

УДК 615.281.8:619:636.2.053(476)

РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА И ПРОБИОТИКА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕГО БЕЗВРЕДНОСТИ, СТЕРИЛЬНОСТИ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

И.В. Чуенко¹, П.А. Красочко²

¹ – УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, Республика Беларусь

² – РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», г. Минск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 28.06.2013 г.)

Аннотация. В данной статье описаны способы получения основных компонентов комплексного препарата на основе рекомбинантного интерферона и пробиотика для профилактики и лечения острых респираторных заболеваний телят.

Summary. The article describes how to obtain the basic components of an integrated drug based on the recombinant interferon and probiotics for the prevention and treatment of acute respiratory disease of calves.

Введение. Интерфероновая система является естественной защитной системой организма. Ее основная роль – ингибирование репликации вирусов. Тем самым интерфероновая система противостоит вирусным инфекциям. Однако помимо противовирусной функции, интерфероновая система имеет и целый ряд других функций, таких как регуляторная, нейромодулирующая и др.

Назначение препаратов интерферонов в случае сниженной естественной продукции этого цитокина играет роль заместительной терапии, что может быть использовано как для профилактики, так и для лечения сезонных эпидемий острых респираторных вирусных инфекций вне зависимости от штамма вируса, вызвавшего эпидемию, что выгодно отличает препараты интерферонов от вакцин, которые эффективны только против конкретных штаммов.

В качестве средства профилактики острых респираторных инфекций интерфероны относятся к мерам экстренного применения. Если для того чтобы проявился эффект вакцинации или иммуномодуляторов

необходимо время, то препараты интерферонов могут быть использованы сразу же после контакта с больным ОРВИ или же при первых симптомах заболевания. Даже если появились первые симптомы ОРВИ, применение интерферонов позволяет избежать манифестации заболевания более чем в 80% случаев. [1]

Цель работы. На основании проведенных исследований наработан лабораторный образец комплексного препарата на основе рекомбинантного интерферона и пробиотика.

Материалы и методика исследований. Для достижения поставленной цели исследования проводили в научно-исследовательской лаборатории РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского».

Источником бычьего рекомбинантного интерферона служила препаративная форма, изготовленная на предприятии ООО «Научно-производственный центр БелАгроГен. Для этого использованы бактерии *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL pIP2403, наследующие плазмиды pET24b(+), которые содержат ген бычьего лейкоцитарного α -интерферона. Их культивировали в LB-бульоне с 20 мкг/мл канамицина при 37 °С с перемешиванием (180 об/мин) до оптической плотности ОП 595=0,6-0,8, после чего в среду добавляли индуктор изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 мМ, культивировали еще 4 ч; осаждали 5 мин при 7000g. Клеточный осадок промывали в 15мМ Na-фосфат, 1мМ ЭДТА, pH 7,5, ресуспендировали в том же буфере. Клетки разрушали под давлением 17 атм. на проточном дезинтеграторе «EmulsiFlex-C5» (Avestin). Полученную массу центрифугировали 20 мин при 10000g и +4°C, отделяли супернатант от осадка телец включения. Осадок отмывали в том же буфере и растворяли в буфере следующего состава: 7М гуанидингидрохлорид, 20мМ Na-фосфат, 1мМ ЭДТА, pH 6,0 (в соотношении 1:10 к объему клеточной суспензии, взятой для осаждения). Инкубировали 2 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Добавляли сульфит натрия до 30 г/л. Смесь инкубировали 12 часов при комнатной температуре при интенсивном перемешивании. Белки обессоливали хроматографией на колонке объемом 220 мл с Sephadex G25 в буфере состава: 50 мМ Na-фосфат, 1 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl, pH 6,0. Далее белок очищали гель-фильтрацией на колонке с Sephadex G50, уравновешенной тем же буфером. Концентрацию белка измеряли методом Брэдфорд, ДСН-ПААГ-электрофорез и Вестерн-блоттинг белков.

