УДК 619:615.37:636.22/.28

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент
Згировская А.А., кандидат биологических наук
Толяронок Г.Е., кандидат ветеринарных наук
Морозов А.М., младший научный сотрудник
Герасименко В.И., ведущий технолог
Виршич А.В., ведущий технолог

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

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА «РЕСПИФАГ» НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГА И ИММУНОСТИМУЛЯТОРА НА ОБМЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ И ИММУНИТЕТ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Резюме

Статья посвящена изучению терапевтической и профилактической эффективности ветеринарного препарата при респираторной патологии у телят. Препарат оказывает иммуностимулирующее действие на организм молодняка крупного рогатого скота.

Summary

The article is devoted to the study of therapeutic and prophylactic efficacy of the veterinary preparation at respiratory pathology in calves. The preparation has immunostimulating effect on the organism of young cattle.

Поступила в редакцию 12.11.2019 г.

ВВЕДЕНИЕ

Всесторонние исследования по изучению бактериофагов, выполненные за последние 40−45 лет, позволили широко использовать их для решения многих задач в микробиологии, вирусологии, генетике, биохимии, иммунологии, радиобиологии, биотехнологии и других областях биологии. Поэтому бактериофагия, развивающаяся вначале как узкая область медицинской микробиологии, в настоящее время приобрела общебиологическое значение [1, 2, 8].

Бактериофаги являются отличной альтернативой антибиотикам, поскольку, по сравнению с химическими препаратами, обладают следующими преимуществами [3, 4, 10]:

- высоко специфичны при лечении инфекций, не подавляют нормальную микрофлору и не нарушают естественный баланс внутренней среды организма, т.е. фаготерапия является этиотропной, специфической;
- не имеют противопоказаний к применению;
- могут использоваться не только для лечения, но и для профилактики бактериальных инфекций;
- не вызывают развития резистентности микроорганизмов;
- оказывают стимулирующее влияние на гуморальное и клеточное звенья иммунитета;
- не обладают токсическим, аллергическим и тератогенным эффектами;
- эффективны в монотерапии, но могут применяться и в комбинации с другими препаратами, в т.ч. с антибиотиками и пробиотиками.

Бактериофаги широко используются в ветеринарии в качестве лечебных и профилактических средств, особенно эффективен стафилококковый бактериофаг при лечении маститов у коров. Препараты бактериофага назначают внутрь при заболеваниях внутренних органов либо местно, непосредственно на очаг поражения. Действие фага проявляется уже через 2–4 часа после его введения (что особенно важно в условиях реанимации). Бактериофаги проникают в кровь, лимфу и выводятся через почки, санируя мочевыводящие пути [5, 6, 7, 9].

Средства с бактериофагами широко применяются для лечения животных в следующих случаях:

- при необходимости профилактирования и лечения болезней птиц и животных, имеющих бактериальную этиологию;

- при гнойно-воспалительных заболеваниях слизистых оболочек глаз и ротовой полости;

- при профилактике гнойно-воспалительные осложнений, когда речь идёт о лечении ожогов, различного рода ран, а также после проведения хирургических операций;

- велика роль средств с бактериофагами в профилактике и лечении у молодняка животных желудочно-кишечных заболеваний, являющихся проблемой, сопряжённой с огромным экономическим ущербом, который повсеместно терпят животноводческие хозяйства [4, 5, 6, 7].

В связи с вышеизложенным разработка препаратов на основе бактериофагов представляется актуальной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отработку оптимальных терапевтических доз препарата «Респифаг» проводили в ОАО «Агрофирма имени Суворова».

