

**Борисовец Д.С.**, кандидат ветеринарных наук  
**Ястребов А.С.**, доктор ветеринарных наук, доцент  
**Красочко П.А.**, доктор ветеринарных и биологических наук, профессор  
**Андросик Л.Д.**, кандидат ветеринарных наук

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

## **ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ИНТЕРФЕРОНА, ИНДУКТОРА ИНТЕРФЕРОНА И АЛЬВЕОЗАНА В НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОМ ОПЫТЕ**

### **ВВЕДЕНИЕ**

Вирусные и бактериальные инфекции, вызывающие поражение органов дыхания у свиней (PPCC, цирковирусная инфекция, грипп, пастереллёз, микоплазмоз, сальмонеллёз, актинобациллярная плевропневмония), диагностируются в свиноводческих хозяйствах и причиняют им экономический ущерб. Данные заболевания протекают чаще всего в виде смешанных вирусных и вирусно-бактериальных инфекций. В борьбе с ними вакцинопрофилактика играет решающую роль. Однако степень её эффективности напрямую зависит от состояния иммунной системы животных на момент проведения вакцинации.

Известно, что некоторые вирусы (вирус PPCC, цирковирус-2 свиней) являются иммунодепрессантами и вызывают в организме состояние вторичного иммунодефицита [1]. В этой связи возникает необходимость в коррекции иммунитета, в применении препаратов, восстанавливающих иммунологические нарушения. Одним из перспективных направлений коррекции иммунитета является использование средств для повышения функциональной активности иммунной системы. Определенное место среди таких средств, обладающих способностью стимулировать иммунную систему, занимают препараты на основе цитокинов. Иммунокоррекция на базе цитокинов в основном связана с применением интерферонов [2,3].

Механизм действия интерферона заключается в воздействии на клетки через её специфический рецептор. Интерферон не препятствует проникновению вируса в клетку. Под его воздействием в клетке синтезируются протеины, которые препятствуют размножению вируса в клетке и тормозят его репродукцию, стимулируют активность Т-лимфоцитов и макрофагов. Интерфероны обладают выраженным противовирусным, иммуномодулирующим эффектом, активизируют защитные силы организма [4,5].

Иммуномодуляторы (*modulation*- перемена состояния, изменение) – это препараты, восстанавливающие функции иммунной системы.

В настоящее время изучены три класса интерферонов (ИФН):  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . Лейкоциты синтезируют  $\alpha$ -ИФН, фибробласты –  $\beta$ -ИФН, макрофаги, моноциты –  $\gamma$ -ИФН. Наиболее широко применяется  $\alpha$ -ИФН, его получают из лейкоцитов человека (человеческий интерферон), лейкоцитов свиньи (свиной лейкоцитарный интерферон). Следует отметить видоспецифичность интерферонов. В последнее время получен свиной рекомбинантный  $\alpha$ -ИФН путем клонирования гена ИФН в клетках бактерий *E.coli* [6].

Индукторы интерферона индуцируют выработку эндогенного интерферона. Они представляют собой разнородные по составу семейство высоко- и низкомолекулярных природных и синтезированных соединений. Установлено, что почти все вирусы стимулируют выработку интерферона [7]. Наиболее активными индукторами интерферона вирусной природы являются парамиксовирусы, ортомиксовирусы, тогавирусы. В частности, активным индуктором интерферона является вирус болезни Ньюкасла [8], аденовирус-5 [9].

Интерферон выводится из организма после его применения через 12–24 часа, индуктор интерферона – через 24–48 часов. Очевидно, что для достижения нужной терапевтической концентрации их в крови требуются повторные введения препаратов.

Российскими учеными (Левагина Г.М., Аликин Ю.С., Масычева В.И. и др.) разработаны индукторы интерферона пролонгированного действия (провест, ридостин) на основе двуспиральной РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Их действие сохраняется до 5 суток после однократного введения животным [10].

Известны иммуностимуляторы – препараты микробного, растительного происхождения, а также синтетические. Альвеозан – полисахарид, получен из бактерии *B. alvei*. Литературные данные свидетельствуют о том, что он обладает иммуностимулирующими свойствами и применяется в качестве иммуностимулятора, повышающего естественную резистентность организма животных и активизирует поствакцинальный иммунитет [11, 12].

