

8. Houang E.T., Hince C., Howard A.J. (1983) The effect of composition of culture media on MIC values of antibiotics. *Antibiotics: assessment of antimicrobial activity and resistance* Russel A.D., Quesnel L.B., editors. The Society of Applied Bacteriology Technical.,18, 31-48 [in English].
9. Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C. Turck M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45, 493-496 [in English].
10. D'Amato R.F., Thornsberry C., Baker C.N. (1975) Effect of calcium and magnesium ions on the susceptibility of *Pseudomonas* species to tetracycline, gentamicin, polymixin B and carbenicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7, 596-600 [in English].
11. Chajkovskaja S.M., Navashin S.M., Tochenaja N.P. Izmenenija chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibiotikam pod vlijaniem ionov dvuhvalentnyh metallov // Antibiotiki. – 1978. – № 2. – S. 118-122.
12. Bushby S.R.M. (1973) Trimethoprim-Sulfamethoxazole: in vitro microbiological aspects. *J. Infect. Dis.* 128, 442-462 [in English].
13. Cooper K.E. (1964) The theory of antibiotic inhibition zones. *Analytical microbiology* Kavanagh F., editor. New York: Academic Press. P. 1-86 [in English].
14. Vandepitte J., Engbaek K., Piot P., Heuck C.C. (1991) Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. *Geneva: World Health Organization* [in English].
15. Chuma T., Kawamoto T., Shahada F., Fujimoto H. and Okamoto K. (2010) Antimicrobial susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs in Southern Japan with a modified agar dilution method. *J. Vet. Med. Sci.* 72 (5), 643-645 [in English].

**УДК 619:616-03:616.9:57.083.3**

**ПОЛЯКОВ И., e-mail:** [iv.pol@binomed.de](mailto:iv.pol@binomed.de)

**ИВАНОВА Л.**

*БИНОМЕД ГмбХ, Германия (BINOMED GmbH, Ulm, Germany)*

### **НОВЫЕ ПРИНЦИПЫ И ВОЗМОЖНОСТИ В СОЗДАНИИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ**

*В статье приведены результаты испытания лечебной и профилактической эффективности нового иммунобиологического препарата – аналога фракции клеточной стенки грибов для лечения и профилактики дерматита пальцев, межпальцевого свода, кожного некробактериоза крупного рогатого скота. Впервые при помощи синтетического аналога клеточной стенки грибов (Биновак® IDD) удалось не только лечить инфекционные болезни конечностей крупного рогатого скота, но и предотвращать проявление этих болезней в течение 150 дней. Механизм создания такой невосприимчивости еще предстоит изучить.*

**Ключевые слова:** коллоидный полисахарид; профилактика, лечение болезней копытца.

**Введение.** Исследованиями в области инфекционной патологии было показано, что элиминация патогенных микроорганизмов невозможна без стимуляции клеточного иммунитета. Без воспаления невозможно предотвратить проникновение патогена в организм, но с другой стороны, повышенная воспалительная реакция ведет к разрушению тканей организма, нарушению функций органов и другой необратимой патологии, включая возникновение аллергии и аутоиммунных процессов.

Проникновению патогена в организм препятствует адаптивный и врожденный иммунитет. Адаптивная иммунная система обладает большим разнообразием рецепторов для антигенов, при контакте с которыми образуются антитела или клеточные популяции с рецепторами к соответствующим антигенам, а также возникает иммунологическая память.

Врожденная иммунная система обеспечивает быстрое распознавание микроорганизмов через ограниченное количество рецепторов, которые заложены в эмбриогенезе. Агонисты этих рецепторов представляют собой консервативные молекулярные соединения, которые могут быть выявлены в широких группах микроорганизмов различных видов. Толл - подобные рецепторы (TLR), обеспечивают индивидуально реакцию врожденной иммунной системы на разные типы инфекций. Специфичность врожденной иммунной системы, в большей степени, связана с семейством рецепторов, известных как Toll-подобные рецепторы (TLR), которые играют решающую роль в ранней защите организма от патогенов [14].

Реакция врожденной иммунной системы развивается быстрее и может приводить к быстрой элиминации патогенов без участия приобретенного иммунитета.

В 1996 году была опубликована статья Хоффмана о гиперчувствительности мутантных по *Toll* дрозофил к грибам (10), а в 1997 году Меджитов, Престон-Халберт и Джейнуэй опубликовали данные о клонировании и свойствах *Toll*-подобного человеческого рецептора, который активировал адаптивный иммунитет [13].

TLR активируют внутриклеточные сигнальные пути, в результате чего происходит экспрессия генов цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, INF- $\alpha/\beta$  и других).

TLR находятся в иммунных клетках — моноцитах, макрофагах, нейтрофилах, дендритных клетках (ДК), естественных киллерах (NK-гранулярные лимфоциты периферической крови и лимфоидных органов) и в меньшей степени на эозинофилах, лимфоцитах [15], а также экспрессированы на эпителиальных, фибробластных, эндотелиальных клетках. Также TLR1,5,6,9 и другие участвуют в индукции биосинтеза интерферонов [3].