Были сформированы 7 групп телят по 5 голов в возрасте от 2 до 4 месяцев с признаками респираторной патологии. Животным первой группы вводили трахеально препарат в объеме 2 мл, содержащий бактериофаг клебсиелловый с титром $3,5\times10^5$ БОЕ/мл и вспомогательный компонент липополисахарид в концентрации 10 мкг/кг. Телятам второй группы вводили такой же объем препарата с указанным выше титром и концентрацией липополисахарида 20 мкг/кг. Третья группа животных получала препарат в таком же объеме и с таким же титром, но концентрация липополисахарида составляла 30 мкг/кг. Четвертая, пятая и шестая группы получали препарат в объеме 5 мл с концентрацией вспомогательного компонента 10, 20 и 30 мкг/кг соответственно. Седьмая группа была контрольной, препарат телятам не вводили, они получали симптоматическое лечение. Всем животным опытных групп препарат вводили в течение 5 суток. Наблюдение за животными осуществляли в течение 21 суток. Эффективность препарата оценивали по общему состоянию здоровья телят, поедаемости корма, лизоцимной активности сыворотки крови, бактерицидной активности сыворотки крови, фагоцитарному показателю, количеству Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов.

У всех животных отбирали образцы крови до применения препарата, а также через 14 и 21 день после применения препарата.

Терапевтическую эффективность препарата оценивали в опыте, схема которого описана выше.

Для оценки профилактической эффективности препарата исследования проводили на здоровых телятах. Было сформировано 3 группы животных по 10–12 голов в каждой. Животным 1-й опытной группы вводили интратрахеально клебсиелловый бактериофаг в объеме 5 мл с титром $3,5\times10^5$ БОЕ/мл и вспомогательный компонент липополисарид в концентрации 30 мкг/мл в течение 3–5 суток, 2-й опытной группе – интратрахеально клебсиелловый бактериофаг в объеме 2 мл с титром $3,5\times10^5$ БОЕ/мл и липополисарид в концентрации 10 мкг/мл в течение 3–5 суток, животные 3-й группы (контрольной) обрабатывались изотоническим раствором хлорида натрия.

Для изучения влияния комплексного препарата в дозе 2 мл клебсиеллового бактериофага интратрахеально с титром $3,5\times10^5$ БОЕ/мл и вспомогательного компонента в дозе 10 мкг/кг на обменные процессы и иммунитет была сформирована группа телят в количестве 5 голов. У животных отбирали образцы крови до применения препарата и через 21 сутки после применения.

Одну часть крови стабилизировали гепарином для определения количества Т- и В-лимфоцитов, вторую часть использовали для получения сыворотки крови. В сыворотке крови определяли бактерицид-

ную, лизоцимную активность, фагоцитарную активность лейкоцитов, биохимические и гематологические показатели крови.

Содержание Т- и В-лимфоцитов определяли методом розеткообразования со стабилизированными эритроцитами барана и мыши по Д.К. Новикову и В.И. Новиковой (1979), бактерицидную активность сыворотки крови – по О.В. Смирновой и Т.Н. Кузьминой (1966), лизоцимную активность сыворотки крови – по В.Г. Дорофейчуку (1968), фагоцитарную активность лейкоцитов – по Д.К. Новикову и В.И. Новиковой (1979).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для отработки оптимальных терапевтических доз комплексного препарата «Респифаг» на основе клебсиеллового бактериофага и вспомогательного компонента иммуностимулятора в виде липополисахарида были сформированы по принципу аналогов 7 групп телят, которым вводили препарат, содержащий разное количество бактериофага и липополисахарида. Влияние данного препарата на животных определяли по показателям лизоцимной, бактерицидной активности крови, фагоцитарному показателю. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Показатели лизоцимной, бактерицидной активности крови, фагоцитарного показателя телят, получавших препарат «Респифаг»

