

**ИЗУЧЕНИЕ БЕЗВРЕДНОСТИ ИНАКТИВИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ЭШЕРИХИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ГЕННЫЕ КОНСТРУКЦИИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ ВИРУСА ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

**\*Красочко П.А., \*\*Прокулевич В.А., \*\*Сауткина Н.В., \*Гецевич Д.О., \*Крюкова К.А.,  
\*Понаськов М.А., \*\*Пластинина О.В.**

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

\*\* Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

*В статье приведен материал изучения безвредности инактивированных рекомбинантных штаммов эшерихий, содержащих генные конструкции экспрессии белков вируса диареи крупного рогатого скота. Установлено, что по истечению срока наблюдений в течение 14 суток гибели и изменений в клиническом состоянии животных не наблюдалось, т.е. предлагаемый штамм не токсичный и безвредный. **Ключевые слова:** вирус диареи, рекомбинантный штамм, эшерихии, экспрессия, генные конструкции.*

**RESEARCH OF THE HARMLESSNESS OF INACTIVATED RECOMBINANT ESCHERICHIA STRAINS CONTAINING GENE EXPRESSION CONSTRUCTS OF BOVINE DIARRHEA VIRUS PROTEINS**

**\*Krasochko P.A., \*\*Prokulevich V.A., \*\*Sautkina N.V., \*Getsevich D.O., \*Kryukova K.A.,  
\*Ponaskov M.A., \*\*Plastinina O.V.**

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

\*\*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

*The article presents the material for studying the harmlessness of inactivated recombinant Escherichia strains containing gene constructs of protein expression of the bovine diarrhea virus. It was found that after the expiration of the observation period for 14 days, no deaths and changes in the clinical condition of the animals were observed, i.e. the proposed strain is non-toxic and harmless. **Keywords:** diarrhea virus, recombinant strain, Escherichia, expression, gene constructs.*

**Введение.** Особое значение среди возбудителей вирусных пневмоэнтеритов телят занимает вирус диареи – болезни слизистых оболочек. Вирусная диарея – болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота (ВД-БС КРС), имеет широкое распространение во многих странах мира и считается одним из заболеваний, имеющих экономическое значение для современного животноводства [6-8].

Согласно исследованиям, процент обнаружения антигена вирусной диареи из фекальных образцов, отобранных от больных телят с признаками диареи, составляет от 25 до 64 %, что указывает на его значительную роль в возникновении инфекционных энтеритов [9]. Кроме того, вирус диареи является одной из причин возникновения заболеваний репродуктивных органов у коров. Так, у больных эндометритом у коров антитела к вирусу диареи выявляются практически у 100 % обследованных животных, при этом их титр достигает 7-8  $\log_2$ , тогда как у здоровых животных антитела выявляются у 40-50 % животных, а титр антител на 2-4  $\log_2$  ниже.

Экономический ущерб сельскохозяйственных предприятий вирусной диареи вследствие абортов и мертворождений, рождения слабого, нежизнеспособных молодняка, падежа и вынужденного убоя телят, потери упитанности, снижения молочной продуктивности, сокращение жизни продуктивных животных составляет десятки миллионов рублей [4].

В современных условиях введения интенсивного животноводства для снижения напряженности эпизоотической ситуации по вирусной диарее крупного рогатого скота и уменьшения экономического ущерба используется создание комплексной системы защиты поголовья от данной инфекции [1, 5, 10].

Несмотря на значительные достижения ветеринарной науки и практики, до настоящего времени не разработаны эффективные схемы лечения данной патологии ввиду отсутствия эффективных специфических противовирусных ветеринарных препаратов. Этот факт обуславливает актуальность разработки средств борьбы с данным патогеном.

Для специфической профилактики вирусной диареи разработаны и широко используются живые и инактивированные моно- и ассоциированные вакцины. Однако данные биопрепараты создают поствакцинальный иммунитет, но лечебными свойствами не обладают.

Лечебным эффектом обладают гипериммунные сыворотки, содержащие противовирусные антитела. Такие биопрепараты применяют как для пассивной профилактики, так и для терапии животных, больных вирусной диареей.

