

УДК 619:615.37

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Зуйкевич Т.А., кандидат сельскохозяйственных наук¹
Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор²
Морозов А.М., младший научный сотрудник¹
Толяронок Г.Е., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Ястребов А.С., доктор ветеринарных наук, доцент¹

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск

²УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСНОГО ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА «НУКЛЕОЗАН» НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНАТА НАТРИЯ И ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ

Резюме

В статье изложены результаты разработки и испытаний комплексного иммуностимулирующего препарата «Нуклеозан». Основными компонентами препарата являются нуклеинат натрия и липополисахариды. Для пролонгации препарата использован поливинилпирролидон. Оптимальная доза изготовленного препарата «Нуклеозан» для молодняка крупного рогатого скота составляет 2,0 см³. Установлено также, что препарат «Нуклеозан» при совместном использовании с вакциной стимулирует иммуногенез у животных.

Summary

The article presents the results of the development and testing of the complex immunostimulating drug «Nucleosan». The main components of the preparation are: sodium nucleinate, lipopolysaccharides. To prolong the drug used polyvinylpyrrolidone. The optimal dose of the manufactured drug «Nucleosan» for young cattle is 2,0 cm³. It was also found that the drug «Nucleosan» when used together with the vaccine stimulates immunogenesis in animals.

Поступила в редакцию 24.10.2019 г.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальной проблемой молодняка сельскохозяйственных животных (телят, поросят) в хозяйствах Беларуси являются болезни органов дыхания и пищеварения (пневмоэнтериты). Причины их возникновения разнообразны и чаще всего связаны с нарушением технологии содержания и кормления животных [2, 10].

Для их лечения в ветеринарной практике широко применяются антибиотики и другие препараты. В последние годы появились работы, в которых отмечается возникновение микроорганизмов, устойчивых к некоторым антибиотическим препаратам. Все это снижает эффективность антибиотикотерапии при заболеваниях органов дыхания и пищеварения у молодняка сельскохозяйственных животных. В связи с

этим ведется научный поиск по получению препаратов, обладающих противовирусным и иммуностимулирующим действием [9].

В медицине и ветеринарии применяется интерферон, который подавляет репродукцию вирусов. Однако он быстро выводится из организма (в течение 12–24 часов после введения), поэтому требуются повторные введения. При этом установлено, что при его повторном применении у животных образуются антитела, которые снижают его эффективность [11, 12].

Таким образом, возникает необходимость в изыскании новых, эффективных препаратов, позволяющих сократить заболеваемость и отход молодняка сельскохозяйственных животных от этих заболеваний.

Цель работы – разработать техно-

логию изготовления комплексного иммуностимулирующего препарата на основе индуктора интерферона и липополисахаридов бактерий для терапии и профилактики ассоциированных пневмоэнтеритов молодняк сельскохозяйственных животных и повышения эффективности вакцинаций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В 2016–2018 гг. нами проведен скрининг препаратов, обладающих био- и иммуностимулирующими свойствами. Среди них препарат «Иммунат» производства ООО НПЦ «БелАгроГен», г. Горки Могилевской области, бактериальные липополисахариды, наночастицы цинка, янтарная кислота [3–6, 8].

При проведении скрининга препаратов оценивали показатели неспецифической резистентности организма (бактерицидную и лизоцимную активность сыворотки крови, фагоцитарную активность лейкоцитов), показатели иммунологической эффективности (количество Т- и В-лимфоцитов в крови животных). С этой целью проведен опыт на 24 кроликах живой массой 2,5–3,0 кг, которых разделили на 8 групп (по 3 головы в группе). Препараты вводили животным внутримышечно в дозе 1,0 см³ трехкратно с интервалом в 3 дня. Кроликам 1-й группы вводили препарат «Иммунат», 2-й – бактериальные липополисахариды в концентрации 500 мкг/см³, 3-й – наночастицы цинка в концентрации 0,01 мг/см³, 4-й – янтарную кислоту в концентрации 1,0 мг/см³, 5-й – смесь препарата «Иммунат» с липополисахаридами в соотношении 1:1, 6-й – смесь препарата «Иммунат» с наночастицами цинка в соотношении 1:1, 7-й – смесь препарата «Иммунат» с янтарной кислотой в соотношении 1:1, 8-й – стерильный физиологический раствор в объеме 1,0 см³ (контроль).

