

УДК 619:616.98:578.825.15:615:636.2

АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА ВЕТОМ 1.23 ПО ОТНОШЕНИЮ К BHV-1 В УСЛОВИЯХ IN VITRO

¹Т. И. Глотова, доктор биологических наук, профессор¹А. Г. Глотов, доктор ветеринарных наук, профессор²Г. А. Ноздрин, доктор ветеринарных наук, профессор²А. А. Никонова¹О. В. Семенова, кандидат биологических наук¹Институт экспериментальной ветеринарии Сибири
и Дальнего Востока Россельхозакадемии²Новосибирский государственный аграрный университет

E-mail: t-glотова@mail.ru

Ключевые слова: противовирусная активность, ветом 1.23, инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота, in vitro, культура клеток

Реферат. Поиск новых препаратов, эффективных в отношении возбудителей вирусных инфекций крупного рогатого скота, является важной задачей современной ветеринарной фармакологии. Вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота широко распространен в хозяйствах региона Сибири и играет важную роль в патологии животных, причиняя большой экономический ущерб современному животноводству. Противовирусная активность препаратов, относящихся к группе пробиотиков, мало изучена. Определена противовирусная активность ветома 1.23 в отношении BHV-1 in vitro. Оценку противовирусной активности проводили по редукции вируса после его взаимодействия с ветомом 1.23. В эксперименте использовали перевиваемую культуру клеток почки теленка MDBK. В качестве тест-вируса был использован авирулентный штамм ТК-А вируса. Ветом 1.23 вносили в максимальной переносимой концентрации ($62,5 \text{ мм}^3/\text{см}^3$). Результаты эксперимента показали, что при внесении в рекомендуемой к исследованию дозе (максимальной переносимой концентрации) ветом 1.23 оказался малоэффективным в отношении BHV-1, наблюдалось только слабое ингибирование размножения вируса, титр вируса снижался на $0,13\text{--}0,5 \log_{10}$. Однако в более высоких концентрациях препарат проявлял выраженное противовирусное действие.

В настоящее время изучение распространения вирусов среди крупного рогатого скота и поиск новых химиотерапевтических препаратов против них являются важными задачами ветеринарной вирусологии и фармакологии.

Вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (ИРТ КРС) – Bovine herpes virus-1 (BHV-1) является возбудителем одной из наиболее распространенных в последние годы, экономически значимых вирусных болезней, играет важную роль в возникновении бронхопневмоний у животных на молочных комплексах [1]. ИРТ КРС проявляется в виде поражений респираторного тракта, вульвовагинитов, маститов и абортос у коров; баланопоститов у быков; конъюнктивитов, менингоэнцефалитов, а также в отдельных случаях – артритов, диареи и генерализованной инфекции у телят [2].

В Российской Федерации не разработано официальных программ по ликвидации этой болезни, и в связи с широким распространением инфекции её контроль осуществляется путем использования аттенуированных и инактивированных вакцин [2].

В литературе опубликованы данные о вирулицидных свойствах некоторых химиотерапевтических препаратов разных групп в отношении вируса ИРТ КРС, полученные в исследованиях in vitro [3–5].

В настоящее время во всем мире достаточно широко распространено применение пробиотиков с профилактической и терапевтической целью при разных инфекционных заболеваниях несмотря на тот факт, что их противовирусная активность мало изучена [6]. Поэтому всестороннее изучение этих свойств у препаратов данной группы является актуальной задачей современной ветеринарной медицины.

В доступной литературе мы не нашли сведений о противовирусной активности пробиотиков в отношении BHV-1, хотя встречаются сообщения об их активности в отношении других возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных [6–8]. В том числе упоминается об особых липопептидных противомикробных веществах, выделяемых *Bacillus subtilis* в процессе их жизнедеятельности, которые обладают вирулицидным

действием в отношении вирусов – возбудителей болезней Ауески и Ньюкасла, инфекционного бурсита кур, парвовирусной инфекции свиней [9], везикулярного стоматита мышей, иммунодефицита обезьян, калицивируса кошек, вируса простого герпеса первого типа человека [10].