Для неспецифической профилактики и терапии животных с вирусной диареей широко используются препараты на основе интерферонов, серебра, пробиотиков, фитопрепаратов и т.д.

В последние годы начали разрабатывать генно-инженерные (рекомбинантные) конструкции, которые получают путем введения генов, кодирующих основные антигены патогенов вирусов, в геном микроорганизмов-реципиентов. В качестве реципиентов при создании рекомбинантных штаммов чаще всего используют кишечную палочку, дрожжевые клетки, вирусы осповакцины и вирусы насекомых.

*Escherichia coli* широко используется для экспрессии белка в качестве гетерологичного хозяина, помимо ограничения в форме выхода, посттрансляционной модификации и фолдинга экспрессируемых рекомбинантных белков. Примеры таких включают субъединичную вакцину против вируса ньюкаслской болезни (NDV) с использованием гена гемагглютинин-нейраминидазы (HN), субъединичную вакцину против вируса ящура с использованием гена VP-1, субъединичную вакцину против цирковируса свиней типа 2 (PCV-2) на основе открытой рамки считывания-2 (коммерциализирована) и субъединичную вакцину против японского энцефалита на основе белка оболочки рfM и E.

Новым перспективным направлением иммунотерапии вирусной диареи является использование рекомбинантных штаммов бактерий, имеющих в своем составе генные конструкции экспрессии белков вирусов. Данные рекомбинантные бактерии при введении их животным должны проявлять высокую специфическую активность против группы латентных персистирующих форм вируса диареи, активизируя клоны иммунокомпетентных клеток и тем самым активизировать клеточный иммунитет. При этом совмещение двух функциональных видоспецифических для крупного рогатого скота «защитных» рекомбинантных белков с синтезированным по схеме вирус-аналогового капсидного полиэпитного пептида в одной бактерии, которые будут обладать высоким синергическим действием против вирусной диареи, находящихся как в активном, так и в латентном состоянии.

На кафедре микробиологии Белорусского государственного университета сконструирован рекомбинантный штамм эшерихий, несущий в своем составе генные конструкции экспрессии белков вируса диареи.

Целью исследований явилось изучение безвредности рекомбинантного штамма эшерихий, несущего в своем составе генные конструкции экспрессии белков вируса диареи.

**Материалы и методы исследований.** Изучение реактогенности, безвредности и токсичности рекомбинантного штамма эшерихий, несущего в своем составе генные конструкции экспрессии белков вируса диареи, проводили по ГОСТ 31926-2013 [3].

Реактогенность рекомбинантного штамма определяли на 10 здоровых белых мышах обоего пола живой массой 18-20 г, разделенных на 2 группы по 5 животных в каждой. Мышам 1 группы однократно подкожно в область спины после предварительной дезинфекции спиртовым тампоном вводили изучаемый рекомбинантный штамм бактерий в объеме 0,2 см<sup>3</sup>; животным 2 группы (контрольная) вводили изотонический раствор натрия хлорида в тех же дозах. За мышами опытной и контрольной групп вели клиническое наблюдение в течение 7 суток.

Далее проводили испытания рекомбинантного штамма на токсичность на 70 лабораторных животных (белые мыши) живой массой 19-22 г обоего пола, которых по принципу аналогов разделили на 7 групп по 10 голов в каждой.

Животным 1 опытной группы вводили рекомбинантный штамм эшерихий однократно подкожно, обработав место введения спиртовой салфеткой, в объеме 0,1 см<sup>3</sup> в область поверхности спины; животным 2 группы – 0,3 см<sup>3</sup>; 3 группы – 0,5 см<sup>3</sup>; 4 группы – 0,7 см<sup>3</sup>, 5 группы – 0,9 см<sup>3</sup> и 6 группы – 1,0 см<sup>3</sup>. Мышам 7 группы препарат не вводили, они служили биологическим контролем. За всеми животными вели клиническое наблюдение в течение 14 суток.