Учитывая полученные результаты нами в работе использованы продукты метаболизма бацилл – *Bacillus subtilis* КМИЭВ – 175. Культуру бацилл хранили в холодильнике при температуре 4±2°C в пробир-

ках с полужидкой агаризованной питательной средой. Для хранения бактерий и для получения инокулята (посевого материала) для пробиотического препарата использовали оптимизированную среду Мейнелла (г/л: меласса - 20; K_2HPO_4 - 7.0; KH_2PO_4 - 3.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0.1; $(NH_4)_2 SO_4$ - 1.0; Na-цитрат $\times 3H_2O$ - 0,5; H_2O дист. - до 1 л, pH-7,0), в которой в качестве источников углерода использовали дешевый субстрат - мелассу (отход сахаропроизводства). Питательную среду разливали в стерильную посуду и стерилизовали при 0,75 атм 30 мин. Бактерии выращивали методом глубинного культивирования в полужидких питательных средах. Работу по пересеву бактерий проводили в специальном изолированном помещении – боксе, который предварительно облучали бактерицидными лампами в течение 1-2 часов. Получение посевных культур бактерий проводили в пробирках со стерильной оптимизированной средой Мейнелла. Инокулят культур вносили из расчета 5 об.%. Засеянные пробирки термостатировали при 37°C в течение 18 часов. Контроль чистоты посевого материала осуществляли высевом на среды МПА, Эндо, Сабуро.

Результаты исследований и их обсуждение. I генерация. Полученные посевные культуры вносили из пробирок из расчёта 5 об % в стерильные мерные колбы объёмом 100 мл и доливали стерильной оптимизированной средой Мейнелла до метки. Режим термостатирования и контроль чистоты культур здесь и далее такой же, как и на предыдущих этапах.

II генерация. Выращенный на предыдущем этапе посевной материал вносили из расчёта 5 об.% в стерильные мерные колбы объёмом 1000 мл и доливают предварительно проверенной на стерильность с оптимизированной средой Мейнелла.

Для получения пробиотического препарата компоненты питательной среды вносили в термостойкую нержавеющую посуду необходимой емкости и тщательно перемешивали при нагревании до полного растворения, после чего доводили pH с помощью 20% раствора Na_2CO_3 . Затем питательную среду разливали в стерильную посуду и стерилизовали при 0,75 атм. 30 мин. Питательную среду готовили в количестве 9 л. Стерильную среду разливали в боксе, в заранее простерилизованные при 1,5 атм. бутылки с пробками и затем передавливали в ферментер с соблюдением правил асептики. Потери при приготовлении питательной среды и ее стерилизации составили 1,0%.

Для выращивания бактерий использовали ферментёры, которые представляют собой вертикальные цилиндрические аппараты с полезным объёмом 10 дм³, снабженные мешалкой, рубашкой, соединенные с термостатом для поддержания температуры культивирования и сте-

рильной подачей воздуха. Полученные инокуляты культур вносили в ферментер последовательно с соблюдением условий стерильности. Ферментацию бацилл проводили совместно в течение 20-24 час глубинным способом при температуре 35⁰С с аэрацией на оптимизированной среде Мейнелла.

Режим ферментации бактерий:

- температура культуральной жидкости 35⁰С;

- периодическое перемешивание и аэрации при 50 об./мин каждые 3 часа

- продолжительность процесса ферментации – 20 - 24 часа.

В конце ферментаций культуральные жидкости *B. subtilis* БИМ В-454 Д должны содержать активно делящиеся типичные клетки бацилл в количестве не менее 1х10⁸ КОЕ/мл, не должно содержаться посторонней микрофлоры.

После культивирования в ферментерах для удаления клеток микроорганизмов проводили двухстадийную фильтрацию культуральной жидкости, используя на первой стадии пористый многослойный керамический фильтр, на второй – фильтровальную установку типа «Миллипор», снабженную мембраной с размером пор 0,2 мкм, что позволяет осуществлять стерилизацию препарата. На каждом этапе технологического процесса контролировали чистоту бактериальной культуры, определяли титр живых клеток, активную (рН). Контроль чистоты посевного материала осуществляли высевом на полужидкую тиогликолевую среду.

Таким образом, на основании полученных результатов основными компонентами комплексного препарата на основе рекомбинантного интерферона и пробиотиков для профилактики заболеваний органов дыхания вирусно-бактериальной этиологии у телят служили продукты метаболизма бацилл и рекомбинантный α -интерферон.

После изготовления проведены лабораторные испытания препарата с целью определения безвредности, стерильности, антибактериальной активности.

Безвредность опытного образца препарата определяли путем его подкожного введения 10-ти белым мышам массой 18-20 г в дозе по 0,2 мл каждого компонента.

В табл. 1 приведены результаты определения безвредности комплексного препарата на основе рекомбинантного интерферона и пробиотика.

В результате наблюдения за животными в течение 10 дней все мыши были живы, признаков угнетения не отмечено. Полученные дан-

ные свидетельствуют, что биологические препараты являются безвредными для лабораторных животных.