До введения препарата и через 10 суток после трехкратного внутримышечного введения у животных отбирали пробы крови. Часть крови стабилизировали гепарином, остальную использовали для получения сыворотки.

Бактерицидную активность сыворотки

крови (БАСК) определяли по методике, предложенной в 1979 г. Смирновой С.В. и Кузьминой Т.А., лизоцимную активность (ЛАСК) – по Дорофейчику В.Г. (1966 г.), фагоцитарную активность лейкоцитов (ФАЛ) с использованием тест-культуры *E. coli*, количество Т- и В-лимфоцитов в реакции розеткообразования по Новикову Д.К. и Новиковой В.И. (1979 г.).

Для изготовления комплексного иммуностимулирующего препарата «Нуклеозан» в качестве основного компонента использовали нуклеинат натрия, который получали из пивных дрожжей по методике, предложенной Лебедевым Л.Р. в соавторстве [1]. Липополисахариды получали методом щелочного гидролиза *Bac. licheniformis*. Содержание дсРНК в нуклеинате натрия составляло 2 мг/мл, липополисахаридов – 500 мкг/см³. Соотношение нуклеината натрия и липополисахаридов бактерий в препарате составляло 1:1. Для пролонгации препарата использовали поливинилпирролидон (ПВП) в объеме 3–3,5 % на 100 см³.

Определяли оптимальную дозу препарата для молодняка крупного рогатого скота. Для этой цели в одном из хозяйств Минской области провели опыт на телятах в возрасте 1–1,5 месяцев с клиническими признаками поражения органов дыхания и пищеварения. Были сформированы 3 опытные и одна контрольная группы животных (по 5 телят в группе). Препарат вводили животным внутримышечно трехкратно с интервалом в 2 дня: телятам 1-й группы – по 1,0 см³, 2-й – по 2,0 см³, 3-й – по 3,0 см³. Телят контрольной группы лечили по схеме, принятой в хозяйстве. Через 14 суток после введения различных доз препарата отбирали пробы крови и определяли показатели неспецифической резистентности организма животных (лизоцимная и бактерицидная активность сыворотки крови, фагоцитарная активность лейкоцитов) и показатели клеточного иммунитета (количество Т- и В-лимфоцитов).

Принимая во внимание литературные данные [7] о влиянии препаратов дсРНК на иммуногенез у вакцинированных живот-

ных, провели опыт на стельных коровах, которых иммунизировали против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота- и коронавирусной инфекции вакциной «Тетравак». Коровам опытной группы (5 голов) вводили вакцину «Тетравак» и одновременно препарат «Нуклеозан» в дозе 6,0–8,0 см³. Животных контрольной группы (5 коров) прививали вакциной «Тетравак» в соответствии с инструкцией по ее применению. Через 3 недели у жи-

вотных опытной и контрольной групп отбирали пробы крови для исследования в ИФА на специфические антитела в сыворотке крови к вирусу инфекционного ринотрахеита и s/p к вирусу диареи.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты исследований показателей неспецифической резистентности организма кроликов, обработанных препаратами, изложены в таблице 1.

Таблица 1. – Показатели неспецифической резистентности у кроликов, обработанных иммуностимулирующими препаратами

Сроки отбора крови	Группа животных	БАСК, %	ЛАСК, %	ФАЛ, %
До введения	1	15,77±1,13	7,53±0,72*	24,33±1,45
	2	21,07±1,68	7,60±1,76	13,33±2,40
	3	18,53±3,43	7,13±0,63**	27,67±2,60
	4	17,29±0,93	9,70±0,70	25,67±2,72
	5	17,33±0,90	9,60±1,68	24,47±1,36
	6	17,20±1,40	9,20±1,17	22,33±1,16
	7	17,17±2,74	7,23±1,39	21,93±1,28
	контроль	18,48±2,66	10,63±0,64	24,67±1,45
Через 10 суток после введения	1	24,82±1,47	12,03±0,74*	34,33±4,70
	2	23,18±4,20	15,37±4,97	32,67±2,67
	3	29,17±2,74	14,43±0,07*	36,33±4,63
	4	14,76±4,79	9,83±0,58	25,67±1,45
	5	23,70±1,41*	15,93±0,74**	24,00±3,06
	6	24,07±7,53	12,73±0,84**	23,67±2,73
	7	24,57±7,31	17,13±0,62**	34,67±0,67*
	контроль	18,23±6,02	7,23±1,39	28,67±2,91

Примечание – *P≤0,05 по отношению к контрольной группе; **P≤0,01 по отношению к контрольной группе

Данные по оценке показателей иммунологической эффективности (количество Т- и В-лимфоцитов в крови животных) кроликов, обработанных иммуностимулирующими препаратами, приведены в таблице 2.