Множество агонистических молекул вовлекается в активацию клеток через TLR2, включая пептидогликан и липотейхоевую кислоту из грамположительных бактерий, бактериальных липопротеинов, микобактериальных липоарабиноманнанов, гликозилфосфатидилинозитола *Trypanosoma cruzi*, фенол-растворимого модулина, продуцируемого *Staphylococcus epidermidis*, а также зимозаном из дрожжей [21]. В то время как грамтрицательный бактериальный эндотоксин определяется через TLR4, было установлено, что ЛПС из *Leptospira* выявляются через TLR2 [25]. Одной из основ специфичности такого широкого спектра PAMP может быть специфическая гетеродимеризация TLR2 с агонистами TLR1 и TLR6, приводящая к активации продуцирования NF- $\kappa$ B и цитокинов (например, TNF- $\alpha$  или IL-12) [16]. Более того, инактивация гена TLR2 или TLR6 уменьшала реакционную способность иммунных клеток к микоплазменному липопептиду, что подразумевало зависимость распознавания макрофагов с активацией липопептида (MALP)-2 от димеров TLR2 и TLR6 [16]. При использовании синтетических лигандов к TLR 3, TLR 4 и TLR 9 удавалось снизить титр вируса гриппа в легких, защитить от проникновения листерий, а также снизить тяжесть течения листериоза, лейшманиоза, туберкулеза и малярии [1].

Так маннан из *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida albicans* имели родство к TLR4 [23], а фосфолипоманнан из *Candida albicans* – к TLR2 (частично TLR4, TLR6) [8]. Глюкуроноксилманнан из гриба *Cryptococcus neoformans* выявлялся TLR2, TLR4 [21].  $\beta$ -глюкан и

линейный (1 →3)-β-D-глюкан, как антигены, присутствующие во многих видах грибов, имели сродство с MyD88, в свою очередь, зимозан из *Saccharomyces cerevisiae* соединялся с гетеродимерами TLR2, TLR6 [9, 11, 17].

Также было установлено, что клетки иммунной системы животных способны защищать организм от заражения патогенными грибами без вовлечения циркулирующих антител. Наличие цитокинов, таких как IL-17 и IFN-γ, при T-клеточном ответе, наиболее эффективно и надежно защищало животных от грибных инфекций. Иммунитет не зависел от наличия антител [18].

Широкое применение вакцины Поливак–ТМ, Insol®Dermatophyton и Insol®Trichophyton для лечения и профилактики дерматофитозов лошадей, мелких домашних животных, крупного рогатого скота показало её профилактический, а также лечебный эффект. Эти грибные вакцины и антигены из грибов применяли с положительным эффектом на лошадях с «летней экземой» (аллергический дерматит), аллергическом дерматите у собак, при котором наблюдался сдвиг иммунного ответа Th2 (аллергия) в сторону Th1 (толерантность) [5,6]. Также эту вакцину использовали для лечения аспергиллёза воздухоносных мешков (Genzel et al., 2012), мокрецов [20], саркоида [12] у лошадей. Другую поливалентную вакцину использовали для лечения *Verucae vulgaris* (бородавки обыкновенны) у человека [7] и дерматит пальцев, межпальцевого свода и кожного некробактериоза крупного рогатого скота [19].

Иммуномодулирующий эффект у лошадей был выявлен *in vitro* после применения вакцины для лечения «летней экземы». Уровень интерлейкинов IL-10, TNFα и IFNγ в крови вакцинированных животных был статистически значительно выше, чем у контрольных животных. Это означает, сдвиг иммунного ответа от Th2 (аллергия) до Th1 (толерантность) [2,4].

Эффективность вакцины Insol® Dermatophyton при саркоиде была испытана на 40 лошадях. После применения вакцины у 26 лошадей (65%) было полное излечение саркоида без рецидивов. У 14 лошадей (35%) улучшение симптомов (снижение величины опухоли и восстановление кожной поверхности) после 2-й или 3-й инъекции Insol® Dermatophyton. применение вакцины вызывало изменение формы саркоидов и отторжения поврежденной опухолью тканей [12]. Основным возбудителем саркоида лошадей является папиллома вирус.

Аналогичное проявление иммунобиологической активности вакцины Поливак–ТМ наблюдалось при применении на людях с массивным поражением кожного покрова вульгарными бородавками (*Verucae vulgaris*). У некоторых из них были повреждены подошвы ног и лечение общепринятыми методами вызывало диссеминацию поражений. У других – бородавки находились под ногтевыми пластинами или в непосредственной близости от них, что затрудняло применение лекарственных средств [7].

Применение вакцины Insol® Dermatophyton позволило полностью излечить лошадей в 60% - 80% случаев мокрецов в опытах на 26 животных. Особенно высокая эффективность применения вакцины для лечения мокрецов у лошадей наблюдалась при хроническом течении болезни. Все 10 животных выздоровели без применения других лекарственных средств. Следует отметить, что с мест поражений, в основном, был выделен *Staphylococcus aureus*, а также стрептококки, *Acinetobacter calcoaceticus* и другие не патогенные микроорганизмы [20].

