УДК 619:57.083.35+619:616.98:578.822.2

ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТРАНСОВАРИАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ЭНТЕРИТОВ ТЕЛЯТ

***Борисовец Д.С., *Зуйкевич Т.А., **Красочко П.А., *Згировская А.А., *Осипенко А.Е., **Понаськов М.А.**

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Введение. На сегодняшний день нет универсальных средств, обладающих широким спектром противоинфекционного действия и высокой эффективностью для лечения и профилактики молодняка крупного рогатого скота при желудочно-кишечных инфекциях, вызванных вирусом диареи, инфекционного ринотрахеита, рота-коронавирусами. Поэтому перспективным в данном направлении является разработка препаратов на основе специфических иммуноглобулинов, способных образовывать комплексы антиген-антитело с наиболее распространенными возбудителями энтеритов с последующей их нейтрализацией и выведением из организма [1].

Одними из таких иммуноглобулинов являются иммуноглобулины, выделяемые из желтка вакцинированных кур - IgY (yolk immunoglobulin). Данные антитела можно получать в большом количестве неинвазивным способом, что делает кур поставщиком недорогих специфических антител. Антитела могут быть введены перорально в различных формах, включая яичный порошок, полученный в распылительной сушилке, водорастворимая фракция желтков или очищенные IgY [2-6].

Использование IgY для пассивной иммунизации имеет отличительные преимущества по сравнению с IgG млекопитающих:

– возможность получения большого количества антител (от одной курицы за месяц можно получить в 15–17 раз больше иммуноглобулинов, чем от одного кролика). По разным данным, желток куриного яйца содержит IgY в высокой концентрации (8-20 мг/мл). Это обусловлено легким переходом сывороточных антител в белок яйца находящегося в яичнике, далее происходит активный перенос и аккумуляция IgY в желточном мешке;

– IgY-антитела обладают в 5 раз большим сродством к конкретному антигену и реагируют быстрее, чем IgG млекопитающих;

– выделение IgY происходит через бескровный физиологический процесс (кладка яиц), тогда как для извлечения IgG необходимо кровопускание, из-за чего животное испытывает боль;

– IgY не взаимодействуют ни с компонентами комплемента, ни с ревматоидным фактором, ни с Fc-рецепторами клеток млекопитающих. Кроме того, расходы на содержание птиц значительно ниже, чем на содержание крупных млекопитающих (лошадей, ослов, мулов, коров), часто используемых для пассивной иммунизации.

Указанные преимущества IgY-технологий создают необходимость более широкого применения птичьих антител в научных исследованиях, диагностике и иммунотерапии инфекционных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных [1].

Целью данной работы является определение специфической активности,

полученных при разработке новых ветеринарных биопрепаратов, трансовариальных иммуноглобулинов в отношении возбудителей инфекционных энтеритов телят.

Материалы и методы исследований. Работа выполнялась на базе отдела вирусных инфекций и отдела болезней птиц и физико-химических исследований РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», вивария института.

Исследования проводились с использованием трансовариальных иммуноглобулинов, полученных на основании ранее разработанного нами метода выделения с использованием органических растворителей.

Специфическая активность трансовариальных иммуноглобулинов заключалась в специфическом связывании и нейтрализации вирусов и бактерий-возбудителей инфекционных энтеритов телят – вирусов диареи, инфекционного ринотрахеита, рота- и коронавирусов.

Нейтрализующая активность IgY кур-несушек определяли в сравнении с IgG кроликов в отношении дозы вирусного антигена (100 $ТЦД_{50}$/0,1 $см^3$). В качестве тест-вируса для постановки реакции нейтрализации использован вирус диареи (штамм «КМИЭВ-V120», депонированный в музее штаммов микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»).

Определяли длительность нейтрализации вирусного антигена от 1 до 7 суток, которую оценивали по степени проявления ЦПД вируса в культуре клеток при постановке реакции нейтрализации.

Цитотоксичность IgY кур-несушек в сравнении с IgG кроликов также оценивали на перевиваемой культуре клеток MDBK.

Специфическая активность трансовариальных иммуноглобулинов определяли экспресс-методом в реакции иммунодиффузии против антигена вируса диареи.

Для этого готовили 2%-ную агарозу на изотоническом физиологическом растворе, расплавляли в микроволновой печи и разливали в чашки Петри по 15-20 мл. После застывания пробойником формировали лунки, в которые вносили испытуемые иммуноглобулинсодержащие пробы или их разведения по 200 мкл.