Срок отбора крови	Группы телят	Лизоцимная активность сыворотки крови, %	Бактерицидная активность сыворотки крови, %	Фагоцитарный показатель, %
До введения	ОГ 1	8,34±0,44	32,82±0,51	29,6±2,01
	ОГ 2	7,56±1,00	30,43±0,08	23,2±1,53
	ОГ 3	7,81±0,89	33,32±0,56	21,4±0,50
	ОГ 4	8,76±0,76	33,3±0,64	30,6±3,42
	ОГ 5	5,95±0,41	32,85±1,16	24,8±1,59
	ОГ 6	6,89±0,89	33,32±1,61	24,6±1,80
	контрольная	10,25±0,94	33,91±0,64	25,6±1,25
Через 14 дней после введения	ОГ 1	13,12±1,24	41,92±2,21	32,2±0,80
	ОГ 2	11,17±0,31	31,77±0,8	32,8±0,58
	ОГ 3	8,54±0,39	28,3±2,95	29±1,34
	ОГ 4	12,31±0,59	29,02±2,51	32,2±1,01
	ОГ 5	13,82±0,71	41,51±3,5	32,4±1,43
	ОГ 6	10,92±0,77	40,76±2,25	31±1,92
	контрольная	9,68±0,20	30,81±1,45	25,4±1,89
Через 21 день после введения	ОГ 1	13,07±1,20	41,28±2,71	40±3,35
	ОГ 2	11,46±0,99	34,794±2,07	27,4±2,01
	ОГ 3	8,71±0,4	32,47±3,7	35,4±5,53
	ОГ 4	12,38±0,54	35,72±3,73	35,2±5,65
	ОГ 5	11,27±0,69	39,0±4,02	39,4±3,0
	ОГ 6	11,14±0,63	34,39±0,71	43±4,3
	контрольная	9,93±0,19	29,65±1,46	31,8±3,41

Как видно из таблицы 1, у животных первой группы, получавших препарат в объеме 2 мл, содержащий клебсиелловый бактериофаг с титром $3,5\times10^5$ БОЕ/мл и 10 мкг/кг иммуностимулятора, показатели лизоцимной и бактерицидной активности крови выше на 21-е сутки после его введения по сравнению с животными других групп (13,07 и 41,27 соответственно), фагоцитарный показатель достигал величины 40 %, что свидетельствует об иммуностимулирующей активности препарата.

В таблице 2 представлены результаты содержания Т- и В-лимфоцитов в крови подопытных животных.

Таблица 2. – Влияние комплексного препарата на формирование Т- и В-лимфоцитов

Срок отбора крови	Группы телят	Т-лимфоциты, %	В-лимфоциты, %
До введения	ОГ 1	24,8±1,02	14,4±0,75
	ОГ 2	25,6±0,98	17±1,48
	ОГ 3	23±1,58	15,4±2,29
	ОГ 4	22,8±2,03	16,6±0,67
	ОГ 5	24,6±2,08	14,8±0,58
	ОГ 6	25,6±2,61	14,8±0,8
	контрольная	23,4±0,68	15±0,45
Через 21 день после введения	ОГ 1	30,4±2,16	24,6±2,38
	ОГ 2	29,6±2,56	24,4±0,98
	ОГ 3	23,6±1,16	19±2,86
	ОГ 4	30±2,19	27,2±2,87
	ОГ 5	30,2±6,06	25,8±4,74
	ОГ 6	20±1,67	22,6±2,13
	контрольная	22,6±1,12	15,4±0,40

Как видно из таблицы 2, если судить по содержанию Т- и В-лимфоцитов, состояние иммунной системы у животных первой группы более стабильное. Концентрация Т-лимфоцитов составила 30,4 % по сравнению с контрольной группой (22,6 %), а В-лимфоцитов – 24,6 % по сравнению с контролем (15,4 %). Эти показатели были выше, чем у животных других опытных групп. Увеличение объема вводимого препарата не привело к заметному увеличению перечисленных показателей.

Следует заметить, что во всех опытных группах состояние животных было лучше, чем в контрольной группе, хотя этот показатель является субъективным. Признаки респираторной патологии у животных опытных групп исчезли на 10-е сутки, а в контрольной – через 20 дней. Животные опытных групп более охотно поедали корм.

Таким образом, нами установлено, что наиболее эффективным является препарат «Респифаг», вводимый интратрахеально в объеме 2 мл с титром клебсиеллового бактериофага $3,5\times10^5$ БОЕ/мл и концентрацией вспомогательного компонента липополисахарида 10 мкг/кг. Увеличение объема вводимого препарата до 5 мл не приводило к заметному улучшению показателей лизоцимной, бактерицидной активности крови телят и фагоцитарного показателя, увеличению содержания Т- и В-лимфоцитов.