Использование вакцины из грибов при лечении дерматита пальцев, межпальцевого свода и кожного некробактериоза крупного рогатого скота значительно снижало клинические проявления этих болезней.

**Цель работы.** Целью настоящих исследований было испытание лечебной и профилактической эффективности нового иммунобиологического препарата – аналога фракции клеточной стенки грибов для лечения и профилактики дерматита пальцев, межпальцевого свода, кожного некробактериоза крупного рогатого скота.

**Материалы и методы исследований.**

В качестве действующего вещества использовали растворимый коллоидный полисахарид - аналог фракции клеточной стенки грибов.

Присутствие специфических антигенов или их аналогов определяли при помощи иммунно-ферментного анализа с сыворотками к грибу *Candida albicans* (Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH).

Содержание 1,3-β-D-глюкана в антигенных образцах определяли с использованием набора Fungitell® (Cape Cod, USA). (Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH).

В связи с тем, что полисахаридные фракции, в частности глюканы, способны вызывать эффект лизиса *Limulus Amebocyte* (LAL), был проведен стандартный тест для выявления бактериального эндотоксина в биологических образцах согласно Евр. Фарм. 2.6.14 (Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH).

Определение цитокинов и интерлекинов в культуре клеток было выполнено в соответствующем специфическом иммунно-ферментном тесте (Genzyme, Dianova, Hoffmann-La-Roche и др.) (König W., König B., 1996, König W., 1998).

Для исследования эффективности иммунологических препаратов были использованы коровы репродуктивного возраста. Безвредность была исследована путем внутрибрюшинного введения 0,5 мл раствора соответствующей фракции или конъюгата 8 – 10 белым мышам (9 CFR 113.33).

Оценка лечебного и профилактического действия при заболеваниях конечностей у крупного рогатого скота

Препарат применяли животным репродуктивного возраста двух - четырехкратно внутримышечно с интервалом 10-14 дней в дозе 5,0 мл с лечебной целью. С профилактической целью препарат применяли двукратно с интервалом 10-14 дней в дозе 1 мл. Раствор полисахарида вводили в область шеи или заднебедренной группы мышц.

Эффективность применения полисахаридного комплекса учитывали по проявлению клинических признаков болезни у животных на 30-ый – 35-ый день и 60-ый – 65-ый день. Профилактическую активность препарата учитывали в течение не менее, чем 170 дней после применения препарата и не реже, чем каждые 30 дней.

Проявление клинических симптомов дерматита пальцев, межпальцевого свода и кожного некробактериоза крупного рогатого скота было оценено на основе пунктов пятибалльной системы учета (ПСУ):

- здоровое (-) – отсутствие клинических признаков болезни и нарушений в движении
- лёгкая форма (+) – слабая хромота с признаками воспаления в межпальцевом пространстве, болезненность при пальпации не выражена
- средняя форма (++) – хромота, признаки воспаления и отёк в межпальцевом пространстве, болезненность при пальпации
- тяжёлая форма (+++) – хромота, передвижение затруднено признаки гнойного воспаления и отёк и повышение местной температуры в области межпальцевого пространства, болезненность при пальпации
- очень тяжелая форма (++++) – животное не опирается на поражённую конечность, гнойно-некротическое воспаления и отёк с повышенной местной температурой в области межпальцевого пространства, движение не возможно или сильно ограничено.

**Результаты исследований и их обсуждение**

Воздействие антигенов, их конъюгатов и аналогов на иммунную систему *ex vivo*.

Совместное культивирование антигенов из грибов с нейтрофилами человека не вызывало выбросов таких воспалительных белков как  $\beta$  -глюкуронидаза и синтез лейкотриенов (ЛТВ<sub>4</sub>).

При совместном культивировании больших разведений грибных антигенов с культурами клеток нейтрофилов и кератиноцитов наблюдалось выделение IL-8 через 3, 12 и 18 часов, но не вызывало образование TNF- $\alpha$ .

Было установлено, что фракции из грибов были способны вызывать выделение в культуре клеток лимфоцитов следующих интерлейкинов: TNF- $\alpha$ , IL-12; IL-6 и IL-10. Как следовало ожидать в этом случае, антигены из грибов не вызывали выделение IL-4 сами по себе и угнетали его выделение, вызванное SEB и респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ).

Учитывая интерес к воздействию фракций из грибов на выделение иммуноглобулинов, было изучен синтез IgA, IgG, IgM и IgE. Фракции грибов вызывали повышение синтеза IgA при разведении антигенов 1:10 - 1:10000000.

Синтез поликлональных IgA, очевидно, представляет существенный компонент защиты кожного покрова и слизистых оболочек животных. Очевидно, что такое активное воздействие на иммунную систему фракций из грибов происходит из-за их полисахаридной структуры. Поликлональная активация клеточного и гуморального иммунитета организма является перекрестно-реактивной к вызванному стимулированию и обладает широкой спецификой защиты к различным антигенам.

