

ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ГРИБА ШИИТАКЕ

Д. Е. Скуман, Е. О. Ходорович, П. А. Красочко, А. В. Богомольцев

Цель исследований - изучение противовирусной активности водной суспензии гриба шиитаке. Приведены результаты изучения противовирусной активности водной суспензии грибов шиитаке. Установлено, что разведение суспензии до 10^{-4} приводит к существенному угнетению репродукции вируса трансмиссивного гатсроэнтерита в культуре клеток СПЭВ и вируса инфекционного ринотрахеита в культуре клеток МДБК.

Ключевые слова: шиитаке, противовирусная активность, вирус трансмиссивного гастроэнтерита, вирус инфекционного ринотрахеита, культура клеток.

EVALUATION OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACTS OF SHIITAKE MUSHROOM

D. E. Skuman, E. O. Khodorovich, P. A. Krasochko, A. V. Bogomoltsev

The purpose of the research is to study the antiviral activity of an aqueous suspension of the shiitake fungus. The results of the study of antiviral activity of aqueous suspension of shiitake mushrooms are presented. It is established that the suspension dilution up to 10^{-4} leads to a significant inhibition of the reproduction of transmissible gastroenteritis virus in the culture of SPEV cells and infectious rhinotracheitis virus in the culture of MDBC cells.

Keywords: shiitake, antiviral activity, transmissible gastroenteritis virus, infectious rhinotracheitis virus, cell culture.

Введение. Одними из основных причин снижения продуктивности и повышенного отхода животных являются возбудители инфекционных болезней. Особенно это относится к факторным болезням. К ним относятся как биотические (вирусы, бактерии, хламидии, протейские и т.д.), так и абиотические факторы (технология содержания, кормление, экология и т.д.). В этой связи вопрос борьбы с инфекционными болезнями животных в современных условиях является одним из важных направлений исследований по разработке мер борьбы [1, с. 484; 2, с. 701; 3, с. 67; 4, с. 385].

Мир грибов является биологически и экологически разнообразным. Они являются неотъемлемой частью всех водных и наземных экосистем, играют важную роль в биосфере, разлагая всевозможные органические материалы. В настоящее время описано около 70 тыс. видов грибов, но по

некоторым оценкам известно до 1,5 миллионов видов. История лечения лекарственными грибами – фунготерапия насчитывает уже две тысячи лет [5, с. 15].

Гриб шиитаке (*Lentinula edodes*), занимает второе место на мировом рынке грибов в отношении его питательной ценности и терапевтического применения для предотвращения или лечения множества заболеваний. Гриб шиитаке содержит витамины (А, D, С, группы В), полезные микроэлементы, аминокислоты, жирные кислоты и полисахариды. В составе этих грибов обнаружили даже коэнзим Q10. В составе грибов шиитаке содержится большое количество витаминов, обнаружено много тиамина, рибофлавина, ниацина, биотина.

В этих грибах имеется полисахарид лентинан, который образует вещества, способные бороться с раковыми клетками, а также фитонциды, которые помогают противостоять вирусным заболеваниям, гепатиту, гриппу и даже ВИЧ. Также лентинан повреждает атипичные клетки, приводит к их гибели и одновременно стимулирует рост числа Т-фракций лимфоцитов (Т-киллеров и Т-хелперов), клеток – киллеров и фактора некроза опухолей (ФНО). Именно поэтому грибы шиитаке широко применяются в лечении раковых заболеваний в некоторых азиатских странах [5, с. 20; 6, 7, 8,].

На кафедре эпизоотологии и инфекционных болезней УО ВГАВМ и ООО «Данко» разработана технология получения водной суспензии гриба шиитаке, которую получают путем экстракции с использованием гидрофильных растворителей при воздействии ультразвука различной мощности и частоты. Одним из показателей биологических свойств водной суспензии гриба шиитаке является оценка противовирусной активности.