Интерферон как иммуномодулятор применяется в виде монопрепарата, а также в сочетании с другими препаратами. Установлено, что сочетанное применение интерферона с антибиотиками и витаминами усиливает действие интерферона и витаминов, входящих в состав препарата [13]. Китайские ученые [14] сообщили о том, что экспериментальное введение мышам интерферона в комбинации с вакциной против бешенства животных усиливало действие вакцины.

В доступной литературе мы не нашли сообщений о совместном применении для коррекции иммунитета иммуномодуляторов – интерферона и индуктора интерферона с иммуностимулятором «Альвеозан».

**Целью работы** было изучение в научно-производственном опыте иммунологической эффективности комплексного биологического препарата на основе интерферона свиного рекомбинантного, индуктора интерферона «Провест» и иммуностимулятора «Альвеозан».

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыт проводили в свиноводческом хозяйстве Минской области, небогатополучном по РРСС, на 224 поросятах в возрасте 30-40 дней. Было сформировано 7 групп поросят.

Поросятам 1-ой опытной группы (44 головы) внутримышечно однократно вводили интерферон свиной рекомбинантный (1 мл) с альвеозаном (1 мл). Интерферон свиной рекомбинантный – противовирусный и иммуномодулирующий препарат, изготовитель ООО «НПЦ Белагроген», г. Горки, Могилевской области, ТУ ВУ 790624352.001-2010, серия и контроль №4, изготовлен в 2013 г., срок годности – 1 год. Альвеозан – иммуностимулятор, изготовитель РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселесского», г. Минск, ТУ ВУ 600049853.169-2011, серия и контроль №4, изготовлен в 2013 г., срок годности – 1 год. Поросятам 2-й группы (76 гол.) – интерферон свиной рекомбинантный (1 мл); поросятам 3-й группы (5 гол.) – индуктор интерферона «Провест» (1 мл) с альвеозаном (1 мл). Индуктор интерферона «Провест» – иммуномодулятор, производитель ООО «Диафарм», г. Бердск-10, РФ, изготовлен 20.04.2009, срок годности – 3 года. Поросятам 4-й группы (5 гол.) – индуктор интерферона «Провест» (1 мл). Поросят 5-й группы (7 гол.) привили инактивированной вакциной против РРСС и парвовирусной инфекции (2 мл), изготовитель – ФГУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир. Предварительно за сутки до введения вакцины поросятам 5-й группы ввели интерферон свиной рекомбинантный (1 мл) с альвеозаном (1 мл). Поросят 6-й группы (3 гол) привили названной вакциной (2 мл) без предварительной обработки их комплексным биологическим препаратом на основе интерферона свиного рекомбинантного и альвеозана. Поросят 7-й группы (84 гол) не обрабатывали комплексным биологическим препаратом и они служили контролем.

До введения и через 21 день после введения комплексного биологического препарата у поросят отбирали пробы крови. Одну часть крови стабилизировали гепарином для получения стабилизированной крови для определения количества Т- и В-лимфоцитов, вторую часть использовали с целью получения сыворотки крови для определения ее бактерицидной, лизоцимной активности и фагоцитарной активности лейкоцитов. Количество Т-лимфоцитов определяли в реакции Е-розеткообразования с эритроцитами барана, В-лимфоцитов – с эритроцитами мыши.

Для выделения лимфоцитов использовали 35%-ный раствор сахарозы на физиологическом растворе (плотность 1,077 г/мл), который разливали по 3 мл в пробирки и наслаивали 3 мл стабилизированной крови поросят, цен-

трифугировали 15 мин при 1800 об/мин. Отсасывали лимфоциты, которые находились в узкой интерфазе между градиентом плотности и плазмой, трижды отмывали физиологическим раствором. Надосадочную жидкость декантировали. Определяли концентрацию лейкоцитов в камере Горяева и доводили ее до 2–4 млн. клеток в 1 мл.