Таким образом, грибные антигены, обладая мощным воздействием на клетки человека и животных, могут быть использованы в создании поливалентных биологических средств, для контроля болезней инфекционного и неинфекционного происхождения, путем воздействия на иммунную систему.

Краткая сравнительная характеристика препаратов из грибов представлена в таблице 1.

Таблица 1

**Показатели основных тестов на активность и безвредность препаратов для использования на животных**

| № п/п. | Описание антигена * | Тест на эндотоксин [IU/мл] | Тест на $\beta$ -D-Глюкан | Тест на антиген <i>C.albicans</i> | Безопасность              | Стерильность       |
|--------|---------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------|--------------------|
| 1      | 2                   | 3                          | 4                         | 5                                 | 6                         | 7                  |
| 1      | Альбикан®           | < 60; $\geq$ 600           | 133 нг/мл                 | + / ++                            | Безвреден для белых мышей | Стерильный раствор |
| 2      | Биовер®             | < 60; $\geq$ 600           | 133 нг/мл                 | + / ++                            | Безвреден для белых мышей | Стерильный раствор |
| 3      | БИНОЛЬБИН®          | < 6,000; $\geq$ 60,000     | 7.4 мкг/мл                | + / ++                            | Безвреден для белых мышей | Стерильный раствор |
| 4      | Биовак® IDD         | < 60; $\geq$ 600           | 115 нг/мл                 | -                                 | Безвреден для белых мышей | Стерильный раствор |
| 5      | БИНО® Репростим     | < 60; $\geq$ 600           | 102 нг/мл                 | -                                 | Безвреден для белых мышей | Стерильный раствор |
| 6      | БИНО® Эндомастим    | < 6; $\geq$ 600            | 21 пг/мл                  | -                                 | Безвреден для белых мышей | Стерильный раствор |

Продолжение таблицы 1

| 1 | 2   | 3                      | 4         | 5      | 6                         | 7                  |
|---|---|------------------------|-----------|--------|---------------------------|--------------------|
| 7 | Положительный контроль  | < 60,000;<br>≥ 600,000 | 14 мкг/мл | + / ++ | Безвреден для белых мышей | Стерильный раствор |
| 8 | Негативный контроль<br>- питательная среда для выращивания грибов | < 6; ≥ 60              | -         | -      | Безвреден для белых мышей | Стерильный раствор |

**Примітка:** мг>мкг>нг>пг

\*Альбикан<sup>®</sup> - препарат для лечения и профилактики аллергических болезней кожи и дыхательных путей у кошек, собак и спортивных лошадей (конъюгированный аминополисахаридный комплекс дрожжевых клеток)

Биовер<sup>®</sup> - препарат для лечения и профилактики аллергического ринита у собак и кошек (конъюгированный аминополисахаридный комплекс дрожжевых клеток)

БИНОЛЬБИН<sup>®</sup> - препарат для лечения и профилактики аллергических и лечения вирусных конъюнктивитов у животных (аминополисахаридный комплекс дрожжевых клеток)

Биовак<sup>®</sup> IDD - препарат для профилактики и лечения дерматита пальцев (раствор коллоидного полисахарида - аналога фракции клеточной стенки грибов) межпальцевого свода и кожного некробактериоза крупного рогатого скота

БИНО<sup>®</sup> Репростим - иммунорегулятора функции воспроизводства в послеродовой период у коров (раствор коллоидного полисахарида - аналога фракции клеточной стенки грибов)

БИНО<sup>®</sup> ЭндоМастим - препарат для лечения мастита и эндометрита у лактирующих коров (раствор коллоидного полисахарида - аналога фракции клеточной стенки грибов)

Положительный контроль - 0,5% раствор антигена из *C.albicans*, штамм 008L-1.

IU, международные (эндотоксин) единицы; (+) активность обнаружена; (-) активность не обнаружена

Лечебная и профилактическая эффективность фракций из грибов при болезнях конечностей крупного рогатого скота.

Препараты были испытаны при дерматите пальцев, межпальцевого свода и кожного некробактериоза крупного рогатого скота. Диагноз был поставлен на основании клинических признаков болезни. Как известно из литературных источников, основными возбудителями этих болезней являются анаэробные и аэробные микроорганизмы, трипаносомы и другие. Болезни вызывают хромоту и снижение продуктивности у больных животных. Основным критерием эффективности терапии было снижение хромоты у животных. Лечебная эффективность была проверена на 107 животных.

Результаты терапии представлены в таблицах 2, 3 и 4.

