

УДК 579.62

РАЗРАБОТКА НОВОЙ ФОРМЫ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ЭШЕРИХИОЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ НА ОСНОВЕ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ И АНТИТОКСИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ

**¹Панин А.Н., д.вет.н., профессор, Академик РАН, Советник
директора**

¹Межнева З.Х., к.вет.н., главный специалист отдела бактериологии

¹Моторыгин А.В., к.вет.н., заведующий НТЛ

¹Абросимова Н. С., научный сотрудник НТЛ

²Марьин Е. М. д.вет.н., доцент, декан ФВМиБ

²Шестаков А.Г. к.б.н., доцент

²Калдыркаев А.И. к.б.н., доцент

**¹Всероссийский государственный Центр качества и
стандартизации лекарственных средств для животных и кормов
(ФГБУ «ВГНКИ»);**

²ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: сорбент, диоксид кремния, эшерихиоз, специфическая профилактика, антитоксическая сыворотка, иммобилизация.

Работа посвящена разработке нового комплексного препарата для лечения эшерихиозов сельскохозяйственных животных, функциональные характеристики которого позволят потенцировать лечебный и профилактический эффекты белков антитоксической сыворотки иммобилизованных на модифицированном диоксиде кремния, а также изучению эффективности «новых» пероральных форм антитоксических сывороток.

Введение. Работа посвящена разработке новой формы средства профилактики и лечения эшерихиоза сельскохозяйственных животных на основе сорбента и антитоксической сыворотки и оценке ее эффективности. Не всегда профилактика эшерихиозов остается

высокоэффективной [2]. Актуальность данного исследования обусловлена тем, что в настоящее время отсутствуют данные об использовании сорбированных антитоксинов или сывороток на минеральных носителях. Результаты ряда экспериментов, проведенные на базе ФГБУ «ВГНКИ», в рамках лабораторных исследований, впервые в практике, показали преимущество иммобилизированной сухой антитоксической сыворотки над жидкой. Стабилизация сыворотки при хранении, преимущество использования в пероральной форме непосредственно с сорбентом, а также повышение суммарной эффективности новой формы препарата в сравнении с традиционными схемами применения жидкой формы, выводят значимость данных исследований на мировой уровень. Необходимость разработки новых эффективных ветеринарных препаратов для лечения и профилактики эшерихиозов, обусловлена высокой интенсификацией животноводства в Российской Федерации и появлением мульти резистентных штаммов ко многим существующим схемам антибиотикотерапии. Научная новизна работы заключается в изучении свойств новой формы антитоксической сухой эшерихиозной сыворотки, впервые разработанной на территории Российской Федерации. Работа выполнена в рамках гранта РНФ Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований малыми отдельными научными группами.

Материалы и методы исследований: Работа проведена в отделе бактериологии и научно-технологической лаборатории ФГБУ «ВГНКИ», а также в выварном комплексе научно-экспериментальной базы «Манихино». Проведен анализ морфологических, биохимических, молекулярно-генетических и антигенных свойств штаммов *Escherichia coli* из «Всероссийской коллекции штаммов микроорганизмов» ФГБУ «ВГНКИ» с помощью общепринятых микробиологических методов исследований. В работе использованы: метод световой микроскопии; метод окраски бактериальных клеток по Граму; изучение подвижности методами «висячая капля» и «раздавленная капля», при этом дополнительно использовали столбики с полужидким агаром в 0,25% МПА [7]; для выявления диссоциации культуры ставили пробу кипячения по Бернгофу Ф.Г.; восстановление исходной формы колоний эшерихий проводили 4-7-кратным клонированием на агаре Хоттингера

с 5%-ным содержанием стерильной сыворотки морской свинки (по методике Э.М. Новгородской) и пассажем через организм белых мышей; ферментативные свойства изучали с использованием биохимических тест-систем API20E или анализаторов для биохимической идентификации VITEK® 2 Compact Sensititre; гемолитическую активность (токсигенность культуральной жидкости) изолятов кишечной палочки определяли по образованию зон просветления вокруг бактериальных колоний на 5% кровяном агаре и измерением выхода гемоглобина из лизируемых культуральной жидкостью эритроцитов кролика, спектрофотометрически при 540 нм.; антигенное сходство штаммов и изолятов кишечной палочки выявляли с помощью теста прямой радиальной иммунодиффузии. Количества клеток определяется высевом на плотные питательные среды по методу Коха [6]; для сравнения активности жидкой и иммобилизированной антитоксической сыворотки использовали постановку реакции агглютинации. Методы работы с животными: Все манипуляции с животными проводили в соответствии с постановлениями Европейской Конвенции о защите позвоночных животных. Для изучения вирулентности штаммов *E. coli* использовали белых мышей, массой 16-18 г. Метод иммобилизации антитоксической сыворотки на диоксиде кремния: Диоксид кремния прогревали при 100°C в течение 1 часа и непосредственно в остывающий порошок методом мелкодисперсного орошения вносили 10% раствор аминопропилтриэтоксисилана при постоянном ворошении (перемешивании). После инкубации в течении 12 часов при 60°C в термостате помещали в сушильный шкаф на 10 минут при 100°C. Этот процесс - силанизация диоксида кремния. Он обеспечивает прочную связь между молекулами диоксида кремния и органическими веществами с минимальным повреждением белковых структур, в отличие от простой иммобилизации на не модифицированных кремнеземах. Сорбционную емкость образцов определяли общепринятым методом с использованием метиленового синего на спектрофотометре с длинной волны 396 нм. Методы статистической обработки материала (экспериментальных данных) проводили по общепринятым методикам, используя коэффициент корреляции Пирсона, t-критерий Стьюдента, двойную корреляцию.