Таблица 1 – Изучение безвредности комплексного препарата на основе рекомбинантного интерферона и пробиотиков на мышах

Дни наблюдения	Опыт	Состояние мышей
	Опыт	Контроль
До обработки	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы
Через 1 сутки	Мыши клинически здоровы, активны, на месте введения препарата припухлости и болезненности не установлено, активны, физиологические функции в норме, гибели не отмечено	Мыши клинически здоровы, активны, на месте введения препарата припухлости и болезненности не установлено, активны, физиологические функции в норме, гибели не отмечено
Через 2 суток	Мыши клинически здоровы, активны, на месте введения препарата припухлости и болезненности не установлено, активны, физиологические функции в норме, гибели не отмечено	Мыши клинически здоровы, активны, на месте введения препарата припухлости и болезненности не установлено, активны, физиологические функции в норме, гибели не отмечено
Через 3 суток	Мыши клинически здоровы, активны, на месте введения препарата припухлости и болезненности не установлено, активны, физиологические функции в норме, гибели не отмечено	Мыши клинически здоровы, активны, на месте введения препарата припухлости и болезненности не установлено, активны, физиологические функции в норме, гибели не отмечено
Через 4 суток	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы, гибели не отмечено	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы, гибели не отмечено
Через 5 суток	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы, гибели не отмечено	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы, гибели не отмечено
Через 6 суток	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы, гибели не отмечено	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы, гибели не отмечено
Через 7 суток	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы, гибели не отмечено	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы, гибели не отмечено
Через 8 суток	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы, гибели не отмечено	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы, гибели не отмечено
Через 9 суток	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы, гибели не отмечено	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы, гибели не отмечено
Через 10 суток	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы, гибели не отмечено	Мыши клинически здоровы, активны, физиологические функции в пределах нормы, гибели не отмечено

Стерильность опытного образца препарата устанавливали путем посева вакцины на мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), среду Сабуро и Китта-Тароцци в соответствии с ГОСТ 28085-89 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности».

Таблица 2 – Изучение стерильности наночастиц биоэлементов на мышах

Дни наблюдения	Состояния роста микрофлоры
Через 1 сутки	Роста посторонней микрофлоры на МПБ, МПА, агаре Эндо и агаре Сабуро не отмечено
Через 2 суток	Роста посторонней микрофлоры на МПБ, МПА, агаре Эндо и агаре Сабуро не отмечено
Через 3 суток	Роста посторонней микрофлоры на МПБ, МПА, агаре Эндо и агаре Сабуро не отмечено
Через 4 суток	Роста посторонней микрофлоры на МПБ, МПА, агаре Эндо и агаре Сабуро не отмечено
Через 5 суток	Роста посторонней микрофлоры на МПБ, МПА, агаре Эндо и агаре Сабуро не отмечено
Через 6 суток	Роста посторонней микрофлоры на МПБ, МПА, агаре Эндо и агаре Сабуро не отмечено
Через 7 суток	Роста посторонней микрофлоры на МПБ, МПА, агаре Эндо и агаре Сабуро не отмечено
Через 8 суток	Роста посторонней микрофлоры на МПБ, МПА, агаре Эндо и агаре Сабуро не отмечено
Через 9 суток	Роста посторонней микрофлоры на МПБ, МПА, агаре Эндо и агаре Сабуро не отмечено
Через 10 суток	Роста посторонней микрофлоры на МПБ, МПА, агаре Эндо и агаре Сабуро не отмечено

В результате наблюдения за посевами в течение 10 дней посевы были стерильными, что указывает на стерильность биологического препарата.

Для оценки антибактериального действия комплексного препарата на основе рекомбинантного интерферона и пробиотиков на МПА засеивали различные условно-патогенные бактерии – *E.coli*, *Staph. Aureus*, *Salm. Dublin*, *Proteus mirabilis*, *Vac. subtilis*. После чего в агаре делали лунки диаметром 10 мм и в каждую лунку вносили препарат.

Показателем активности служила зона задержки роста тест-культур.

В табл. 3 приведены результаты изучения антибактериальной активности лабораторных образцов препаратов на основе наночастиц биоэлементов.

Проведенные результаты показывают, что лабораторный образец комплексного препарата на основе рекомбинантного интерферона и пробиотика обладает высокой антибактериальной активностью.

