

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТРАНСОВАРИАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ И БАКТЕРИЙ – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ЭНТЕРИТОВ ТЕЛЯТ

Д. С. Борисовец, кандидат ветеринарных наук, доцент¹

Т. А. Зуйкевич, кандидат сельскохозяйственных наук¹

А. А. Згировская, кандидат биологических наук¹

П. А. Красочко, доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор²

И. В. Насонов, доктор ветеринарных наук, профессор¹

С. М. Якубовский, научный сотрудник¹

А. Е. Осипенко, младший научный сотрудник¹

¹Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского,
г. Минск, Республика Беларусь

²Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины,
г. Витебск, Республика Беларусь

Резюме. В статье представлены данные по определению специфической активности, полученные при разработке новых ветеринарных биопрепаратов, трансвариальных иммуноглобулинов в отношении вирусов и бактерий – возбудителей инфекционных энтеритов телят. В процессе исследований установлена специфическая активность трансвариальных иммуноглобулинов в реакции иммунодиффузии против антигена вируса диареи, которая проявлялась образованием специфических полос преципитации в разведениях от 1:2 до 1:16. Представлены результаты определения оптимального времени для окончательного учета реакции нейтрализации для трансвариальных иммуноглобулинов.

Ключевые слова: специфическая активность, нейтрализующая активность, штаммы вирусов и бактерий, трансвариальные иммуноглобулины, биопрепараты, животные, антитела.

Summary. The article presents data on the determination of the specific activity obtained during the development of new veterinary biological products, transovarial immunoglobulins against viruses and bacteria – the causative agents of infectious enteritis in calves. In the process of research, the specific activity of transovarial immunoglobulins in the immunodiffusion reaction against the antigen of the diarrhea virus was established, which was manifested by the formation of specific precipitation bands in dilutions from 1:2 to 1:16. The results of determining the optimal time for the final accounting of the neutralization reaction for transovarial immunoglobulins are presented.

Keywords: specific activity, neutralizing activity of strains of viruses and bacteria, transovarial immunoglobulins, biological products, animals, antibodies.

Введение. В современных условиях ведения животноводства у молодняка крупного рогатого скота в массовых масштабах проявляются желудочно-кишечные инфекции, вызванные вирусом диареи, инфекционного ринотрахеита, рота- и коронавирусами с последующим накоплением условно-патогенной микрофлоры, которые сопровождаются большими потерями в виде низкого уровня сохранности поголовья и прироста живой массы, а также значительно снижается эффективность проводимых в хозяйстве вакцинаций [1, 2].

На сегодняшний день нет универсальных средств, обладающих широким спектром противoinфекционного действия и высокой эффективностью для лечения и профилактики молодняка крупного рогатого скота при желудочно-кишечных инфекциях, вызванных вирусом диареи, инфекционного ринотрахеита, рота- и 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 [3].

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, водорастворимую фракцию желтков или очищенные IgY [4, 5, 9–11].

В практическом аспекте такие свойства IgY, как его высокая концентрация в желтке, неспособность связывать белки А и G, активировать систему комплемента и интерферировать с IgG млекопитающих, привели к разработке так называемой IgY-технологии – альтернативе традиционному методу получения поликлональных антител на животных [6–8, 12].

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 позволяют более широко применять птичьи антитела в научных исследованиях, диагностике и иммунотерапии инфекционных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных [3].

Целью данной работы является определение специфической активности, полученных при разработке новых ветеринарных биопрепаратов, трансвариальных иммуноглобулинов в отношении вирусов и бактерий – возбудителей инфекционных энтеритов телят.

Материалы и методы. Работа выполнялась на базе отдела вирусных инфекций и отдела болезней птиц и пчел РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», вивария Института.

Исследования проводились с применением трансвариальных иммуноглобулинов, выделенных ранее разработанным нами методом с использованием органических растворителей. Этот метод позволяет получить средний выход иммуноглобулинов 87,5 мг из 1 яйца, и их очистку путем осаждения ПЭГ-6000, что способствует получению средней концентрации протеинов (трансвариальных иммуноглобулинов) $18,1 \pm 0,15$ мг/мл.

Специфическая активность трансвариальных 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 ($100 \text{ ТЦД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$). В качестве тест-вируса для постановки реакции нейтрализации использовали 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.

Для постановки реакции нейтрализации проводили разведения испытуемых проб водорастворимой фазы желтка яиц и сыворотки крови кроликов с постоянной дозой вируса ($100 \text{ ТЦД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$). Для этого на стерильных планшетах готовили последовательные двукратные разведения проб от 1:2 до 1:64 на поддерживающей питательной среде в объеме $0,1 \text{ см}^3$, используя для каждого разведения по 4 лунки. Для этого во все используемые лунки планшетов разливали по $0,1 \text{ см}^3$ питательной среды. Затем в первую лунку четырех рядов вносили по $0,1 \text{ см}^3$ исследуемых проб, получая их разведение 1:2. Жидкость в первых лунках тщательно пипетировали и переносили по $0,1 \text{ см}^3$ в следующие четыре лунки. Операцию повторяли последовательно до получения разведения проб 1:64 включительно, удалив из последних четырех лунок по $0,1 \text{ см}^3$.