Таблица 2

**Лечебная эффективность корпускулярных и растворимых фракций из грибов и их аналогов**

| Антиген                                    | Количество животных/ интенсивность проявления болезни | Количество введений | Количество здоровых животных после первого введения |                           |
|--|---|---------------------|---|---------------------------|
|  |   |                     | Через 30-35 дней                                    | Через 53-55 дней введения |
| 1  | 2   | 3                   | 4   | 5                         |
| Смесь корпускулярной и растворимой фракции | 10/<br>6 ++<br>4 +++                                  | 3                   | 10  | 10                        |
| Корпускулярный                             | 10/<br>5 ++<br>4 +++<br>1 +++++                       | 3                   | 10  | 10                        |
| Биовак IDD                                 | 10/<br>7 ++<br>3 +++                                  | 3                   | 10  | 10                        |

Таблиця 3

**Лечебная эффективность различных доз растворимого аналога фракций клеточной стенки из грибов**

| Группа | Антиген    | Количество животных/<br>интенсивность проявления болезни | Количество введений/<br>доза | Количество здоровых животных         |                                      |
|--------|------------|--|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|        |            |  |                              | Через 33 дней после первого введения | Через 60 дней после первого введения |
| 1      | Биовак IDD | 5 ++<br>12 +++++   | 3/ 5 мл                      | 11/+<br>7/++                         | 17/+                                 |
| 2      | Биовак IDD | 7 ++<br>8 +++<br>8 +++++                                 | 3/ 2,5 мл                    | 9/+<br>5/++<br>9/+++                 | 23/+                                 |

Таблиця 4

**Лечебная эффективность различных доз растворимого аналога фракций клеточной стенки из грибов**

| Группа | Антиген    | Количество животных/<br>интенсивность проявления болезни | Количество введений/<br>доза | Количество здоровых животных                      |
|--------|------------|--|------------------------------|---|
|        |            |  |                              | Через 51 дней после первого введения              |
| 1      | Биовак IDD | 19 +++++   | 3/ 5 мл                      | 5/+<br>7/++<br>5/+++<br>2 – выбракованы           |
| 2      | Биовак IDD | 18 +++++   | 3/ 3,0 мл                    | 1/+<br>4/++<br>6/+++<br>2/++++<br>5 – выбракованы |

Никакой общей и местной реакции после применения антигенов и фракций не наблюдалось. Эффективность вакцинации составляла около 60-100% после применения вакцины в дозе 5 мл. Корпускулярные, растворимые фракции, их смесь и аналоги обладали выраженным терапевтическим эффектом при дерматите пальцев, межпальцевого свода и кожного некробактериоза крупного рогатого скота.

Дальнейшие исследования были направлены на выяснение профилактической эффективности фракций из грибов при болезнях конечностей крупного рогатого скота. Профилактический эффект оценивали по соотношению больных и здоровых животных в группах, где применяли профилактическую вакцинацию и плацебо.

Профилактическая эффективность была испытана на 415 животных. Все животные находились на ферме с беспривязным содержанием. Группа из 100 животных была вакцинирована Биовак® IDD в дозе 1 мл, другая группа из 100 животных была вакцинирована Биовак® IDD в дозе 2,5 мл, а третья группа была обработана с использованием плацебо. Препараты и плацебо вводили внутримышечно двукратно с интервалом 10-14 дней. За животными было установлено наблюдение. Следует отметить, что введение препарата не вызывало никаких местных и общих реакций, независимо от дозы (табл. 5).

**Профілактична ефективність і інтенсивність проявлення клінічних  
признаків дерматиту пальців, міжпальцевого свода і кожного некробактеріоза  
крупного рогатого скота (DD, ID і IP)**

| <b>73-ий день після першого введення</b>   |  |   |
|--|--|---|
| Доза 1 мл<br>100 тварин                    | Доза 2,5 мл<br>100 тварин                  | Контроль<br>215 тварин                      |
| У 7 тварин було проявлення хвороби (+)     | У 7 тварин було проявлення хвороби (+)     | У 21 тварин було проявлення хвороби (+)     |
|  |  | У 18 тварин було проявлення хвороби (++)    |
|  |  | У 6 тварин було проявлення хвороби (+++)    |
| <b>107-ий день після першого введення</b>  |  |   |
| Доза 1 мл<br>100 тварин                    | Доза 2,5 мл<br>100 тварин                  | Контроль<br>215 тварин                      |
| У 7 тварин було проявлення хвороби (+)     | У 9 тварин було проявлення хвороби (+)     | У 11 тварин було проявлення хвороби (+)     |
|  |  | У 12 тварин було проявлення хвороби (++)    |
|  |  | У 9 тварин було проявлення хвороби (+++)    |
| 4 тварин вибраковані із-за хвороби копитця | 4 тварин вибраковані із-за хвороби копитця | 27 тварин вибраковані із-за хвороби копитця |
| <b>150-ий день після першого введення</b>  |  |   |
| Доза 1 мл<br>100 тварин                    | Доза 2,5 мл<br>100 тварин                  | Контроль<br>215 тварин                      |
| У 8 тварин було проявлення хвороби (+)     | У 25 тварин було проявлення хвороби (+)    | У 85 тварин було проявлення хвороби (+)     |
|  |  | У 10 тварин було проявлення хвороби (++)    |
|  |  | У 12 тварин було проявлення хвороби (+++)   |
| 2 тварин вибраковані із-за хвороби копитця | 1 тварин вибраковані із-за хвороби копитця | 20 тварин вибраковані із-за хвороби копитця |
| <b>170-ий день після першого введення</b>  |  |   |
| Доза 1 мл<br>100 тварин                    | Доза 2,5 мл<br>100 тварин                  | Контроль<br>215 тварин                      |
| У 25 тварин було проявлення хвороби (+)    | У 41 тварин було проявлення хвороби (+)    | У 112 тварин було проявлення хвороби (+)    |
| 4 тварин вибраковані із-за хвороби копитця | 2 тварин вибраковані із-за хвороби копитця | 22 тварин вибраковані із-за хвороби копитця |