Таблица 3 – Антибактериальная активность лабораторных образцов препаратов на основе наночастиц биоэлементов (мм зоны задержки роста)

Тест-культура	Зона задержки роста (мм)		
	Комплексный препарат	Интерферон	Пробиотик
E.coli	24	15	26
Staph. aureus	22	13	25
Salm. dublin	21	13	20
Proteus mirabilis	25	12	29
Bac.subtilis	25	12	30

Закключение. После изготовления лабораторного образца разработан лабораторный регламент по изготовлению комплексного препарата на основе рекомбинантного интерферона и пробиотиков

В основу регламента положены следующие положения:

- требования к посуде, оборудованию и сырью для изготовления комплексного препарата на основе рекомбинантного интерферона и пробиотиков

- методы подготовки лабораторной посуды для изготовления наночастиц серебра, серебра+меди и цинка;

- методы изготовления рекомбинантного интерферона;

- определение активности рекомбинантного интерферона;

- методы изготовления пробиотика;

- определение активности пробиотика;

- составление готовой формы препарата;

- подготовка комплексного препарата на основе рекомбинантного интерферона и пробиотиков для проведения лабораторных испытаний и использования для лабораторных животных.

Лабораторный регламент утвержден в установленном порядке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богомолов, С.В. Система интерферонов: современные представления о структуре, организации и роли в реализации иммунитета/ С.В.Богомолов // Инфекционные болезни: научно-практический журнал Российского общества инфекционистов. – Москва, 2009.- Т7.-№1.-49-53 с.
2. Глотова, Т.И. Противовирусное действие интерферона/ Т.И. Глотова, А.Г. Глов // Методическое пособие РАСХН. Сиб. Отд-ние ИЭВСиДВ.- Новосибирск, 2005.-24 .
3. Гуревич, Г. Профилактика сезонных острых респираторных вирусных инфекций// Г. Гуревич // Биомедицинский журнал.-2001-№ 10 – 42 с.
4. Захарова, И.Н. Значение системы интерферонов в формировании иммунного ответа у детей с острыми респираторными вирусными инфекциями/ И.Н.Захарова //Вопросы практической педиатрии.- Москва, 2009.- Т4.- №5- 38-45 с.
5. Кузнецов, В.П. Интерфероны в каскаде цитокинов: исторический и современный аспекты / В.П. Кузнецов // Антибиотики и химиотерапия. -1998.- Т. 43.- № 5. - 28-40 с.
6. Красочко, П.А. Интерферон: его структура, организация и роль в формировании иммунитета у животных (обзорная информация)/ П. А. Красочко, И.В. Чуенко // Сельское хозяйство - проблемы и перспективы : сборник научных трудов / Министерство сельско-

го хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Учреждение образования "Гродненский государственный аграрный университет". - Гродно : ГГАУ, 2012. - Т. 1: Ветеринария. - С. 426-436.

7. Красочко, П. А. Научные основы изучения этиологии, патогенеза и разработка мер борьбы с вирусными инфекциями молодняка крупного рогатого скота / П. А. Красочко, А. М. Ламан // Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария : международный научно-теоретический журнал. - 2006. - № 3. - С. 3-8.

8. Хитрова, А.Е. Новые препараты для специфической профилактики смешанных инфекционных болезней телят/ А. Е. Хитрова, Г. Л. Соболева, Т. И. Алипер // Ветеринарная медицина Беларуси. - 2005. - № 1. - С. 23-24.

УДК 619:616.993.192.1:636.22/.28.0532:612.11:612.017

ОСОБЕННОСТИ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ КРИПТОСПОРИДИОЗЕ ТЕЛЯТ

М.В. Якубовский, О.П. Пепеляева

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии

им. С. Н. Вышелесского,

г. Минск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 30.06.2013 г.)

Аннотация. В статье представлены данные по динамике гематологических и иммунологических показателей крови телят (эритроцитов, гемоглобина, качественного и количественного состава лейкоцитов, T- и B-лимфоцитов) при криптоспоридиозной инвазии.

Summary. The article presents data on the dynamics of calf blood hematological and immunological parameters (RBC, hemoglobin, WBC, T- and B-lymphocytes) in case of cryptosporidiosis infestation.

Введение. Одними из опасных возбудителей типичного зооноза являются простейшие *Cryptosporidium parvum*, вызывающие криптоспоридиоз, который часто диагностируется в последние годы и наносит экономический ущерб животноводству [1, 3, 5, 6].

Криптоспоридиоз – протозойное зоонозное заболевание животных и человека, вызываемое кокцидиями семейства *Cryptosporidiidae* Leger, 1911; рода *Cryptosporidium* Tyzzer, 1910, характеризующееся поражением эпителия различных полостных органов – преимущественно кишечника и органов дыхания [5].

Криптоспоридии паразитируют в организме крупного рогатого скота, овец, коз, свиней, оленей, лошадей, кошек, мышевидных грызунов, морских свинок, птиц, рептилий, человека и др. Их ооцисты обнаружены даже в организме моллюсков. Криптоспоридии выявлены у 170 видов разных животных [4, 5, 6].