Расчет результатов производили, используя пакет прикладных программ Statistica 6.0.

Результаты исследований и их обсуждение.

В данном тезисе приводится один из проведенных вариантов эксперимента, отражающий основной результат сравнения жидкой антиоксической эшерихиозной сыворотки и сыворотки, адсорбированной на модифицированном силанами диоксиде кремния. Для проведения опыта использовали белых мышей в количестве 30 голов, которых разделили на три группы. В каждой группе по 10 мышей, которым внутрижелудочно вводили по 0,5 мл соответствующего препарата в течение 2-х дней с интервалом 24 часа.

Группа № 1 – мыши, которые получали препарат «Сыворотка антиадгезивная антиоксическая против эшерихиоза сельскохозяйственных животных» (производитель ФКП «Армавирская биофабрика»), далее Сыворотка;

Группа № 2 (опытная группа) – мыши, которые получали испытуемый препарат: сыворотка, адсорбированная на модифицированном диоксиде кремния, далее Образец.

Образец испытуемого препарата представляет собой порошок для приготовления суспензии для приема внутрь. Для внутрижелудочного введения образец был подготовлен следующим образом: взвешивали 5 г. образца и 15 мл физиологического раствора. Данное разведение по своей консистенции оказалось более подходящим для введения в желудок животных;

Группа № 3 – мыши, которые получали физ. раствор, далее Контроль.

Необходимо принять во внимание, что с дозой 0,5 мл исследуемого образца в желудок одной белой мыши попадает адсорбированной сыворотки в количестве (примерно 0,03 мл), т.е. примерно в 16 раз меньше, чем животные из группы №1, которые получали нативную сыворотку. Расчет количества нативной сыворотки, которую получили животные в группе № 2, производился по следующей схеме: если на 500 гр. диоксида кремния было адсорбировано 100 мл. сыворотки, которую в последующем разводили в концентрации, указанной выше (5 г. образца и 15 мл физиологического раствора) и вводили белым мышам в количестве

0,5 мл, то в организм каждого животного попало 0,03 мл адсорбированной на диоксиде кремния сыворотки.

На третий день мышей из каждой группы заражали внутрижелудочно в дозе 0,5 мл 24-х часовыми культурами *E. coli* K88 и *E. coli* 987P. Перед заражением количество микробных тел каждого штамма доводили до 2 млрд/мл, т.е. с дозой 0,5мл каждое животное получало 1 млрд взвеси указанных штаммов *E. coli*. Данные, полученные при заражении белых мышей указаны в таблице 1.

Таблица 1

Наименование штамма	группа №1 (Сыворотка)	группа №2 (Образец)	группа №3 (Контроль)
<i>E. coli</i> штамм К 88	1*/5**	2/5	5/5
<i>E. coli</i> штамм 987P	2/5	2/5	5/5

* в числителе – количество павших мышей

** в знаменателе – всего мышей в опыте

Данные таблицы 1 свидетельствуют, что

- в группе № 1 Сыворотка обладает защитными свойствами и при введении 24-х часовой суспензии культур в дозе 1 млрд/0,5мл *E. coli* K 88 пала 1 из 5 белых мышей, а *E. coli* 987P - 2 из 5 белых мышей);

- в группе № 2 Образец также обладает защитными свойствами при введении 24-х часовой суспензии культур в дозе 1 млрд/0,5мл *E. coli* K 88 пало 2 из 5 белых мышей, а *E. coli* 987P - 2 из 5 белых мышей;

- в группе № 3 при введении культуры штаммов *E. coli* K88 и *E. coli* 987P в той же дозе пали все мыши.

Выводы. Таким образом, полученные данные подтверждают, что новая форма лекарственного препарата на основе модифицированного диоксида кремния и иммобилизированной антиоксической сыворотки обладает лечебными свойствами, а также полученные результаты позволяют сделать вывод, что новая форма препарата, позволяет уменьшить дозу сыворотки в несколько раз и, как следствие, связанные с этим экономические расходы. Дальнейшая работа в рамках гранта предполагает проведение нескольких

вариативных исследований, а также исследований на целевых животных (телята КРС) в опытных хозяйствах.