Биологически активное вещество ветом 1.23 представляет собой кукурузный экстракт, ферментированный рекомбинантным штаммом бактерии *Bacillus subtilis* ВКПМ В-10641.

Целью наших исследований являлось изучение противовирусной активности препарата ветом 1.23 в отношении вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в условиях *in vitro*.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследовано биологически активное вещество (БАВ) ветом 1.23, серия 020313 (производитель – ООО НФП «Исследовательский центр»). Состав препарата: экстракт кукурузный, ферментированный бактериями рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ В-1064, натрия хлорид, вода дистиллированная [11].

Для изучения его токсичности и противовирусной активности использовали культуру клеток MDBK (почка теленка) и BNV-1, штамм ТК-А.

Культуру клеток MDBK выращивали в пластиковых матрасах (Nunc, Дания) в среде Игла MEM (производство ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН») с добавлением 5,0±0,5 % эмбриональной сыворотки крови теленка (Fetal Bovine serum Standard Quality; PAA Laboratories GmbH, Austria; Cat № : A15–101; Lot № A10109–2946), используя 0,01 %-й раствор химопсина в 0,02 %-м растворе Версена.

Для определения токсичности, тканевой цитопатогенной (ТЦД₅₀) и предельной нетоксичной доз (ПНД) препарата его вносили в различных разведениях (от 500 до 0,0001 мм³/см³) в 48-часовой монослой культуры клеток MDBK в 96-луночном культуральном планшете. Для каждого разведения использовали 4 лунки. При этом наблюдение за состоянием клеточных культур проводили в течение 5–7 дней под малым увеличением микроскопа. Минимальная концентрация препарата, вызывающая цитотоксический эффект в 50 % лунок, определялась как тканевая цитопатогенная доза (ТЦД₅₀). Концентрация БАВ, при которой не

выявляли цитопатогенного эффекта, являлась его предельной нетоксической дозой (ПНД).

Максимально переносимую концентрацию (МПК) препарата вычисляли по формуле $МПК = ТЦД_{50}/4$ [12].

Для определения вирулицидного действия препарата к 1 мл вирусной суспензии BNV-1 (штамм ТК-А) с известной инфекционной активностью добавляли препарат в ПНД и МПК, инкубировали в течение 60 мин при температуре 37°C, затем определяли инфекционную активность тест-вируса методом титрования. Контролем служил вирус без препарата. Вирулицидный эффект препарата рассчитывали, сравнивая инфекционную активность вируса в контрольном и опытном образцах.

С целью определения противовирусной активности препарата *in vitro* монослой культуры клеток MDBK заражали вирусом ИРТ в дозе не менее 100 ТЦД/кл., через 1 ч после этого их отмывали питательной средой без сыворотки и вносили препарат в ПНД и МПК (опыт) или питательную среду (контроль). Через 72 ч культивирования вируса в таких биосистемах культуральную жидкость титровали. Противовирусный эффект препарата рассчитывали, сравнивая инфекционную активность вируса в контрольном и опытном образцах. В каждом опыте проводили дополнительный контроль на токсичность испытуемой дозы препарата.

Определение инфекционной активности вируса ИРТ КРС проводили микрометодом в 96-луночных культуральных планшетах (Costar) с культурой клеток MDBK с использованием не менее 4 параллельных рядов. Инфекционный титр вируса выражали в $\log_{10} ТЦД_{50}/0,1 \text{ см}^3$.

Препаратом, обладающим выраженным антивирусным эффектом считали соединение, подавляющее размножение тест-вируса в культуре клеток на 1,7–2,0 $\log_{10}$ в сравнении с контролем [12].