Целью исследований являлось изучение противовирусной активности водной суспензии гриба шиитаке.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились в условиях УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» в соответствии с Методическими рекомендациями

«Исследование вирулицидных свойств дезинфицирующих и антисептических препаратов» 04.04.96 г. № 67-9610.

В качестве тест-вируса использован вирусы трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС) и инфекционного ринотакетва крупного рогатого скота (ИРТ). Вирус ТГС (семейство Coronaviridae, род Coronavirus) – РНК-содержащий вирус, относится к группе альфа-коронавирусов, представлен 1-нитевой РНК. Вирус ИРТ (семейство Herpetoviridae, род Herpesvirus) - ДНК-содержащий вирус, относится к группе Герпесивирус 1.

В работе использовали перевиваемые линии клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ и почки эмбрионов теленка МДБК, депонированную в коллекции культур клеток РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Клетки культивировали в ростовой питательной среде, представляющей собой среду Игла и среду 199 в соотношении 1:1 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ L-глутамина и антибиотиков (100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). Поддерживающая питательная среда содержала все указанные выше ингредиенты и 2% эмбриональной телячьей сыворотки.

Для приготовления монослоя клеток в плоскодонных 96-луночных планшетах использовали суспензию культуры клеток линий СПЭВ в концентрации 300 тыс. клеток/мл. В лунки плоскодонных 96-луночных планшетов 8-канальной пипеткой вносили по 100 мкл поддерживающей питательной среды, а затем в те же лунки – суспензию клеток СПЭВ или МДБК (по 100 мкл в каждую). Планшеты с культурами клеток инкубировали в течение 48 ч в термостате при температуре плюс $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в атмосфере с объемной долей углекислого газа $(5,0 \pm 0,5)\%$ и относительной влажностью $(75 \pm 5)\%$ до формирования в лунках планшет сплошного монослоя, включающего только типичные клетки.

На первом этапе готовили разведения водной суспензии гриба шиитаке на поддерживающей среде от 10^{-1} до 10^{-12} . Затем 100 ТЦД вируссодержащей суспензии и водорастворимую суспензия гриба шиитаке в различных концентрациях объединяли в соотношении 1:1 и выдерживали 1

час в термостате при 37° С для контакта вируса с образцом препарата. После этого смесь вносили на монослой клеток в объеме по 0,1 мл на лунку (по 4 лунки на каждое разведение). Затем в культуральные планшеты вносили по 0,1 мл поддерживающей питательной среды. После завершения сорбции вирусов на культуре клеток и контакта с ними через 60 минут удаляли смесь вирусов с грибом шиитаке. Далее в каждую лунку вносили по 200 мкл поддерживающей питательной среды. В поддерживающую среду добавляли 2% эмбриональной телячьей сыворотки. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор и инкубировали при 5% CO₂ и температуре (37,0±1,0) °С.

В качестве положительного контроля вместо водной суспензии гриба шиитаке использовали 0,7%-ный раствор формальдегида; в качестве отрицательного контроля вирусосодержащую суспензию объединяли в соотношении 1:1 с поддерживающей питательной средой.

Инфекционную активность вирусов ТГС и ИРТ определяли по способности к цитопатическому действию (ЦПД).

Результаты исследования. При проведении исследований учет реакции проводили путем микроскопирования монослоя клеток спустя 1 сутки после постановки реакции и далее ежедневно с целью определения цитопатических изменений в клетках. Окончательный учет проводили на 4-й день инкубации.

Таблица 1 - Противовирусная активность водной гриба шиитаке в отношении вирусов трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС) и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (ИРТ)

Разведение водной суспензии гриба шиитаке	Реакция задержки ЦПД	Реакция задержки ЦПД
10 ⁻¹	####	####
10 ⁻²	####	####
10 ⁻³	++	####
10 ⁻⁴	+	+

10^{-5}	++++	+
10^{-6}	++++	++++

Примечания:

- задержка ЦПД

+ и ++ начальная стадия ЦПД

++++ - ЦПД во всех лунках

В результате проведенных исследований по оценке противовирусной активности водной суспензии гриба шиитакэ на культурах клеток СПЭВ и МДБК в отношении вируса ИРТ и ТГС было установлено, что угнетение репродукции вирусов под воздействием водной суспензии гриба шиитакэ наблюдалась в разведении 10^{-4} через 48 часов инкубации, а вируса ИРТ наблюдалась в разведении 10^{-5} через 48 часов инкубации.