В пробирки наливали по 0,25 мл суспензии лимфоцитов и вносили по 0,25 мл 0,5%-ной взвеси эритроцитов барана. Смесь инкубировали 15 мин при температуре 37°C, центрифугировали 5 мин при 800 об/мин, затем ставили на ночь в холодильник при 4...8<sup>0</sup>С. Из смеси лимфоциты + эритроциты барана готовили мазки-отпечатки на обезжиренных предметных стеклах и окрашивали по Романовскому-Гимза. Результаты исследования учитывали путем микроскопии препаратов с иммерсией (объектив  $\times 90$ , окуляр  $\times 7$ ) и оценивали по количеству лимфоцитов с прикрепившимися не менее чем тремя эритроцитами на 100 подсчитанных лимфоцитов. Количество Т-лимфоцитов (%) определяли путем деления количества розеткообразующих лимфоцитов на общее количество лейкоцитов.

Количество В-лимфоцитов в стабилизированной крови поросят определяли по аналогичной методике, но с эритроцитами мыши.

Бактерицидную активность сыворотки крови поросят определяли по методу Смирновой и Кузьминой (1979), лизоцимную активность – по Дорофейчуку (1966).

Эффективность двух вариантов комплексного биологического препарата на основе интерферона свиного рекомбинантного и альвеозана, индуктора интерферона «Провест» и альвеозана оценивали по иммунологическим показателям – по количеству Т- и В- лимфоцитов в крови, бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови, фагоцитарной активности лейкоцитов, а так же по количеству заболевших, павших и выживших поросят в опытных и контрольной группах. Уровень антител к вирусу РРСС до и после введения вакцины против РРСС и парвовирусной инфекции определяли в ИФА.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Результаты изучения эффективности двух вариантов комплексного биологического препарата в научно-производственном опыте представлены в таблице 1.

Установлено, что количество Т-лимфоцитов в крови поросят, обработанных комплексным биологическим препаратом на основе интерферона свиного рекомбинантного и альвеозана, была на 9,9% выше количества Т-лимфоцитов в группе поросят, обработанных интерфероном свиным рекомбинантным без иммуностимулятора «Альвеозан». Количество Т-лимфоцитов в крови поросят, обработанных комплексным биологическим препаратом на основе индуктора интерферона «Провест», было на 9,6% выше по сравнению с количеством Т-лимфоцитов в группе поросят, обработанных одним индуктором интерферона «Провест».

Таблица 1 – Количество Т- и В-лимфоцитов в крови поросят, обработанных комплексным биологическим препаратом на основе свиного рекомбинантного интерферона, индуктора интерферона и альвеозана

№ п/п	Группы поросят	Кол-во проб крови	Показатели количества лимфоцитов,%			
			Т-лимфоциты	Разница в % по сравнению с контролем	В-лимфоциты	Разница в % по сравнению с контролем
1.	Интерферон+альвеозан	10	43,3±0,49***	48,3	29,8±0,32	22,6
2.	Интерферон	15	40,4±8,75	38,4	26,8±2,57	10,3
3.	Индуктор интерферона+альвеозан	5	36,8±3,64	26	27,7±3,98	14
4.	Индуктор интерферона	5	34,0±4,07	16,4	25,8±1,82	6,2
5.	Контрольная группа	10	29,2±1,07	–	24,3±2,55	–

Примечание—\*\*\*- $P \leq 0,001$ .

Показатели количества В-лимфоцитов в названных группах поросят составили соответственно 12,3–7,8%.

Показатели неспецифической резистентности организма поросят, обработанных двумя вариантами комплексного биологического препарата, приведены в таблицах 2, 3.

Таблица 2 – Фагоцитарная активность лейкоцитов крови поросят после введения образцов комплексного биологического препарата, %

Группа животных	Срок взятия крови	
	До введения КБП	Через 21 день после введения
Опытная группа 1	17,8±0,7	22,3±1,16*
Опытная группа 2	16,8±0,43	20,0±0,23*
Опытная группа 3	17,7±0,52	24,1±0,91**
Опытная группа 4	19,0±1,31	19,9±0,54
Контрольная группа 5	15,6±0,72	18,1±0,59

Примечание—\*- $P \leq 0,05$ ; \*\*- $P \leq 0,01$

Из таблицы 2 видно, что через 21 сутки после введения поросьятам испытуемых образцов препарата происходит достоверное (в сравнении с контрольной группой) увеличение фагоцитарной активности лейкоцитов в 1-й, 2-й и 3-й опытных группах на 4,5% ( $P \leq 0,05$ ), 3,2% ( $P \leq 0,05$ ) и 6,4% ( $P \leq 0,01$ ).