Полученные данные, изложенные в таблицах 1, 2, свидетельствуют о том, что все испытуемые препараты и их сочетания с препаратом «Иммунат» обладают выраженными иммуностимулирующими свойствами, которые сопровождаются повышением показателей неспецифической резистентности организма животных и иммунологической эффективности. При сочетан-

ном применении препарата «Иммунат» с липополисахаридами бактерий лизоцимная и бактерицидная активность сыворотки крови через 10 дней после их введения повысилась на 6,33 % и 6,37 % соответственно, количество Т- и В-лимфоцитов – на 6,34 % и 10 % соответственно по сравнению с показателями кроликов, которым вводили только препарат «Иммунат». Сочетанное применение препарата «Иммунат» с янтарной кислотой сопровождалось повышением бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови кроликов на 7,4 % и 9,9 %, Т- и В-лимфоцитов – на 8,01% и 13,34% соответственно. При соче-

танном применении препарата «Иммунат» с наночастицами цинка в концентрации 0,01 мг/см³ показатели лизоцимной и бактерицидной активности сыворотки крови повышались на 3,53 % и 6,9 %, количество

Т- и В-лимфоцитов – на 14,0 % и 7,0 % соответственно. В дальнейшей экспериментальной работе использовали препарат «Иммунат» в сочетании с липополисахаридами бактерий.

Таблица 2. – Показатели клеточного иммунитета у кроликов, обработанных иммуностимулирующими препаратами

Сроки отбора крови	Группа животных	Т-лимфоциты, %	В-лимфоциты, %
До введения	1	26,67±0,67	17,67±2,40
	2	24,67±0,67	20,67±1,76
	3	26,67±0,67	16,33±1,20
До введения	4	25,00±1,73	16,33±0,33
	5	24,33±1,15	14,33±0,33
	6	22,00±1,15	17,67±1,33
	7	26,67±0,67	14,33±1,20
	8 (контроль)	23,67±1,67	17,67±1,33
Через 10 суток после введения	1	28,33±0,33	18,33±5,81
	2	34,00±2,00*	20,33±0,33
	3	32,00±1,73*	18,67±1,67
	4	24,00±3,06	17,33±1,67
	5	30,67±0,67	24,33±1,20*
	6	34,00±2,08*	24,67±1,33*
	7	34,67±0,67*	27,67±1,33*
	8 (контроль)	24,33±1,15	17,67±7,62

Примечание – *P≤0,05 по отношению к контрольной группе

В результате определения оптимальной дозы препарата для молодняка крупного рогатого скота установили повышение лизоцимной активности сыворотки крови во 2-й опытной группе животных на 21,5 %, бактерицидной активности в 1-й и 2-й опытных группах – на 25,5 % (P≤0,05) и 15,5 % (P≤0,05) соответственно, фагоцитарная активность лейкоцитов во 2-й и 3-й опытных группах – на 23,6 (P≤0,05) и 22,6 % (P≤0,05) соответственно. Установлено увеличение количества Т-лимфоцитов у всех животных опытных групп на 20,3–23,1 % (P≤0,05; P≤0,01), количества В-лимфоцитов – на 13,3–16,7 % (P≤0,05) в крови телят 2-й и 3-й опытных групп.

Полученные данные дают основание утверждать, что препарат «Нуклеозан» обладает иммуностимулирующим действием

и что доза препарата в 2,0 см³ (0,04 см³ на кг ж.м. теленка 1–1,5-месячного возраста) является оптимальной.

В результате проведения экспериментов по определению влияния препаратов дсРНК на иммуногенез у вакцинированных животных установлено достоверное повышение уровня титров антител к вирусу инфекционного ринотрахеита до 87,3 % против 71,4 % в контрольной группе, к вирусу диареи – до показателя s/p 1,18±0,10 против 0,8±0,12 в контрольной группе животных.