В контроле вируса при концентрации 100 ТЦД50/0,1 см³ отмечено проявление характерных изменений с полной деструкцией монослоя через 48 часов, при концентрации 10 ТЦД50 /0,1 см³ поражение монослоя выявилось у 50% инфицированных лунок через 72 часа.

Заключение. Полученные результаты позволяют рекомендовать водную суспензию гриба шиитакэ при конструирования противовирусных препаратов.

Цитированная литература

1. **Шевченко, А. А.** Диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: вирусные заболевания: монография / А. А. Шевченко и др. – Текст : непосредственный // Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина, Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Краснодар: КубГАУ, 2018. – С. 484.
2. **Шевченко, А. А.** Диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: бактериальные заболевания: монография / А. А. Шевченко и др. – Текст : непосредственный // Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина, Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Краснодар: КубГАУ, 2018. – С. 701.
3. **Синица, Н. В.** Диагностика, лечение, профилактика и меры борьбы с желудочно-кишечными болезнями молодняка крупного рогатого скота инфекционной этиологии: рекомендации / Н. В. Синица, П. А. Красочко, Н. И. Гавриченко и др. – Текст :

непосредственный // Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск: Учреждение образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины ", 2019. – С. 67. – EDN IVMOPL.

4. **Красочко, П. А.** Инфекционные болезни животных, регистрируемые в Союзнм государстве / П. А. Красочко, Н. И. Гавриченко, О. Ю. Черных и др. – Текст : непосредственный // Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина, Чеченский государственный университет, Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Краснодар: Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, 2020. – С. 385. – ISBN 978-5-907373-70-9. – EDN NVEVJY.

5. **Теплякова, Т. В.** Противовирусная активность базидиальных грибов / Т. В. Теплякова, Т. А. Косогова, Г. Г. Ананько, А. В. Бардашева, Т. Н. Ильичева – Текст : непосредственный // Проблемы медицинской микологии, 2014, Т.16, №2, - С.15-24.

6. Грибное производство – Текст : электронный // URL: <http://www.mkgs.ru/gribnoe-proizvodstvo.php>. – (дата обращения 25.02.2024).

7. Методы фармацевтического анализа – Текст : электронный // URL: Методы фармацевтического анализа (znaytovar.ru) – (дата обращения 24.02.2024).

8. **Костромина, Е. О.** Получение препаратов на основе дереворазрушающих грибов /Е. О. Костромина, В. А. Чхенкели – Текст : электронный // URL: [1781 \(actabiomedica.ru\)](http://actabiomedica.ru) – (дата обращения 25.02.2024).

УДК 619:615.37:636.2

УРОВЕНЬ АНТИТЕЛ У КОРОВ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ЖИВЫМИ И ИНАКТИВИРОВАННЫМИ АССОЦИИРОВАННЫМИ ВАКЦИНАМИ

А. И. Черноков, И. А. Красочко

Цель исследований явилась сравнение уровня антител после вакцинации живой культуральной вирус-вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота с поливалентной инактивированной вакциной против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота. Установлено, что иммунизация коров живой и инактивированной вакцинами ведет к активизации выработки противовирусных антител - через 60 дней после иммунизации отмечается увеличение титров антител ко всем возбудителям на 4-5 log₂.

Ключевые слова: *вакцины, антитела, инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, парагрипп-3 и респираторно-синцитиальный вирус.*

NTIBODY LEVELS IN COWS AFTER VACCINATION WITH LIVE AND INACTIVATED ASSOCIATED VACCINES