иммуноглобулин-7,5% Проторгол – 0,4% Тиосульфат натрия –7,5% Водно-солевой раствор – до 100%	Сывороточный иммуноглобулин-10,0% Проторгол – 0,5% Тиосульфат натрия –10,0% Водно-солевой раствор – до 100%	Сывороточный иммуноглобулин-12,5% Проторгол – 0,7% Тиосульфат натрия –12,0% Водно-солевой раствор – до 100%	Сывороточный иммуноглобулин-15,0% Проторгол – 1,0% Тиосульфат натрия –15,0% Водно-солевой раствор – до 100%

Контроль: схема лечения телят, применяемая в хозяйстве.

Препарат назначался на фоне голодной диеты и задавался внутрь в дозе по 50 и 100,0 см³ в чистом виде или с 500,0 см³ прокипяченной водопроводной воды 1 раз в день 3–4 дня подряд.

О степени терапевтической эффективности конструируемых образцов препарата судили по срокам выздоровления, продолжительности болезни, проценту выздоровления больных телят. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Эффективность применения препарата для профилактики и терапии вирусно-бактериальных желудочно-кишечных инфекций телят в условиях производства

№ варианта препарата	Наименование СПК и кол-во животных	Выздоровело (гол.)	% выздоровления	продолжительность болезни (дней)
1	Щемяслица - 7	7	100	4-5
	Восход - 7	5	71,4	4-5
	Минская овощная фабрика - 10	10	100	5
2	Щемяслица - 6	7	100	2-4
	Восход - 6	5	83,3	3-4
	Минская овощная фабрика - 10	10	100	5
3	Щемяслица - 5	7	100	2-3
	Восход - 7	7	100	2-4
	Минская овощная фабрика - 10	10	100	4
4	Щемяслица - 4	7	100	2-3
	Восход - 6	6	100	2-3
	Минская овощная фабрика - 10	10	100	3
5	Щемяслица - 6	7	100	2-3
	Восход - 6	5	83,3	2-3
	Минская овощная фабрика - 10	10	100	3

Эффективность разных вариантов препарата была неодинакова во всех хозяйствах. Так при применении вариантов 1 и 2 терапевтический эффект проявлялся только на 3–4-й дни, а при применении вариантов 3–5 улучшение общего состояния наступало через несколько часов и животные выздоравливали уже на 2–3-й дни. Первый вариант препарата терапевтический эффект оказывал только

при применении его в дозе по 100, 0 см³. Лучший терапевтический эффект был отмечен при применении 3-го варианта конструируемого препарата в дозе по 50, 0 см³.

По результатам проведенных опытов разработан лабораторный регламент изготовления препарата для профилактики и терапии вирусно-бактериальных желудочно-кишечных инфекций телят.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Проведенные исследования показали, что наиболее оптимальным методом гипериммунизации бычков является 6 кратное поочередное введение вирусных и бактериальных антигенов, а выделение иммуноглобулинов – с помощью полиэтиленгликоля в 14%-й концентрации.

2 Лучший терапевтический эффект отмечен при применении препарата содержащего следующие компоненты: сывороточный иммуноглобулин – 10,0%, проторгол – 0,5%, тиосульфат натрия – 10,0% и водно-солевой раствор – до 100% один раз в сутки по 50,0 см³ на животное в течение 3–4 дней подряд.

ЛИТЕРАТУРА

1 Красочко, П.А., Зелютков, Ю.Г., Красочко, И.А. Вирусные пневмо-энтериты телят / Научн. ред. Н.А. Ковалев.- Минск: БИТ Хата. - 1999. – 168 с.

2 Красочко, П.А., Прудников, В.С., Новиков, О.Г., Якубовский, М.В., Красочко, И.А., Ятусевич, А.И., Зелютков, Ю.Г., Науменков, В.И., Грибко, С.М. Иммуитет и его коррекция в ветеринарной медицине. Смоленск:, Смоленская городская типография, 2001. – 323 с.

3 Красочко, П.А., Новиков, О.Г., Ятусевич, А.И. и др. Болезни крупного рогатого скота и свиней. Минск:, Технопринт, 2003. – 462 с.

4 Красочко, П.А., Якубовский, М.В., Ятусевич, А.И. и др. Болезни сельскохозяйственных животных Минск. Бизнесофсет, 2005. – 800 с.

5 Зелютков, Ю.Г. Инфекционные энтериты новорожденных телят - Витебск, 2006. – 190 с.

6 Машеро, В.А. Инфекционные болезни телят / В.А. Машеро: науч. ред. П.А. Красочко. – Витебск: УО ВГАВМ, 2006. – 263 с.

7 Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов применяемых в ветеринарии: утверждены Министерством сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь 16.03.2007.-Минск: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского», 2007.-156с.

8 Государственная фармакопея XI издание. Москва.-1990.-с.200-261.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»

Диагностикум Беломастин

- для выявления воспалительных процессов в вымени у коров при начальных, скрытых и хронических формах мастита
- для исследования сборного молока на наличие примеси маститного молока
- для контроля результатов лечения больных маститом животных



Изготовитель: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»

220003, г. Минск, ул. Брикета, 28, тел./факс (+37517) 5088131.

По вопросам приобретения препарата Вы можете обратиться в отдел снабжения и сбыта тел. (017) 508-81-35. E-mail:

bievmtut.by