При проведении исследований по изучению терапевтической и профилактической эффективности препарата «Респифаг» установлено, что введение препарата приводило к увеличению лизоцимной активности сыворотки крови на 23,3–45,6 %, бактерицидной активности сыворотки крови – на 43,1–58,0 %, фагоцитарного показателя – в 2,3–2,5 раза, количества Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов – на 10–25 %, что свидетельствует о выраженной иммуностимулирующей активности разработанного препарата.

Терапевтическую эффективность препарата ветеринарного «Респифаг» на основе клебсиеллового бактериофага и иммуностимулятора (липополисахарида) при респираторных заболеваниях молодняка крупного рогатого скота оценивали по количеству выздоровевших и повторно забо-

левших животных, срокам лечения, сохранности животных в опытных и контрольных группах.

Результаты применения препарата ветеринарного «Респифаг» с целью изучения лечебного эффекта представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Изучение лечебной эффективности препарата ветеринарного «Респифаг» при респираторной патологии телят в ОАО «Агрофирма имени Суворова» Борисовского района Минской области

Показатели	Ед. измерения	Опытная группа	Контрольная группа
Количество животных в группе	голов	15	12
Выздоровело	голов	13	5
	%	86,7	41,7
Длительность лечения	дней	3,3	7
Повторно заболело	голов	2	7
	%	13,3	58,3
Пало и вынужденно убито	голов	0	1
	%	0	8,33

Как видно из таблицы 3, в опытной группе при применении препарата «Респифаг» выздоровело 13 телят, что составляет 86,7 %, в то время как в контрольной – 5 телят (41,7 %). Длительность лечения сократилась на 3,6 дня. После применения ветеринарного препарата в опытной группе повторно заболело 2 теленка (13,3 % животных), а в контрольной – 7 телят (58,3 %). Следует отметить, что в опытной группе все телята сохранились, в то время как в контрольной 1 теленок погиб.

Показателем профилактической эффективности служила частота заболеваемости молодняка крупного рогатого скота респираторными заболеваниями, сохранность животных.

Результаты применения препарата «Респифаг» в качестве профилактического препарата представлены в таблице 4.

Таблица 4. – Изучение профилактической эффективности препарата ветеринарного «Респифаг» в ОАО «Агрофирма имени Суворова»

Показатели	Ед. измерения	Опытная группа	Контрольная группа
Количество животных в группе	голов	12	10
Заболело	голов	1	6
	%	8,33	60,0
Выздоровело	голов	1	5
	%	8,33	50,0
Пало и вынужденно убито	голов	0	1
	%	0	10,0

Как видно из таблицы 4, в опытной группе из 12 телят заболело только одно животное (8,33 %), а в контрольной группе – 6 телят (60,0 %). В опытной группе заболевший теленок выздоровел после применения препарата, в контрольной группе пало 1 животное (10 %). Таким образом, профилактическая эффективность препарата «Респифаг» составляет 91,67 %.

Иммунологическую эффективность препарата и его влияние на обменные процессы животных оценивали по количеству Т- и В-лимфоцитов в крови телят, биохимическим и гематологическим показателям крови.

Результаты изучения влияния препа-

рата на основе клебсиеллового бактериофага и иммуностимулятора в виде полисахаридной фракции, полученной из штамма бактерий *Bacillus subtilis*, на гематологические показатели организма телят представлены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5. – Гематологические показатели крови телят 120-дневного возраста после введения препарата «Респифаг» (n=5)

Схема отбора крови	Эритроциты, 10^{12}/л	Средний объем эритроцитов (MCV), мкм^3	Лейкоциты, 10^9/л	Тромбоциты, 10^9/л	СОЭ, мм/ч
До введения препарата	6,98±0,28	37,8±0,29	11,15±0,42	550,2±30,8	0,18±0,05
Через 21 день после введения препарата	7,48±0,64	41,1±0,51	9,5±0,38	668,8±43,5	0,15±0,049