**Результаты исследований.** По результатам исследований было установлено, что рекомбинантный штамм эшерихий, несущий в своем составе генные конструкции экспрессии белков вируса диареи, не обладает реактогенной активностью. При ежедневном визуальном наблюдении каких-либо изменений в поведении, приеме корма и воды, внешнего вида зафиксировано не было. Все белые мыши выжили, внешне выглядели здоровыми: шерсть была чистой, не испачканная экскрементами, они охотно принимали корм и воду, активно двигались и адекватно реагировали на внешние раздражители. В таблице 1 приведены результаты безвредности рекомбинантного штамма эшерихий.

**Таблица 1 - Результаты изучения безвредности рекомбинантного штамма эшерихий, несущего в своем составе генные конструкции экспрессии белков вируса диареи**

Дни наблюдения	Испытуемый препарат			
	Количество животных	Выжило	Пало	Клиническое состояние животных
1	2	3	4	5
Через 1 сутки	5	5	0	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы
Через 2 суток	5	5	0	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы

1	2	3	4	5
Через 3 суток	5	5	0	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы
Через 4 суток	5	5	0	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы
Через 5 суток	5	5	0	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы
Через 6 суток	5	5	0	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы
Через 7 суток	5	5	0	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы
Через 8 суток	5	5	0	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы
Через 9 суток	5	5	0	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы
Через 10 суток	5	5	0	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы

Следующим этапом работы была оценка токсикологических свойств различных доз рекомбинантного штамма эшерихий, несущего в своем составе генные конструкции экспрессии белков вируса диареи.

В таблице 2 приведены результаты изучения токсикологических свойств различных доз рекомбинантного штамма эшерихий, несущего в своем составе генные конструкции экспрессии белков вируса диареи.

**Таблица 2 - Результаты изучения токсикологических свойств различных доз рекомбинантного штамма эшерихий, несущего в своем составе генные конструкции экспрессии белков вируса диареи**

Группы животных	Показатель	Сутки после введения препарата													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 (0,1 мл)	Сохранность	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	Реакция	-	-	-	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
2 (0,3 мл)	Сохранность	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	Реакция	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3 (0,5 мл)	Сохранность	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	Реакция	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4 (0,7 мл)	Сохранность	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	Реакция	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 (0,9 мл)	Сохранность	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	Реакция	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6 (1,0 мл)	Сохранность	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	Реакция	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Контроль	Сохранность	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	Реакция	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечания: сохранность - кол-во выживших / павших;  
реакция - реакция на месте инъекции.

Результаты проведенных опытов по определению токсичности рекомбинантного штамма эшерихий, несущего в своем составе генные конструкции экспрессии белков вируса диареи, показали, что по истечению срока наблюдений в течение 14 суток гибели и изменений в клиническом состоянии не наблюдалось, следовательно, предлагаемый штамм нетоксичный и безвредный.

**Заключение.** В результате проведенных исследований установлено, что рекомбинантный штамм эшерихий, несущий в своем составе генные конструкции экспрессии белков вируса диареи, является нереактогенным, не обладает токсичностью и абсолютно безвреден.