Статистическую обработку полученных результатов исследований осуществляли в соответствии с общепринятыми методами [13]. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ТЦД₅₀ препарата ветом 1.23 составила 250 мм³/см³, что позволило нам определить его МПК для перевиваемой культуры клеток MDBK, которая составила 62,5 мм³/см³. ПНД препарата равнялась 125 мм³/см³. В дальнейшем все иссле-

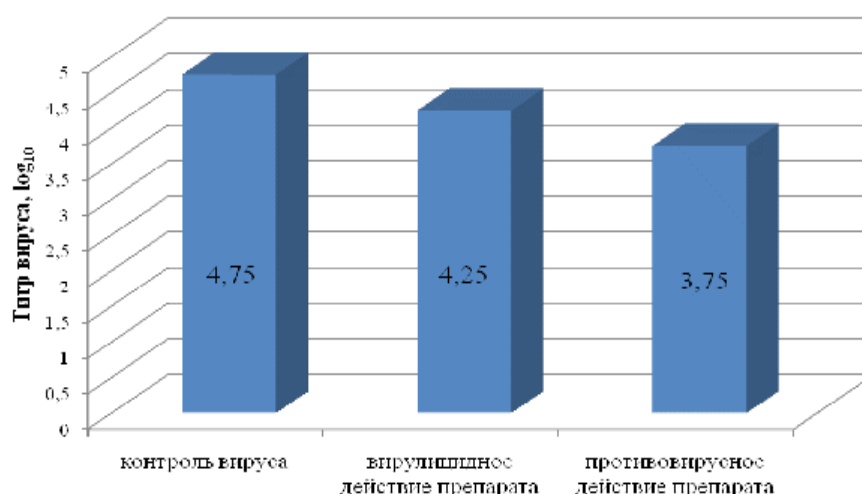


Рис. 1. Активность препарата ветом 1.23 в дозе 62,5 мм³/см³ по отношению к BHV-1

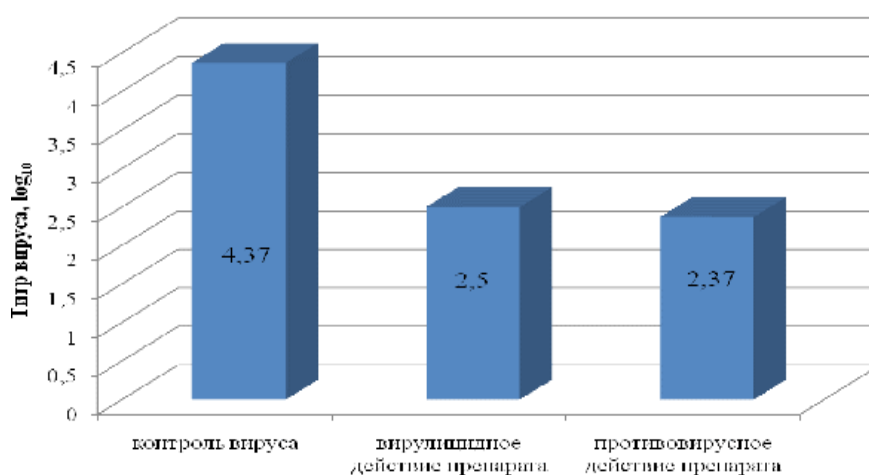


Рис. 2. Активность препарата ветом 1.23 в дозе 125 мм³/см³ по отношению к BHV-1

дования по определению противовирусной активности препарата в отношении BHV-1 (штамм ТК-А) проводили с использованием МПК и ПНД препарата.

Результаты определения противовирусной эффективности представлены на рис. 1, 2.

Установлено, что препарат ветом 1.23 в предельной нетоксической для культуры клеток MDBK дозе оказывает выраженное вирулицидное и противовирусное действие на BHV-1 в условиях инкубации при 37°C в CO₂-инкубаторе. Уровень редукции вируса составил 1,87 log₁₀ ТЦД_{50/0,1 см³} и 2 log₁₀ ТЦД_{50/0,1 см³} соответственно.

Активность препарата в максимально переносимой концентрации была незначительной и составила 0,5 log₁₀ ТЦД_{50/0,1 см³} и 1,0 log₁₀ ТЦД_{50/0,1 см³} соответственно.