Примечание – $P \leq 0,05$

Проведенный анализ гематологических исследований показал, что введение препарата не вносит каких-либо значительных изменений в состав крови телят 120-дневного возраста. Однако следует заметить, что применение препарата приводит к количественному изменению компонентов крови, а именно, достоверно увеличивается количество эритроцитов с 6,98±0,28x10^{12}/л до 7,48±0,64x10^{12}/л, уменьшается количество лейкоцитов с 11,15±0,42x10^9/л до 9,5±0,38x10^9/л, что свидетельствует о купировании воспалительного процесса. Тем не менее, эти показатели остаются в пределах физиологической нормы для телят этой возрастной группы.

Тромбоциты принимают активное участие в свертывании крови и неспецифических защитных реакциях организма. В нашем опыте форменные элементы крови варьируют от 550,2±30,8x10^9/л до 668,8±43,5x10^9/л. Скорость оседания эритроцитов в норме для телят 120-дневного возраста составляет 0,1–0,2 мм/ч, в нашем случае этот показатель находится в пределах физиологической нормы.

Таблица 6. – Изучение содержания гемоглобина в эритроцитах крови телят 120-дневного возраста после введения препарата «Респифаг» (n=5)

Схема отбора крови	Гемоглобин, г/л	Гематокрит, %	Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH) nr	Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, г/дл	Цветной показатель
До введения препарата	97,8±6,3	39,3±0,23	12,96±1,06	34,0±2,31	0,98±0,06
Через 21 день после введения препарата	111,0±7,2	40,9±0,39	13,02±1,1	34,0±2,31	1,05±0,07

В нашем эксперименте количество гемоглобина до введения препарата составляло 97,8±6,3 г/л и 111,0±7,2 г/л после применения препарата. Анализируя полученные результаты, можно сказать о благоприятном влиянии препарата на организм телят.

На содержание гемоглобина в эритроците указывает цветной показатель, норма которого – 0,81–1,08 % Полученный цифровой материал свидетельствует о том, что насыщение эритроцитов гемоглобином происходило в нормативном диапазоне –

от 0,98 до 1,05. О нормальном функционировании эритроцитов говорит их объем. Удельный вес форменных элементов крови в общем объеме, главным образом эритроцитов, отражает гематокрит. В нашем опыте по мере увеличения эритроцитарной массы в крови гематокрит возрастает с 39,3 % до 40,9 %, что отражает эффективность примененного препарата.

Результаты изучения показателей минерального обмена телят до и после введения препарата представлены в таблице 8.

Таблица 7. – Результаты изучения показателей минерального обмена у телят

Схема отбора крови	Са, ммоль/л	Р неорганический, ммоль/л	Магний, ммоль/л	Железо, мкмоль/л
До введения препарата	2,9±0,32	6,0±0,06	1,2±0,03	26,7±3,21
Через 21 день после введения препарата	3,0±0,53	05,97±0,04	1,2±0,03	27,1±2,99

Динамика полученных данных, представленных в таблице 7, свидетельствует о том, что исследуемый образец препарата не оказывает существенного влияния на минеральный обмен животных.

В таблице 8 приведены показатели белкового обмена у телят до и после введения препарата.

Таблица 8. – Состояние белкового обмена у телят после применения препарата «Респифаг» (n=5)

Схема отбора крови	Общий белок, г/л	Альбумины, г/л
До введения препарата	64,2±1,8	32,2±1,3
Через 21 день после введения препарата	66,0±1,5	32,5±1,3

После применения препарата достоверные изменения уровня общего белка и альбумина не наблюдаются.

Для оценки возможного влияния препарата на клетки печени были проведены исследования по определению содержания в сыворотке крови билирубина и холестерина, а также по изучению активности ферментов аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ), резервной щелочности, креатининкиназы (КК) (таблица 9, 10).