**Литература.** 1. Влияние специфической профилактики вирусной диареи крупного рогатого скота на сохранность молодняка / А. П. Порываева [и др.] // Ветеринарный врач. – 2018. – № 3. – С. 24–27. 2. ГОСТ 28085-2013. Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Методы бактериологического контроля стерильности : межгосударственный стандарт Российской Федерации : издание официальное : принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 марта 2013 г. № 55-П) : введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 июня 2013 г. № 319-ст : введен взамен ГОСТ 28085-89 : дата введения 2014-07-01 / разработан Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ») // Техэксперт : офиц. сайт. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200104835>. - Дата обращения : 06.02.2024. 3. Диагностика, лечение, профилактика и меры борьбы с желудочно-кишечными болезнями молодняка крупного рогатого скота инфекционной этиологии : рекомендации / Н. В. Саница [и др.]. – Витебск : УО ВГАВМ, 2019. – 67 с. 4. Инфекционные болезни животных, регистрируемые в Союзном государстве / П. А. Красочко [и др.]. – Краснодар : Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина, 2020. – 385 с. 5. Красочко, П. А. Профилактика инфекционных болезней животных - приоритет биологической безопасности Союзного государства / П. А. Красочко, П. П. Красочко // Научные достижения Республики Беларусь : сборник материалов Дней белорусской науки в г. Москве. – Минск : ГУ «Белорусский институт системного анализа и информационного обеспечения научно-технической сферы», 2017. – С. 161-163. 6. Красочко, П. А. Современные подходы к специфической профилактике вирусных респираторных и желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота / П. А. Красочко, И. А. Красочко, С. Л. Борознов // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2008. – Т. 6. – С. 243-251. 7. Красочко, П. А. Иммунодефицит и его коррекция при инфекционном ринотрахеите и вирусной диарее у телят / П. А. Красочко, И. А. Красочко, С. М. Усов // Ветеринарная наука - производству. – 1999. – № 34. – С. 40-50. 8. Красочко, П.А. Серологический мониторинг вирусных пневмоэнтеритов крупного рогатого скота в хозяйствах Республики Беларусь / П.А. Красочко, М.А. Понаськов, П.П. Красочко // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины». – 2022. – Т. 58, вып. 1. – С. 26–30. 9. Методические рекомендации по профилактике, лечению и мерам борьбы с пневмоэнтеритами телят / П. А. Красочко [и др.]. – Минск : Энциклопедикс, 2000. – 40 с. 10. Поиск новых препаратов, эффективных в отношении возбудителя вирусной диареи - болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота / Т. И. Глотова [и др.] // Вестник КрасГАУ. – 2016. – № 12. – С. 69–75. 11. Рекомбинантные технологии в производстве иммунологических препаратов для профилактики и терапии вирусных инфекций животных / П. А. Красочко, П. П. Красочко, В. А. Прокулевич, А. И. Зинченко // Аграрное образование и наука для агропромышленного комплекса : материалы Республиканской научно-практической конференции. Белорусская агропромышленная неделя БЕЛАГРО-2023, Горки, 08 июня 2023 года / Белорусская государственная сельскохозяйственная академия [и др.]. – Горки : БГСХА, 2023. – С. 22-26. 12. Эпизоотическая ситуация по вирусной диарее крупного рогатого скота в Республике Беларусь / С. Л. Гайсенко [и др.] // Ветеринарный журнал Беларуси. - 2019. - № 1. - С. 22-26. 13. Эффективность комплексного пробиотического препарата на телятах / П. А. Красочко [и др.] // Наука, образование, культура : материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 27 годовщине Комратского государственного университета. – Комрат, 2018. – С. 127–129.

Поступила в редакцию 05.03.2024.

УДК 619:616:618.2.7

#### УСТАНОВЛЕНИЕ РОЛИ ВИРУСОВ В ВОЗНИКНОВЕНИИ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ ТЕЛЯТ

\*Красочко П.А., \*\*Станкуть А.Э., \*Красочко И.А., \*\*Борисовец Д.С.

\*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 исследований по оценке роли вирусов инфекционного ринотрахеита, диареи, парагриппа-3 в возникновении респираторных инфекций у телят. Установлено, что в этиологии респираторных инфекций телят существенную роль играют вирусы инфекционного ринотрахеита, диареи и парагриппа-3 крупного рогатого скота. При этом наиболее часто респираторную патологию вызывает вирус парагриппа-3 (71,2 % животных, у которых установлена сероконверсия), затем – вирус инфекционного ринотрахеита (60,2 %) и диареи (50,7 %). Однако отмечена сероконверсия и у клинически здоровых телят (соответственно 19,1, 11,7 и 14,9 %), что свидетельствует о бессимптомном течении инфекционной болезни или о проведенной вакцинации. **Ключевые слова:** серологические исследования, РНГА, сыворотка крови, инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, парагрипп-3, респираторные болезни, телята.

#### ASSESSMENT OF THE ROLE OF VIRUSES IN RESPIRATORY INFECTIONS OF CALVES

\*Krasochko P.A., \*\*Stankut A.E., \*Krasochko I.A., \*\*Borisovets D.S.

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

\*\*Institute of Experimental Veterinary Medicine named after. S.N. Vyshelesky, Minsk, Republic of Belarus