D. Vollenbroich et al. [10] доказали противовирусную активность липопептидных веществ, получаемых из культуральной среды от *Bacillus*

subtilis, в отношении различных вирусов, в том числе вируса простого герпеса человека первого типа, относящегося к тому же семейству, что и BHV-1. В опытах показано, что данное вещество действует в основном на внеклеточную форму вирусов и в большей степени проявляет вирулицидную активность, чем противовирусную. Возможно, противовирусное действие препарата ветом 1.23 также связано с наличием липопептидов. J.M. Cummins et al. [15] определили чувствительность BHV-1 к природному и рекомбинантному интерферону человека, а R.W. Fulton [16] – к рекомбинантным интерферонам α₁ и α₂. Кроме того, установлено, что ветом 1.23 способствует выработке лейкоцитарного интерферона α₂ у человека [11], а препараты на основе природных (сахабактисубтил) и генетически модифицированных (коредон) штаммов *Bacillus subtilis* обладают интерфероногенной активностью, вызывая синтез сывороточного интерферона у телят

4–6-месячного возраста [17]. Под действием БАВ ветом 1.23 в организме животного также может вырабатываться интерферон, оказывающий противовирусное действие в отношении BHV-1, но для подтверждения этого необходимо проведение дополнительных исследований на экспериментально или естественно инфицированных вирусом животных.

Известно, что пробиотические препараты проявляют свою активность преимущественно в желудочно-кишечном тракте, стимулируют иммунную систему организма, восстанавливают нормофлору и подавляют патогенную микрофлору. Органы пищеварения представляют собой одну из наиболее сложных экологических систем организма, устройство которой до конца не изучено. Местный противовирусный иммунитет зависит от выработки множества цитокинов, производимых различными клетками слизистой оболочки, взаимодействующими друг с другом, вследствие чего противовирусная защита значительно возрастает. Выработка некоторых противовирусных веществ (интерферона α , секреторного иммуноглобулина

А) зависит в том числе и от состава микрофлоры кишечника. Многогранность данного защитного процесса невозможно произвести в условиях *in vitro*, поэтому для полной оценки противовирусных свойств БАВ ветом 1.23 в отношении BHV-1 необходимо проведение дальнейших исследований его интерферониндуцирующей и противовирусной активности в условиях *in vivo*.

ВЫВОДЫ

1. Изучена противовирусная активность биологически активного вещества ветом 1.23 в отношении к BHV-1. Внесение препарата в культуру клеток MDBK в дозе 125 мм³/см³ приводило к снижению инфекционной активности вируса на 2 log₁₀ ТЦД_{50/0,1 см³}.
2. Для более полной оценки противовирусных свойств БАВ ветом 1.23 в отношении BHV-1 необходимо проведение дальнейших исследований его интерферониндуцирующей и противовирусной активностей в условиях *in vivo*.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Этиология бронхопневмоний крупного рогатого скота на молочных комплексах* / А.Г. Готов, Т.И. Готова, О.В. Семенова, К.В. Войтова // Ветеринария. – 2014. – № 4. – С. 711.
2. *Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота* / А.Г. Готов, А.Ф. Шуляк, Т.И. Готова, А.Н. Сергеев. – Новосибирск, 2006. – С. 105–145.
3. *Клиническое испытание рибамидина при лечении вирусных заболеваний крупного рогатого скота* // Профилактика и лечение болезней молодняка в промышленном животноводстве / В.Я. Мозгис [и др.]. – Рига: Зинатне, 1989. – С. 75–79.
4. *Готов А.Г., Готова Т.И., Сергеев А.Н.* Изучение антивирусных свойств препаратов различного происхождения в отношении герпес- и пестивирусов крупного рогатого скота // Антибиотики и химиотерапия. – 2004. – № 6. – С. 6–9.
5. *White G.* The prospects for antiviral chemotherapy in veterinary medicine // Veterinary Record. – 1981. – Vol. 108, N6. – P. 125–126.
6. *Андреева И.В.* Потенциальные возможности применения пробиотиков в клинической практике // Клиническая микробиология, антимикробная химиотерапия. – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 151–172.
7. *Пробиотики* в лечении диарейного синдрома / М.Ф. Осипенко [и др.] // Фарматека. – 2008. – № 13. – С. 36–41.
8. *Усенко Д.В.* К вопросу о роли пробиотических продуктов в профилактике заболеваний и сохранении здоровья человека // Лечащий врач. – 2011. – № 7. – С. 230–231.
9. *Antiviral Activity of Antimicrobial Lipopeptide from Bacillus subtilis fmbj Against Pseudorabies Virus, Porcine Parvovirus, Newcastle Disease Virus and Infectious Bursal Disease Virus in vitro* / X. Huang [et al.] // International Journal of Peptide Research and Therapeutics. – 2006. – Vol. 12, N 4. – P. 373–377.
10. *Mechanism of Inactivation of Enveloped Viruses by the Biosurfactant Surfactin from Bacillus subtilis* / D. Vollenbroich [et al.] // Biologicals. – 1997. – № 25. – P. 289–297.
11. *Инструкция по применению: биологически активное вещество ветом 1.23.*: утв. директором ООО НФП «Исследовательский центр» Леяк А. И. от 12.04.2012. [Электрон. ресурс]. – Режим доступа: <http://vetom.ru/content/view/543/5/>.

12. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ* / под общ. ред. Р. У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – 538 с.
 13. *Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А.* Быстрые методы статистической обработки и планирования экспериментов. – Л.: ЛГУ, 1974. – 76 с.
 14. *Медицинская вирусология: руководство* / под ред. Д. К. Львова. – М.: ООО «Мед. информ. агентство», 2008. – 656 с.
 15. *Oral therapy with human interferon alpha in calves experimentally injected with infectious bovine rhinotracheitis virus* / J.M. Cummins [et al.] // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. – 1993. – Vol. 41, N 3–4. – P. 193–197.
 16. *Fulton R. W., Burge L. J., McCracken L. J.* Effect of recombinant DNA-derived bovine and human interferons on replication of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, and respiratory syncytial viruses // *American journal of veterinary research*. – 1986. – Vol. 47. – P. 751–753.
 17. *Сравнительное изучение интерферонотропной активности препаратов на основе Bacillus subtilis у телят* / Т. И. Глотова, А. Г. Глотов, Н. П. Тарабукина [и др.] // Сб. тр. Междунар. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы патологии и иммунологии животных», посвящ. 100-летию со дня рождения акад. ВАСХНИЛ (РАСХН) Я. П. Коваленко. – М. 2006. – С. 461–464.
1. *Etiologiya bronkhopnevmoniy krupnogo rogatogo skota na molochnykh kompleksakh* / A. G. Glotov, T. I. Glotova, O. V. Semenova, K. V. Voytova // *Veterinariya*. – 2014. – № 4. – S. 711.
 2. *Infektsionnyy rinotrakheit krupnogo rogatogo skota* / A. G. Glotov, A. F. Shulyak, T. I. Glotova, A. N. Sergeev. – Novosibirsk, 2006. – S. 105–145.
 3. *Klinicheskoe ispytanie ribamidina pri lechenii virusnykh zabolevaniy krupnogo rogatogo skota* // *Profilaktika i lechenie bolezney molodnyaka v promyshlennom zhivotnovodstve* / V. Ya. Mozgis [i dr.]. – Riga: Zinatne, 1989. – S. 75–79.
 4. *Glotov A. G., Glotova T. I., Sergeev A. N.* Izuchenie antivirusnykh svoystv preparatov razlichnogo proiskhozhdeniya v otnoshenii herpes- i pestivirusov krupnogo rogatogo skota // *Antibiotiki i khimioterapiya*. – 2004. – № 6. – S. 6–9.
 5. *White G.* The prospects for antiviral chemotherapy in veterinary medicine // *Veterinary Record*. – 1981. – Vol. 108, N6. – P. 125–126.
 6. *Andreeva I. V.* Potentsial'nye vozmozhnosti primeneniya probiotikov v klinicheskoy praktike // *Klinicheskaya mikrobiologiya, antimikrobnaya khimioterapiya*. – 2006. – T. 8, № 2. – S. 151–172.
 7. *Probiotiki v lechenii diareynogo sindroma* / M. F. Osipenko [i dr.] // *Farmateka*. – 2008. – № 13. – S. 36–41.
 8. *Usenko D. V.* K voprosu o roli probioticheskikh produktov v profilaktike zabolevaniy i sokhranении zdorov'ya cheloveka // *Lechashchiy vrach*. – 2011. – № 7. – S. 230–231.
 9. *Antiviral Activity of Antimicrobial Lipopeptide from Bacillus subtilis fmbj Against Pseudorabies Virus, Porcine Parvovirus, Newcastle Disease Virus and Infectious Bursal Disease Virus in vitro* / X. Huang [et al.] // *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. – 2006. – Vol. 12, N 4. – P. 373–377.
 10. *Mechanism of Inactivation of Enveloped Viruses by the Biosurfactant Surfactin from Bacillus subtilis* / D. Vollenbroich [et al.] // *Biologicals*. – 1997. – № 25. – P. 289–297.
 11. *Instruktsiya po primeneniyu: biologicheskii aktivnoe veshchestvo vetom 1.23.: utv. direktorom ООО NFP «Issledovatel'skiy tsentr» Lelyak A. I. ot 12.04.2012.* [Elektron. resurs]. – Rezhim dostupa: <http://vetom.ru/content/view/543/5/>.
 12. *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv* / pod obshch. red. R. U. Khabrieva. – M.: Meditsina, 2005. – 538 s.
 13. *Ashmarin I. P., Vasil'ev N. N., Ambrosov V. A.* Bystrye metody statisticheskoy obrabotki i planirovaniya eksperimentov. – L.: LGU, 1974. – 76 s.
 14. *Meditsinskaya virusologiya: rukovodstvo* / pod red. D. K. L'vova. – M.: ООО «Med. inform. agentstvo», 2008. – 656 s.
 15. *Oral therapy with human interferon alpha in calves experimentally injected with infectious bovine rhinotracheitis virus* / J.M. Cummins [et al.] // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. – 1993. – Vol. 41, N 3–4. – P. 193–197.