Таблица 9. – Результаты определения биохимических показателей, отражающих функциональное состояние печени телят

Схема отбора крови	АлАТ, Ед/мл	АсАТ, Ед/мл	ГГТ, Ед/мл	Резервная щелочность, $\%CO_2$
До введения препарата	26,7±1,32	38,8±2,16	1,2±0,03	54,5±3,21
Через 21 день после введения препарата	27,0±1,53	39,0±2,19	1,2±0,03	54,5±3,21

Примечание – $P \leq 0,05$

Установлено, что уровень ферментов, характеризующих функциональное состояние печени, не имеет отклонений от нормы на протяжении всего опыта, изменения их активности в крови животных незначительны.

Таблица 10. – Результаты определения биохимических показателей, отражающих функциональное состояние печени у телят

Схема отбора крови	КК, Ед/л	Холестерин, моль/л
До введения препарата	69,4±3,8	3,06±0,9
Через 21 день после введения препарата	69,8±3,5	2,5±1,03

Примечание – $P \leq 0,05$

По данным таблицы 10, отмечается достоверное уменьшение уровня холестерина с 3,06 моль/л до 2,5 моль/л. Уровень креатининкиназы остается в пределах физиологической нормы. В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что испытуемый препарат не оказывает повреждающего действия на печень, не нарушает ее функций и не приводит к холестазу.

ВЫВОДЫ

1. Отработаны наиболее оптимальные терапевтические дозы препарата «Респифаг». Препарат вводят телятам интратрахеально в объеме 2 мл с титром клебсиеллового бактериофага $3,5 \times 10^5$ БОЕ/мл и концентрацией вспомогательного компонента липополисахарида 10 мкг/кг.

2. Терапевтическая эффективность препарата «Респифаг» составляет 86,7 %. В опытной группе при применении препарата «Респифаг» выздоровело 13 телят, а в контрольной – 5 телят (41,7 %). Длительность лечения сократилась на 3,6 дня.

3. Профилактическая эффективность препарата «Респифаг» составляет 91,67 %. В опытной группе из 12 телят заболело только одно животное (8,33 %), а в контрольной группе – 6 телят (60,0 %).

4. Установлено, что препарат оказывает иммуностимулирующее действие на организм молодняка крупного рогатого скота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алешкин, А.В. Бактериофаги в инфекционной патологии: прошлое, настоящее и будущее/ А.В. Алешкин //Лекции по исследованию и применению бактериофагов. – Ульяновск, 2016. – С. 11–51.

2. Каттер, Э. Бактериофаги: биология и применение / Э. Каттер, А.М. Сулаквелидзе; под ред. Э. Каттер. – М.: Научный мир, 2012. – С. 159.

3. Определение спектра литической активности бактериофагов методом электрооптического анализа клеточных суспензий / О.И. Гулий [и др.] // Живые и биокосные системы. – 2014. – № 9.

4. Митрохина, Е.Н. Биологические свойства бактериофагов E.cloacae № 1487 и E.cloacae № 10005 / Е.Н. Митрохина, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Сб. науч. тр. Межрегион. научно-практ. конф. молодых ученых Приволжского федерального округа. – Самара, 2005. – С. 194–196.

5. Пожарникова, Е.Н. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов ENTEROBACTER, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения: автореф. … канд. биол. наук / Е.Н. Пожарникова. – Саратов, 2006.

6. Препарат бактериофага клебсиелл пневмонии: пат. РФ № 1697422 / Г.Г. Боговазова, В.М. Бондаренко, Н.Н. Ворошилова, Г.А. Горбаткова, Т.Б. Казакова. – Опубл. 10.08.2004.

7. Садртдинова, Г.Р. Бактериофаги клебсиелл: их роль и значение // Материалы IV Международной научно-практической конференции. – 2014.

8. Тикунова, Н.В. Бактериофаги – враги наших врагов / Н.В. , В.В. Власов // Наука из первых рук. – 2013. – № 2(50). – С. 58–69.

9. Adams, M. Bacteriophages / M. Adams, A. Medgiz. – 1961. – 521 p.

10. Mc Grath, S. Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology / S.Mc Grath, D. van Sinderen. – Horizon Scientific Press, 2007.