После этого в каждую лунку с приготовленными разведениями проб добавляли по $0,1 \text{ см}^3$ предварительно титрованного вируса диареи в дозе $100 \text{ ТЦД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$.

Смесь проб с вирусом осторожно перемешивали, планшет помещали в CO_2 -инкубатор и выдерживали при температуре плюс $(37,0 \pm 1,0) \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 1 часа.

Из культуральных планшетов с выращенным монослоем культуры клеток MDBK удаляли ростовую среду в емкость с дезраствором. Используя многоканальную пипетку, переносили в соответствующие лунки с клеточным монослоем по $0,1 \text{ см}^3$ смеси испытуемых проб в разведении 1:2 и вируса. Затем в следующие 4 лунки с культурой клеток вносили по $0,1 \text{ см}^3$ смеси испытуемых проб в разведении 1:4 и вируса, и так далее до разведения 1:64 включительно. Затем в каждую лунку с культурой клеток, испытуемыми пробами в разведениях и вирусом вносили по $0,1 \text{ см}^3$ поддерживающей среды.

В качестве контроля служили:

контроль культуры клеток (4 лунки с незараженной культурой клеток и $0,2 \text{ см}^3$ поддерживающей среды);

контроль вируса (по 4 лунки с культурой клеток, зараженных разведениями вируса от 0,1 до $100 \text{ ТЦД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$, десятикратным шагом и $0,150 \text{ см}^3$ среды);

контроль сыворотки (по 1 лунке с незараженной культурой клеток с $0,05 \text{ см}^3$ каждой из тестируемых сывороток и $0,150 \text{ см}^3$ среды).

Планшеты инкубировали в CO_2 -инкубаторе при температуре $(37,0 \pm 1,0) \text{ }^\circ\text{C}$.

Учет реакции проводили путем микроскопирования монослоя клеток через сутки после постановки реакции и далее ежедневно с целью определения цитопатических изменений в клетках. Учет реакции проводили на протяжении 7 суток инкубации.

Специфическую активность трансвариальных иммуноглобулинов определяли экспресс-методом в реакции иммунодиффузии против антигена вируса диареи. Для этого готовили 2 %-ю 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 иммуноглобулины, содержащие пробы или их разведения по 200 мкл. Пробы с антителами разводили двукратно от 1:2 до 1:32 и ставили против антигена вируса диареи ($100 \text{ ТЦД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$).

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

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

Нейтрализующая активность IgY кур-несушек в сравнении с IgG кроликов

Группа животных	Титры антител в РН, \log_2
IgY кур-несушек	$5,2 \pm 0,13^{***}$
IgG кроликов	$5,33 \pm 0,33^{***}$
Контрольная группа (куры-несушки)	0
Контрольная группа (кролики)	$1,0 \pm 0,58$

Примечание. *** – $P \leq 0,001$.

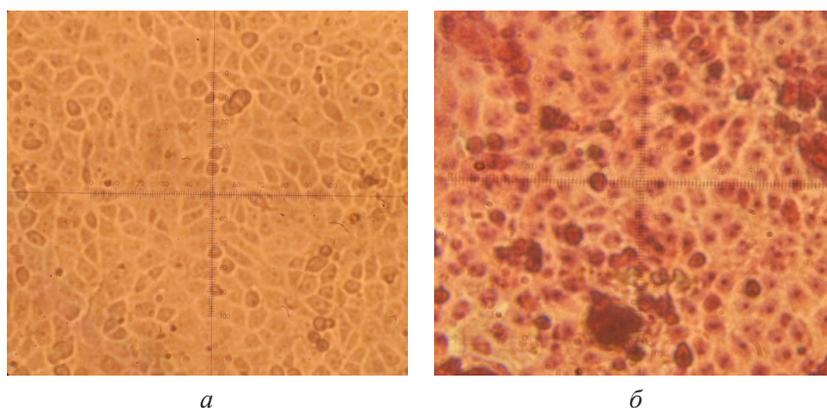


Рис. 1. Цитотоксичность IgY кур-несушек в сравнении с IgG кроликов на перевиваемой культуре клеток MDBK: *а* – состояние монослоя клеток MDBK под действием IgY кур-несушек в разведении 1:2; *б* – состояние монослоя клеток MDBK под действием IgG кроликов в разведении 1:4

Результаты исследований, представленные в табл., свидетельствуют о выраженной нейтрализующей активности IgY кур-несушек и IgG кроликов в отношении вируса диареи (штамм «КМИЭВ-V120») в дозе $100 \text{ ТЦД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$. При этом установленный уровень антител в яйце кур-несушек ($5,2 \pm 0,13 \log_2$) и крови кроликов ($5,33 \pm 0,33 \log_2$) не имел достоверных различий.