Таблица 3 – Бактерицидная и лизоцимная активность сыворотки крови поросят после введения образцов комплексного биологического препарата

Срок взятия крови	Группы животных	Показатели	
		Лизоцимная активность сыворотки крови, %	Бактерицидная активность сыворотки крови, %
До введения КБП	ОГ 1	16,6±0,31	47,5±0,4
	ОГ 2	18,4±0,65	50,3±2,6
	ОГ 3	16,6±0,35	49,4±0,79
	ОГ 4	17,4±0,4	53,7±4,66
	Контрольная	17,9±0,64	48,6±0,21
Через 21 день после введения	ОГ 1	19,9±0,5*	58,3±0,9*
	ОГ 2	19,7±0,44*	60,2±1,8*
	ОГ 3	16,5±0,29	53,7±1,41
	ОГ 4	20,7±0,76*	57,3±1,75
	Контрольная	17,4±0,55	51,7±1,51

Примечание—\* –  $P \leq 0,05$ ; ОГ – опытная группа.

Проведенные исследования свидетельствуют о стимулирующем действии разработанных двух вариантов препарата на активность лизоцима в крови поросят. Отмечено достоверное ( $P \leq 0,05$ ) в сравнении с контролем увеличение данного показателя в 1-ой, 2-ой и 4-ой опытных группах на 3,3, 1,3 и 3,3% соответственно через 21 сутки после введения образцов комплексного биологического препарата.

Как следует из данных таблицы 3, через 21 сутки после введения поросятам двух вариантов комплексного биологического препарата бактерицидная активность сыворотки крови в опытной 1-й и 2-й группах поросят достоверно ( $P \leq 0,05$ ) увеличивалась по отношению к показателям в контрольной группе на 10,8 и 9,9% соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что применение интерферона и индуктора интерферона в комплексе с иммуностимулятором «Альвеозан» сопровождается более выраженной иммунологической реакцией в организме поросят по сравнению с применением интерферона или индуктора интерферона без иммуностимулятора.

При исследовании сывороток крови от трех поросят, которым за 24 часа до вакцинации вводили комплексный биологический препарат на основе интерферона с альвеозаном, установили, что до введения вакцины против РПСС и парвовирусной инфекции свиной специфические антитела к вирусу РПСС отсутствовали. Через 21 и 35 дней после вакцинации их титр составил 1:4787 и 1:7345 соответственно. В группе поросят (3 гол.), привитых вакциной без предварительной обработки их комплексным биологическим препаратом, титр антител к вирусу РПСС через 21 день составил 1:1988. Сохранность поросят в опытных и контрольной группах приведена в таблице 4.

Таблица 4 – Сохранность поросят в опытных и контрольной группах в научно-производственном опыте

№ п/п	Группы поросят	Кол-во поросят	Количество голов					
			Заболело	%	Пало	%	Остались живыми	%
1.	Интерферон+ альвеозан	44	7	15,9	2	4,5	42	95,5
2.	Интерферон	76	11	14,5	3	3,9	73	96,0
3.	Индуктор интерферона+альвеозан	5	0	0	0	0	5	100
4.	Индуктор интерферона	5	0	0	0	0	5	100
5.	Обработаны интерфероном+альвеозан и привитые вакциной	7	0	0	0	0	0	100
6.	Привитые вакциной	3	0	0	0	0	0	3
7.	Контроль	84	12	14,3	10	11,9	74	88,1

## ВЫВОДЫ

1 Испытание эффективности двух вариантов комплексного биологического препарата (КБП) на основе интерферона свиного рекомбинантного и альвеозана, индуктора интерферона «Провест» и альвеозана в научно-производственном опыте показало, что оба варианта биологического препарата обладают иммунологической эффективностью. Применение их поросятам в возрасте 30-40 дней приводит к достоверному увеличению количества Т- и В-лимфоцитов в крови, повышению бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови и повышение фагоцитарной активности лейкоцитов.