Пробы с антителами разводили двукратно от 1:2 до 1:32 и ставили против антигена вируса диареи (100 $ТЦД_{50}$/0,1 $см^3$).

Наличие специфических полос преципитации указывало на специфическую активность трансовариальных иммуноглобулинов в отношении антигена вируса диареи.

Результаты исследований. Результаты изучения нейтрализующей активности IgY кур-несушек представлены в таблице.

Таблица – Нейтрализующая активность IgY кур-несушек в сравнении с IgG кроликов

№ п/п	Группа животных	Титры антител в РН, log_2
1	IgY кур-несушек	5,2±0,13***
2	IgG кроликов	5,33±0,33***
3	Контрольная группа (куры-несушки)	0
4	Контрольная группа (кролики)	1,0±0,58

*Примечание: *** - P≤0,001.*

Результаты исследований, представленные в таблице, свидетельствуют о выраженной нейтрализующей активности IgY кур-несушек и IgG кроликов в отношении вируса диареи (штамм «КМИЭВ-V120») в дозе 100 $ТЦД_{50}$/0,1 $см^3$. При

этом установленный уровень антител в яйце кур-несушек (5,2±0,13 log_2) и крови кроликов (5,33±0,33 log_2) не имел достоверных различий.

В результате проведенных исследований по оценке цитотоксичности IgY кур-несушек в сравнении с IgG кроликов на перевиваемой культуре клеток MDBK установлено, что водорастворимая фракция, содержащая желточные иммуноглобулины IgY кур-несушек не оказывала цитотоксического действия на перевиваемую культуру клеток MDBK, в то время как внесение IgG-содержащей сыворотки крови кроликов вызывала дегенерацию монослоя клеток MDBK в разведениях 1:2-1:4.

Исследования по изучению длительности нейтрализации вирусного антигена, показали, что оптимальное время для окончательного учета реакции нейтрализации для трансовариальных иммуноглобулинов составляет 96 часов, т.к. дальнейшая экспозиция приводит к неспецифическим дегенеративным изменениям монослоя клеток, что не позволит получить достоверные результаты при постановке реакции нейтрализации.

На специфическую активность трансовариальных иммуноглобулинов в отношении антигена вируса диареи в реакции иммунодиффузии указывало наличие специфических полос преципитации.

Специфическая активность трансовариальных иммуноглобулинов была подтверждена в реакции иммунодиффузии против антигена вируса диареи, которая проявлялась образованием специфических полос преципитации (рисунок 2) в разведениях от 1:2 до 1:16.

Заключение. На основании полученных результатов исследований можно сделать следующие выводы:

1. Оптимальное время для окончательного учета реакции нейтрализации для трансовариальных иммуноглобулинов составляет 96 часов, т.к. дальнейшая экспозиция приводит к неспецифическим дегенеративным изменениям монослоя клеток.

2. Установлена специфическая активность трансовариальных иммуноглобулинов в реакции иммунодиффузии против антигена вируса диареи, которая проявлялась образованием специфических полос преципитации в разведениях от 1:2 до 1:16.

3. Результаты проведенных исследований дают предпосылки для разработки новых ветеринарных биопрепаратов на основе трансовариальных иммуноглобулинов для перорального применения молодняку крупного рогатого скота при ассоциированных пневмоэнтеритах с учетом их этиологической структуры, которые будут являться экологически безопасными, что в значительной мере позволит повысить качество животноводческой продукции.

Литература. *1. Каплин, В. С. IgY-технологии в медицине. Желточные антитела птиц в иммунотерапии / В. С. Каплин, О. Н. Каплина // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. – 2016. – № 4. – С. 59-75. 2. Akita, E. M. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain / E. M. Akita, S. Nakai // J. Immunol. Methods. – 1993. – Vol. 160. – P. 207-214. 3. De Meulenaer, B. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: a review / B. De Meulenaer, A. Huyghebaert // Food Agricult. Immunol. – 2001. - № 13. – P. 275- 288. 4. Chicken egg yolk antibodies, production and application : IgY-Technology / R. Schade [et al.] //Springer. - 2001. 5. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine / R. Schade [et al.] // Altern. Lab Anim. – 2005. - № 33. – P. 129-154. 6. The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE / A. I. Taylor, S. M. Fabiane, B. J. Sutton, R. A. Calvert // Biochemistry. – 2009. - № 48. – P. 558–562.*