Результаты оценки цитотоксичности IgY кур-несушек в сравнении с IgG кроликов на перевиваемой культуре клеток MDBK представлены на рис. 1.

В результате проведенных исследований (см. рис. 1) 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 вызывало 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 трансвариальных иммуноглобулинов составляет 96 ч, так как дальнейшая экспозиция приводит к неспецифическим дегенеративным изменениям монослоя клеток, что не позволяет получить достоверные результаты при постановке реакции нейтрализации.

На специфическую активность трансвариальных иммуноглобулинов в отношении антигена вируса диареи в реакции иммунодиффузии указывало наличие специфических полос преципитации (рис. 2).

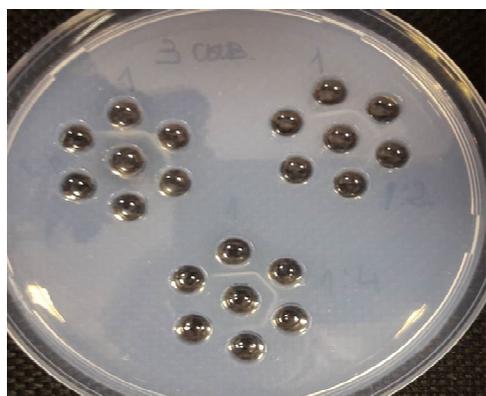


Рис. 2. Специфическая активность трансвариальных иммуноглобулинов в реакции иммунодиффузии против антигена вируса диареи

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

Заключение. Оптимальное время для окончательного учета реакции нейтрализации для трансвариальных иммуноглобулинов составляет 96 ч, так как дальнейшая экспозиция приводит к неспецифическим дегенеративным изменениям монослоя клеток.

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

Результаты проведенных исследований дают предпосылки для разработки новых ветеринарных биопрепаратов на основе трансвариальных 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.

Список использованных источников

1. Анализ заболеваемости молодняка КРС респираторными инфекциями / В. А. Мищенко [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2008. – № 6. – С. 2–4.
2. Диагностика пневмоэнтеритов молодняка крупного рогатого скота в Республике Беларусь / А. Н. При- тыченко [и др.] // Ученые записки УО ВГАВМ. – 2012. – Т. 48, № 1. – С. 54–59.
3. Каплин, В. С. Каплина О. Н. 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.
4. 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.
5. De Meulenaer, B. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: a review / B. De Meulenaer, A. Huyghebaert // Food Agricult. Immunol. – 2001. – Vol. 13. – P. 275–288.
6. Klimentzou, P. Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly, immunogenic polypeptide prothymosin alpha / P. Klimentzou [et al.] // Peptides. – 2006. – Vol. 27. – P. 183–193.
7. Pauly, D. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period / D. Pauly [et al.] // Poultry Science. – 2009. – Vol. 88. – P. 281–290.
8. Polson, A. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens / A. Polson, M. B. von Wechmar, M. H. van Regenmortel // Immunol. Commun. – 1980. – Vol. 9. – P. 475–493.
9. Schade, R. Chicken egg yolk antibodies, production and application : IgY-Technology / R. Schade, [et al.] // Springer. Berlin. – 2001.
10. Schade, R. 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. – Vol. 33. – P. 129–154.
11. Taylor, A. I. The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE / AI Taylor [et al.] // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48:5. – P. 58–62.
12. Witkowski, P. T. Gene gun-supported DNA immunisation of chicken for straightforward production of poxvirus-specific IgY antibodies / P. T. Witkowski [et al.] // Immunol. Methods. – 2009. – Vol. 341. – P. 146–153.

УДК 619.615.9-07.615.2

ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА «КОЛИСТИНЛАКТ» ПРИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГАСТРОЭНТЕРИТАХ ЖИВОТНЫХ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА КАЧЕСТВО ПРОДУКТОВ УБОЯ

М. П. Кучинский, доктор ветеринарных наук, профессор¹

Т. М. Савчук, научный сотрудник¹

Г. М. Кучинская, научный сотрудник¹

Д. М. Федотов, кандидат ветеринарных наук, доцент²

¹*Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеселского, Минск, Республика Беларусь*

²*Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины, Витебск, Республика Беларусь*

Резюме. Дана оценка безопасности и лечебной эффективности ветеринарного препарата «Колистинлакт» при бактериальных гастроэнтеритах молодняка сельскохозяйственных животных.

Ключевые слова: лечение, эффективность, препарат, колистинлакт, безвредность, качество, телята, поросята.