Проведенные исследования показали высокую профилактическую эффективность препарата Биновак® IDD при дерматитах пальцев, межпальцевого свода и кожного некробактериоза крупного рогатого скота. Применение вакцины позволило значительно снизить выбраковку животных из-за поражений конечностей, профилактировать развития глубоких повреждений кожи копытцев и межпальцевого свода. Профилактическая эффективность вакцинации на 150 - 170 день после первого введения вакцины в дозе 1 мл составляла около 86% и 65%, а 2,5 мл – 70% и 52% соответственно. В те же сроки 127 и 181 животных (59 и 84%) из контрольной группы имели клинические симптомы DD, ID и IP и были выбракованы из-за поражений конечностей.

Эти исследования демонстрирует эффективность профилактической вакцинации животных в дозе 1,0 мл. Продолжительность иммунитета составляла около 5,5 месяца. После этого срока количество животных с клиническими признаками DD, ID и IP стало увеличиваться, но не так интенсивно, как в контрольной группе. Таким образом применение препарата из коллоидного полисахарида позволило лечить, предотвращать развитие и профилактировать кожные поражения пальцев конечностей дойных коров и предотвращать значительные экономические потери, обусловленные снижением надоев и выбраковкой продуктивных животных.

При анализе литературных источников и собственных исследований было установлено иммуномодулирующее действие вакцин и антигенов из грибов, которое позволяло значительно снизить клинические проявления кожной аллергии, экзематозных повреждений тканей (мокрецы лошадей), саркоида лошадей, дерматита пальцев, межпальцевого свода и кожного некробактериоза крупного рогатого скота, а также других грибных, бактериальных и вирусных болезней животных. При этом можно сделать вывод, что при введении в организм животным вакцин и антигенов из грибов, развивается ответная реакция, связанная с врожденным, клеточным иммунитетом, выделением интерлейкинов и интерферонов, которые способны снижать клинические признаки болезней, обусловленных различными этиологическими факторами.

#### **Выводы и перспективы дальнейших исследований**

Грибные антигены и их аналоги, обладая мощным воздействием на клетки человека и животных *ex vivo*, могут быть использованы в создании поливалентных иммунобиологических средств, для контроля болезней животных, путем воздействия на защитную систему организма.

Нашими исследованиями было показано, что при помощи синтетического аналога клеточной стенки грибов (Биновак® IDD) удавалось не только лечить инфекционные болезни конечностей крупного рогатого скота, но и предотвращать проявление этих болезней в течение 150 дней. Механизм создания такой невосприимчивости еще предстоит изучить. Так же на наш взгляд необходимо провести дальнейшие исследования применения полисахаридов для лечения других важных патологий животных с участием микроорганизмов, таких как мастит и эндометрит.

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Саидов М.З. Толл-рецепторы – распознающие рецепторы врожденной иммунной системы и глаз (литературный обзор) / М.З. Саидов, Н.С. Гаджиева, Н.А. Гаврилова, А.В. Шацких, З.Г. Иванова, А.В. Федоров // Офтальмохирургия. – 2012.-N 3.-С.77-82.
2. Brunner M., Therapie des Sommerkzems mit Insol® Dermatophyton – eine Feldstudie, Berlin, Freie Univ., Diss., 2015.