Заключение.

Колибактериоз или эшерихиоз – острая инфекционная болезнь молодняка всех видов сельскохозяйственных животных, вызываемая патогенной кишечной палочкой (*Escherichia coli*) и проявляющаяся главным образом диареей, задержкой роста, высокой смертностью, а также снижением продуктивности у переболевших особей, чем наносит значительный ущерб животноводству. Возникновению заболевания способствуют нарушение зоотехнических и ветеринарных правил содержания, кормления и ухода за животными. Источниками возбудителя инфекции являются больные и переболевшие животные, матери – носители патогенных кишечных палочек, инфицированные окружающие предметы.

Желудочно-кишечные болезни, вызываемые патогенными возбудителями *E. coli* считаются одним из основных факторов, наносящих существенные потери при выращивании молодняка животных в Российской Федерации и занимают лидирующее положение, на долю которого приходится 50-55% всех случаев болезней [3].

Возбудителями болезни являются представители рода эшерихий, объединяющие около 200 серогрупп и более 10000 серологических вариантов [4].

Для профилактики эшерихиозов у молодняка применяют иммунизацию беременных животных моно- и ассоциированными препаратами с целью создания напряженного колострального иммунитета, также для лечебно-профилактических целей используют антитоксические сыворотки, нейтрализующие действие энтеропатогенных эшерихий.

В борьбе с желудочно-кишечными болезнями бактериальной этиологии у молодняка сельскохозяйственных животных также широкое применение нашли химиотерапевтические средства. Однако длительное и бессистемное применение их в животноводстве, а также широкая вариабельность и изменчивость эшерихий, стремительное развитие антибиотикорезистентности при неадекватной

антибиотикотерапии, выводит на передний план использование средств специфических методов профилактики и лечения эшерихиозов [1].

Несмотря на представленное обилие средств для профилактики и лечения эшерихиозов, проблема, связанная с заболеваниями желудочно-кишечного тракта, не является решенной до конца, а интенсификация животноводства в Российской Федерации диктует необходимость разработки новых эффективных ветеринарных препаратов и совершенствования существующих [5].

В связи с чем, разработка новой формы лекарственного препарата для профилактики и лечения эшерихиоза сельскохозяйственных животных на основе диоксида кремния и антиоксической сыворотки позволит получить более стабильный препарат для перорального применения выводит значимость данных исследований на новый уровень.

Библиографический список:

1. Андреева, А.В. Характеристика устойчивости к антибиотикам микробиоценоза кишечника молодняка сельскохозяйственных животных / А.В. Андреева, О.Н. Николаева // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. – 2013. – № 3 (27). – С. 35-37.
2. Иванов, А.И. Мониторинг эпизоотической ситуации, диагностика и лечебно-профилактические мероприятия при колибактериозе (эшерихиозе) телят / А.И. Иванов, Б.Б. Баймурзин // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. – 2010. – № 4. – С. 24-31.
3. Когденко, Н. В. Распространение и клиническое проявление колибактериоза телят в Краснодарском крае: дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / Когденко, Наталья Владимировна. – Краснодар, 2001. – 140 с.
4. Моторыгин, А.В. Этиологическая структура, морфофункциональная характеристика эшерихиоза телят: автореферат дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02 / Моторыгин Антон Валерьевич. – М., 2011. – 23 с.
5. Панин, А.Н. Пробиотики в животноводстве - состояние и перспективы / А.Н. Панин, Н.И. Малик, О.С. Илаев // Ветеринария. – 2012. – № 3. – С. 3-8.

6. Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н., Азова Л.Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии (малый практикум). М.: изд-во Московского университета, 1971 -75с.

7. Шевченко, А.А. Диагностика эшерихиоза животных / А.А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л.В. Шевченко, Г.А. Джаилиди, Д.Ю. Зеркалев, А.Р. Литвинова, Т.В. Левченко, А.В. Скориков, Е.В. Якубенко // Краснодар. – 2013. – 23 с.

DEVELOPMENT OF A NEW FORM OF DRUG FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF ESCHERICHIOSIS OF FARM ANIMALS BASED ON SILICON DIOXIDE AND ANTITOXIC SERUM

Panin A.N., Mezhieva Z.H., Motorygin A.V., Abrosimova N.S., Marin E.M., Shestakov A.G., Kaldirkaev A.I.

Keywords: *sorbent, silicon dioxide, escherichiosis, specific prophylaxis, antitoxic serum, immobilization.*

The work is devoted to the development of a new complex drug for the treatment of escherichiosis in farm animals, the functional characteristics of which will allow potentiating the therapeutic and prophylactic effects of antitoxic serum proteins immobilized on modified silicon dioxide, as well as studying the effectiveness of "new" oral forms of antitoxic serums.