2 Применение поросятам интерферона свиного рекомбинантного и индуктора интерферона «Провест» без иммуностимулятора «Альвеозан» также сопровождается повышением количества Т- и В-лимфоцитов, уровня бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови, фагоцитарной активности лейкоцитов крови. Однако они были ниже показателей в крови поросят, обработанных комплексным биологическим препаратом на основе интерферона и альвеозана, индуктора интерферона и альвеозана.

3 Применение поросятам комплексного биологического препарата на основе интерферона свиного рекомбинантного и альвеозана за 24 часа до введения инактивированной вакцины против РРСС и парвовирусной инфек-

ции свиней стимулирует антителообразование к вирусу РРСС. Титр антител к вирусу РРСС через 14 дней после вакцинации составил 1:4787, через 35 дней – 1:7345. До вакцинации антитела к вирусу РРСС отсутствовали. У поросят, привитых вакциной без предварительной обработки интерфероном с альвеозаном, через 21 день титр антител к вирусу РРСС составил 1:1988.

4 Применение комплексного биологического препарата на основе интерферона свиного рекомбинантного и альвеозана, индуктора интерферона «Провест» и альвеозана позволяет на 7,4% снижать падеж поросят и повышать их сохранность.

## ЛИТЕРАТУРА

1 Хмылов, А.Г. Коррекция иммунной системы поросят на промышленных комплексах // Свиноводство. – 2010, №5. – С. 47–49.

2 Гавриков А.В. Препараты интерферона ЗАО «Мосагроген» // [и др. ] Ветеринарии. – 2010, №7. – с. 14–18.

3 Машковский, М.Д. Препараты, корригирующие процессы иммунитета (иммуномодуляторы, иммунокорректоры) // В кн.: Лекарственные средства (пособие для врачей). – 1993. – часть 2. – с. 192–209.

4 Хмылов, А.Г. Профилактика вторичных иммунодефицитов поросят миксоферомом // Степанов Е.М. Ветеринария. – 2006, №12. – с. 9–10.

5 Хантов, Р.М., Пинегин Т.В. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения // Иммунология. – 2000, №5. – с. 4–7.

6 Трубицына, М.В., Клонирование и экспрессия гена свиного лейкоцитарного  $\alpha$ -интерферона в клетках бактерий *E.coli* // Потапович М.И., Прокулевич В.А. Труды Белорусского государственного университета Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2008, том 3, часть 1. – с. 80-84.

7 Epstein, O.I., Dugina M.V., Kachanova S.A. et al. Antiviral Aktiviti of Antibodies to Interferon – Gamma in ultra – Low Doses // Вестник международной академии наук (русская секция). 2008. 2. P.20-23.

8 Лаптев, С.В., Общая биология и микробиология. Основы вирусологии. Особенности репродукции вирусов. Учебное пособие для модульно-рейтинговой технологии обучения // Мезенцева Н.И. 2005. – Изд-во Алтайского технологического ун-та. – 164 С.

9 Susan, L. Brockmeier, Crystal L. Loving, Eric A. Nelson et al. The presence of Alpha Interferon at the Time of Infection on Alters the innate and Adaptive Immune Responses to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus // Clinical and Vaccine immunology. – April 2012, Nol.19, №4. – p.508-514.

10 Патент РФ №2172631 кл. А61К31/70, А61К31/7105, А61К47/06, 27.08.2001.

11 Дубина, И.Н. Альвеозан как средство активизации естественной резистентности кроликов // Гласкович А.А., Красочко П.А. Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – Горки. – 2000. – с. 233-

238.

12 Красочко, П.А. Активизация поствакцинального иммунитета у телят с помощью препарата альвеозан // Актуальные проблемы патологии с.-х. животных. Материалы международной научно-практической конференции. – Минск. – 2000. – с. 120-123.

13 Прокулевич, В.А. Ветеринарные препараты на основе интерферона //Потапович М.И. Вестник Белорусского государственного университета.- 2011. – серия 2. - №3. – с. 51-55.

14 Hui, Qi et al. Study on using Rabies Vaccine and Interferon – alfa-2b for Antirabies protective Effect of Mouse // J. of Anhui Agricultural Sciences. – 2008 – 09.