3. Boehme K.W. Innate sensing of viruses by toll-like receptors/ Boehme K.W., Compton T. // *J. Virol.*– 2004.– Vol. 78.– P. 7867-7873.
4. Dronov A. Hinweise für eine immunmodulatorische Wirkung von Insol® Dermatophyton auf equine Leukozyten in vitro./ Dronov A., Rohwer J. //Abstractheft XVII. Tagung über Pferdekrankheiten im Rahmen der Equitana 2007 (102-104) und Vet-MedReport Sonderausgabe V4 I (3); 2007.17.
5. Farnow D., Karle J., Poliakov I., Ivanova L. Antigenic preparations. US 6, 379, 678 B1, Apr.30, 2002.
6. Gehlen H., Therapie des Sommerekzems mit Insol® Dermatophyton – eine Feldstudie./ Gehlen H., Brunner M., Klier J., Reese S. // *Pferdeheilkunde*, 2016; 32, 306-315
7. Ivanova L., Poliakov I. Mycosis vaccines. EP 0956042 B1, Bulletin 2006/49, 2006.
8. Jouault T, Candida albicans phospholipomannan is sensed through Toll-like receptors./ Jouault T, Ibata-Ombetta S, Takeuchi O, et al. // *J Infect Dis* 2003; 188: 165-172.
9. Kataoka K, Activation of macrophages by linear (Iright-arrow3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity./ Kataoka K, Muta T, Yamazaki S, Takeshige K. // *J Biol Chem* 2002; 277: 36825-36831.
10. Lemaitre B., The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in drosophila adults./ Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. // *Cell*, 1996, т. 86, с. 973–983.
11. Lebron F, Pneumocystis carinii cell wall beta-glucans initiate macrophage inflammatory responses through NF-kappaB activation./ Lebron F, Vassallo R, Puri V, Limper AH. // *J Biol Chem* 2003; 278: 25001-25008.
12. Mallison J. Der klinische Fall – Der polyvalente Impfstoff Insol® Dermatophyton bei Patienten mit Equinen Sarkoiden. *Pferde Spiegel*, 2015; 18(04): 162-166
13. Medzhitov R., A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity./ Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr. // *Nature*, 1997, т. 388, № 6640, с. 394–397.
14. Medzhitov R., Janeway C. Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways // *Immunol Rev.*– 2000.– Vol. 173.– P. 89-97.
15. Micera A., Stampachiachiere B., Aronni S., dos Santos M.S., Lambiase A. // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*– 2005.– Vol. 5.– P. 451-458.
16. Muranski P, Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. / Muranski P, Borman ZA, Kerkar SP, Klebanoff CA, Ji Y, et al. // *Immunity* 2011; 35: 972–985.
17. Ozinsky A, The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune System is defined by Cooperation between Toll-like receptors. / Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al. // *Proc Natl AcadSci USA* 2000; 97: 13766-13771.
18. Pepper M, Different routes of bacterial infection induce long-lived TH1 memory cells and short-lived TH17 cells. / Pepper M, Linehan JL, Pagan AJ, Zell T, Dileepan T, et al. // *Nat Immunol* 2010;11: 83–89.
19. Polyakov I, Ivanova L. Compositions for the treatment and prevention of hoof and claw diseases, 2017.
20. Preissegger –Ilgenfritz M., Schmidt P., Fenner A. Neue Erkenntnisse zum Einsatz von Insol® Dermatophyton beim Fesselelzem des Pferdes, Present., 2005.
21. Roeder A, Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity./ Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC // *Med Mycol.* 2004 Dec;42(6):485-98.
22. Shoham S, Toll-like receptor 4 mediates intracellular signalling without TNF-alpha release in response to Cryptococcus neoformans Polysaccharide capsule./ Shoham S, Huang C, Chen JM, et al. // *J Immunol* 2001; 166: 4620-4626.
23. Tada H, Saccharomyces cerevisiae- and Candida albicans -derived mannan induced production of tumour necrosis factor alpha by human monocytes in a CD 14- and Toll-like receptor 4-dependent manner./ Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, et al. // *Microbiol Immunol* 2002; 46: 503-512.
24. Takeda K, Toll-like receptors./ Takeda K, Kaisho T, Akira S.// *Ann Rev Immunol* 2003; 21: 335-376.
25. Werts C, Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism./ Werts C, Tapping RI, Mathison JC, et al. // *Nat Immunol* 2001; 2: 346-352.

## НОВІ ПРИНЦИПИ ТА МОЖЛИВОСТІ В СТВОРЕННЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ ХВОРОБ ТВАРИН / Поляков І, Іванова Л.

У статті наведені результати випробування лікувальної та профілактичної ефективності нового імунобіологічного препарату - аналога фракції клітинної стінки грибів для лікування і профілактики дерматиту пальців, межпальцевого зводу, шкірного некробактеріозу великої рогатої худоби. Вперше за допомогою синтетичного аналога клітинної стінки грибів (Біновак® IDD) вдалося не тільки лікувати інфекційні хвороби кінцівок великої рогатої худоби, а й запобігати прояв цих хвороб протягом 150 днів. Механізм створення такої несприйнятливості ще належить вивчити.

**Ключові слова:** колоїдний полісахарид; профілактика, лікування хвороб копитець.

## NEW PRINCIPLES AND POSSIBILITIES FOR CREATION OF IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS AND TREATMENT OF ANIMAL DISEASES / Polyakov I, Ivanova L.

The object of the present publication is the provision of new composition - analogue of fraction from cell wall of fungi, for use in a method of treating and preventing digital, interdigital dermatitis and interdigital phlegmone in cattle.

Fungal antigens and their analogues, having a powerful effect on human and animal cells ex vivo, can be used in the creation of polyvalent immunobiological agents, for controlling animal diseases, by affecting the body's defence system.

Our studies have shown that with the help of a synthetic analogue of the cell wall of fungi (Binovac® IDD), it was possible not only to treat infectious diseases of the extremities of cattle, but also to prevent the manifestation of these diseases within 150 days. The mechanism for creating such immunity is yet to be studied. Also, in our opinion, it is necessary to conduct further studies of the use of polysaccharides for the treatment of other important pathologies of animals involving microorganisms such as mastitis and endometritis.