Полученные данные опыта на стельных коровах при сочетанном введении им вакцины «Тетравак» и препарата на основе нуклеината натрия и липополисахаридов бактерий «Нуклеозан» свидетельствуют о том, что препарат стимулирует иммуноге-

нез у животных, привитых вакциной «Тетравак» и повышает титры антител к вирусу инфекционного ринотрахеита и диареи крупного рогатого скота.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено повышение лизоцимной и бактерицидной активности сыворотки крови кроликов на 6,33 % и 6,37 %, количества Т- и В-лимфоцитов – на 6,34 % и 10 % при совместном применении препарата «Иммунат» с липополисахаридами бактерий, по сравнению с показателями у кроликов, которым вводили один препарат «Иммунат».

2. Определили оптимальную дозу изготовленного препарата «Нуклеозан» для

молодняка крупного рогатого скота, которая составила 2,0 см³ (0,04 см³ на кг ж.м. теленка 1–1,5-месячного возраста).

3. Установлено, что препарат «Нуклеозан» при совместном использовании с вакциной стимулирует иммуногенез у животных.

4. По результатам исследований разработаны: лабораторный регламент по изготовлению и контролю препарата «Нуклеозан», технические условия на ветеринарный препарат «Нуклеозан» ТУ ВУ 600049853.103-2019 и методические рекомендации по профилактике и терапии пневмоэнтеритов молодняка сельскохозяйственных животных с использованием иммуностимулирующих препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Выделение и очистка двуспиральной РНК из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Л.Р. Лебедев [и др.] // *Технология производства препаратов. Биофармацевтический журнал*. – 2014. – Т. 6. – № 6. – С. 37–43.
2. Изучение влияния протеолитических компонентов лактоферрина на иммунную систему лабораторных животных / С.А. Староверов [и др.] // *Ветеринарная медицина XXI века. Инновации, обмен опытом и перспективы развития: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Саратов, 2012 г. / ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ» ; редкол.: А.А. Волков [и др.]*. – Саратов, 2012. – С. 298–299.
3. Индуктор интерферона пролонгированного действия: пат. 2172631 РФ, А61К31/70, А61К31/710, 5А61 К47/06 / Г.М. Левагина, Ю.С. Аликин, В.И. Масычева, Е.Д. Даниленко, В.А. Фадина, Г.М. Игнатъев; заявитель «Вектор». – № 99121277/14; опубли. 27.08.2001.
4. Инструкция по применению препарата «Иммунат»: утв. 15.07.2013 г. – Минск: ООО «Научно-производственный центр БелАгроГен», 2013. – 2 с.
5. Карелин, А.И. Применение янтарной кислоты поросятам в период отъема от свиноматок / А.И. Карелин, Е.В. Наумкина // *Вопросы ветеринарной биологии*. – 1994. – М. – С. 70–72.
6. Лукьянова, И.А. Применение вестина и провеста для профилактики вирусных респираторных инфекций телят / И.А. Лукьянова, В.И. Плешакова // *Ветеринария Кубани*. – № 4. – 2012. – С. 7–9.
7. Масычев, В.И. У коров – сочетание индукторов интерферона с вакцинами для повышения их иммуногенности / В.И. Масычев, Е.Н. Морозова // *Обзор информ.* – М.: ВНИИСЭНТИ Минмедпрома СССР. – 1990. – Вып. 5. – 21 с.
8. Сравнительное изучение специфических препаратов на основе дсРНК / Ю.С. Аликин [и др.] // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Овчинникова Ю.А.* – 2006. – № 3. – С. 21–28.
9. Gonzalez-Chavez, S.A. Lactoferrin: structure, function and applications / S.A. Gonzalez-Chavez, S. Arevalo-Gallegos, Q. Rascon-Cruz // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2009. – Vol. 33. – P. 301–308.
10. Judy, C.K. Chan Production of Lactoferricin and Other Cationic Peptides from Food Grade Bovine Lactoferrin with Various Iron Saturation Levels / Judy C.K. Chan, Eunice C.Y. Li-Chan // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – Vol. 55. – P. 493–501.
11. Manual of antimicrobial susceptibility testing / Stephen J. Cavalieri [et al.] // *II. American Society for Microbiology*. – P. 53–62.
12. Susceptibilities against bovine lactoferrin with microorganisms isolated from mastitic milk / N.Y. Lee [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* – 2004. – Vol. 66. – P. 1267–1269.