16. Fulton R. W., Burge L. J., McCracken L. J. Effect of recombinant DNA-derived bovine and human interferons on replication of bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, and respiratory syncytial viruses // American journal of veterinary research. – 1986. – Vol. 47. – P. 751–753.
17. *Sravnitel'noe izucheniye interferonogennoy aktivnosti preparatov na osnove Bacillus subtilis u telyat* / T. I. Glotova, A. G. Glotov, N. P. Tarabukina [i dr.] // Sb. tr. Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. «Aktual'nye problemy patologii i immunologii zhivotnykh», posvyashch. 100-letiyu so dnya rozhdeniya akad. VASKhNIL (RASKhN) Ya. R. Kovalenko. – M. 2006. – S. 461–464.

PREPARATION VETOM 1.23 ACTIVITY AGAINST BHV-1 UNDER CONDITIONS IN VITRO

T. I. Glotova, A. G. Glotov, G. A. Nozdrin, A. A. Nikonova, O. V. Semenova

Key words: Antivirus activity, vetom 1.23, infectious bovine rhinotracheitis, in vitro, cell culture

Summary. The search for new preparations effective against viral causative agents in cattle infections is the most important objective of the modern veterinary pharmacology. The virus of infectious bovine rhinotracheitis is widespread on the farms of Siberian region and plays an important part in animal pathology causing big economic losses in the modern livestock-breeding. Antiviral activity of the preparations referred to the group of probiotics is little studied. The antiviral activity of vetom 1.23 against BHV-1 is determined in vitro. The antiviral activity was assessed by reduction of the virus; the assessment was conducted after the virus's having interacted with vetom 1.23. Graft cell culture of MDBK calf's kidney was used in the experiment. Avirulent strain TK-A was used as the virus-test. vetom 1.23 was introduced in the maximal tolerant concentration ($62.5 \text{ mm}^3 / \text{cm}^3$). The experimental outcomes showed that vetom 1.23 at the dose recommended for the examination and introduced (maximal tolerant concentration) appeared to be little effective against BHV-1, it was poor inhibition in virus multiplication that was observed; the virus titer went down by $0.13\text{--}0.5 \log_{10}$. However, the preparation manifested expressed antivirus effect in higher concentrations.