**Keywords:** colloidal polysaccharide; treating and preventing digital, interdigital dermatitis and interdigital phlegmone in cattle.

## REFERENCES

1. Saidov M.Z., Gadzhieva N.S., Gavrilova N.A., Shackih A.V., Ivanova Z.G., Fedorov A .V. (2012) Toll-receptory – raspoznajushhie receptory vrozhdennoj immunnnoj sistemy i glaz (literaturnyj obzor).[Toll-receptors - recognizing the receptors of the innate immune system and the eye (literary review)] *Oftal'mohirurgija. – Ophthalmosurgery.* 3, 77-82 [in Russian].
2. Brunner M. (2015), Therapie des Sommerkezems mit Insol® Dermatophyton – eine Feldstudie, Berlin, Freie Univ., Diss. [in English]
3. Boehme K.W. & Compton T. (2004) Innate sensing of viruses by toll-like receptors/ *J. Virol.* Vol. 78.– P. 7867-7873 [in English].
4. Dronov A., Rohwer J. (2007) Hinweise für eine immunmodulatorische Wirkung von Insol® Dermatophyton auf equine Leukozyten in vitro [Evidence for an immunomodulatory effect of Insol® Dermatophyton on equine leukocytes in vitro.] *Abstractheft XVII. Tagung über Pferdekrankheiten im Rahmen der Equitana 2007 (102-104) und Vet-MedReport Sonderausgabe V4 I (3);* 17 [in Deutsch].
5. Farnow D., Karle J., Poliakov I., Ivanova L. (2002) Antigenic preparations. US 6, 379, 678 B1. [in English].
6. Gehlen H., Brunner M., Klier J., Reese S. (2016) Therapie des Sommerkezems mit Insol® Dermatophyton – eine Feldstudie [Therapy of summer eczema with Insol® Dermatophyton - a field study.]. *Pferdeheilkunde –Pferdeheilkunde,* 32, 306-315 [in Deutsch].
7. Ivanova L., Poliakov I. (2006) Mycosis vaccines. EP 0956042 B1. Bulletin 2006/49. [in English].
8. Jouault T, Ibata-Ombetta S, Takeuchi O, et al. (2003) Candida albicans phospholipomannan is sensed through Toll-like receptors. *J Infect Dis* 188: 165-172 [in English].

9. Kataoka K, Muta T, Yamazaki S, Takeshige K. (2002) Activation of macrophages by linear (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *J Biol Chem*. 277: 36825-36831 [in English].
10. Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in drosophila adults. *Cell*, 86, 973–983[in English].
11. Lebron F, Vassallo R, Puri V, Limper AH. (2003) Pneumocystis carinii cell wall beta-glucans initiate macrophage inflammatory responses through NF-kappaB activation. *J Biol Chem*; 278: 25001-25008 [in English].
12. Mallison J. (2015) Der klinische Fall – Der polyvalente Impfstoff Insol® Dermatophyton bei Patienten mit Equinen Sarkoiden [The clinical case - The polyvalent vaccine Insol® Dermatophyton in patients with equine sarcoids] *Pferde Spiegel – Horse mirror*, 18(04): 162-166 [in Deutsch].
13. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, Vol. 388, 6640, 394–397 [in English].
14. Medzhitov R., Janeway C. Jr. (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 2000.– Vol. 173.6 89-97 [in English].
15. Micera A., Stampachiachiere B., Aronni S., dos Santos M.S., Lambiase A. (2005) Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.– Vol. 5., 451-458[in English].
16. Muranski P, Borman ZA, Kerkar SP, Klebanoff CA, Ji Y, et al. (2011) Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity*. 35: 972–985 [in English].
17. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al. (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 13766-13771 [in English].
18. Pepper M, Linehan JL, Pagan AJ, Zell T, Dileepan T, et al. (2010) Different routes of bacterial infection induce long-lived TH1 memory cells and short-lived TH17 cells. *Nat Immunol*. 11: 83–89 [in English].
19. Polyakov I, Ivanova L. (2017) Compositions for the treatment and prevention of hoof and claw diseases, [in English].
20. Preissegger –Ilgenfritz M., Schmidt P., Fenner A. (2005) Neue Erkenntnisse zum Einsatz von Insol® Dermatophyton beim Fesselektzem des Pferdes, *Present*. [in English].
21. Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC (2004) Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol*. 42(6):485-98 [in English].
22. Shoham S, Huang C, Chen JM, et al. (2001) Toll-like receptor 4 mediates intracellular signalling without TNF-alpha release in response to Cryptococcus neoformans Polysaccharide capsule. *J Immunol*. 166: 4620-4626 [in English].
23. Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, et al. (2002) Saccharomyces cerevisiae- and Candida albicans - derived mannan induced production of tumour necrosis factor alpha by human monocytes in a CD 14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol*. 46: 503-512 [in English].
24. Takeda K, Kaisho T, Akira S. (2003) Toll-like receptors. *Ann Rev Immunol*; 21: 335-376 [in English].
25. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, et al. (2001) Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*. 2: 346-352 [in English].