

## **БИОСИНТЕЗ ПРОТИВОВИРУСНЫХ АНТИТЕЛ У ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ БАКТЕРИЯМИ, ИМЕЮЩИМИ УЧАСТКИ ГЕНОМА ИНФЕКЦИОННЫХ ВИРУСОВ**

*Красочко П.А., Красочко И.А., Жих Г.И., Иванова И.П., РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелеского НАН Беларуси», г.Минск, Республика Беларусь*

Обнаружение антигенной общности или перекрестно реагирующих антигенов у микроорганизмов и тканей млекопитающих стало возможным благодаря длительному изучению строения микробов и усовершенствованию иммунологических методов антигенного анализа. В настоящее время доказано, что наличие общих антигенов различных видов микроорганизмов и тканей млекопитающих не случайный и единичный факт, а широко распространенное явление, играющее важную роль в иммунологии, инфекционной и неинфекционной патологии человека и животных.

Биологическое значение феномена общности антигенов может быть самым разнообразным. Оно в значительной степени зависит от соответствия их тем или иным субстанциям тканей млекопитающих и от толерантности к ним самого организма.

Наибольшее число работ посвящено исследованию сходных антигенов у стрептококков группы А и сердечной ткани человека и животных. Подобные антигены обнаружены в эритроцитах, почечной ткани, слизистой кишечника, носотлотке и других органах и тканях; они реагируют с кишечными, дизентерийными, паратифозными палочками, пневмококками, бактериями сибирской язвы, чумным микробом, холерным вибрионом, вирусами оспы, гриппа и другими возбудителями. Широко представлены родственные антигены и внутри разных групп микроорганизмов и вирусов, доказано сходство антигенов у микроорганизмов и опухолевых клеток.

Относительно причин появления общности антигенов у клеток микро- и макроорганизмов и их биологического значения выдвинуто ряд предположений, каждое из которых может иметь самостоятельное значение. Эти причины могут быть следующие:

- закономерностями процесса происхождения и развития живых существ;
- случайным совпадением иммунологических структур микро- и макроорганизмов в процессе их жизнедеятельности;
- воздействием мутагенных факторов, изменяющих метаболизм микробной клетки и стимулирующих синтез новых биохимических субстанций, подобных у обоих партнеров и вызывающих идентичные или сходные иммунные реакции;
- образованием гибридных микробно-животных клеток «химер» на фоне врожденных или приобретенных нарушений обмена веществ и других патологических состояний.

Целью настоящих исследований явилось выявление бактерий, имеющих общие антигены с вирусами, определять природу этого явления и изучить возможность биосинтеза противовирусных антител у животных, подвергнутых иммунизацией бактериями.

**Материалы и методы.** В работе использовано 22 штамма непатогенных спорообразующих бацилл из музеев кафедр микробиологии и вирусологии Витебской государственной академии ветеринарной медицины, Белорусского государственного университета, РИИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского НАН Беларуси».

Реакцию агглютинации (РА) ставили с моноспецифическими антисыворотками к вирусам инфекционного ринотрахеита (ИРТ) и вирусной диареи (ВД), ИФА – с коммерческими тест-системами, выявляющими антигены вирусов ИРТ и ВД.

Для подтверждения возможности биосинтеза противовирусных антител у животных, иммунизированных бактериями, содержащие общие антигенные детерминанты с вирусами нами проведены соответствующие исследования. Было взято 25 белых мышей, из которых сформировали 5 групп по 5 голов в группе. Мышам опытной групп № 1 ввели суспензию бактерий *Bacillus alvei* (КМИЭВ-11) четырехкратно в следующих дозах: первая инъекция 0,25 мл подкожно, вторая инъекция – через 7 дней в дозе 0,5 мл подкожно; третья инъекция через 7 дней - 0,75 мл подкожно; четвертая инъекция через 7 дней - 1,0 мл. Мышам опытной групп № 2 ввели суспензию бактерий *Bacillus Subtilis* ВВИ-1 четырехкратно в следующих дозах: первая инъекция 0,25 мл подкожно, вторая инъекция – через 7 дней в дозе 0,5 мл подкожно; третья инъекция через 7 дней - 0,75 мл подкожно; четвертая инъекция через 7 дней - 1,0 мл. Мышам опытной групп № 3 ввели аттенуированный культуральный вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота при инфекционном титре 7,0 lg ТЦД 50/мл (штамм КМИЭВ-6) четырехкратно в следующих дозах: первая инъекция 0,2 мл подкожно, вторая инъекция – через 7 дней в дозе 0,4 мл подкожно; третья инъекция через 7 дней - 0,6 мл подкожно; четвертая инъекция через 7 дней - 0,8 мл. Мышам опытной групп № 4 ввели аттенуированный культуральный вирус диареи крупного рогатого скота при инфекционном титре 7,5 lg ТЦД 50/мл (штамм КМИЭВ-7) четырехкратно в следующих дозах: первая инъекция 0,2 мл подкожно, вторая инъекция – через 7 дней в дозе 0,4 мл

**Таблица 1. Результаты постановки ИФА при выявление антигенов вирусов ИРТ и ВД в бактериях**

№№ г/п	Штамм	ИРТ		ВД	
		Δ E	Результат	Δ E	Результат
1	<i>Bac. Subtilis</i> БГУ 53 Б	1,15+0,1	Отрицательно	1,29+0,06	Отрицательно
2	<i>Bac. Subtilis</i> ВВИ-1	1,45+0,01	Отрицательно	2,45+0,1	Положительно
3	<i>Bac. Subtilis</i> БелНИИЭВ-2	1,25+0,06	Отрицательно	1,25+0,07	Отрицательно
4	<i>Bac. Subtilis</i> БГУ-2	1,28+0,01	Отрицательно	1,28+0,03	Отрицательно
5	<i>Bac. alvei</i> В-3	1,88+0,02	Отрицательно	1,11+0,01	Отрицательно
6	<i>Bac. alvei</i> ВВИ-1Т	2,31+0,02	Положительно	2,19+0,6	Положительно
7	<i>Bac. anthracoides</i>	1,48+0,03	Отрицательно	1,48+0,04	Отрицательно
8	<i>Bac. Subtilis</i> 945 (НИИП)	1,69+0,06	Отрицательно	1,69+0,04	Отрицательно
9	<i>Bacillus</i> 100б (НИИП)	1,26+0,01	Отрицательно	1,26+0,02	Отрицательно
10	<i>Bacillus</i> 200а (НИИП)	0,96+0,01	Отрицательно	0,96+0,01	Отрицательно
11	<i>Bac alvei</i> (КМИЭВ-11)	2,41+0,05	Положительно	1,41+0,06	Отрицательно

подкожно; третья инъекция через 7 дней - 0,6 мл подкожно; четвертая инъекция через 7 дней - 0,8 мл. Мыши пятой группы – контроль.

Через 14 дней после последнего введения вирусов и бактерий проведено тотальное обескровливание мышей и с полученными сыворотками была поставлена реакция нейтрализации. Реакцию нейтрализации ставили с использованием переливаемых культур клеток МДБК. Исследуемые сыворотки разводили в поддерживающей среде (среда Игла с двойным набором витаминов и аминокислот ДМЭМ) от 1:2 до 1:32. В каждое разведение сывороток вводили соответствующий вирус при дозе - 100 ТЦД 50/мл. После 2-х часового контакта сывороток с вирусом смесь вируса с сывороткой внесли на сформированный, отмытый от остатков ростовой среды, монослой культуры клеток. Наблюдение за монослоем культуры клеток производили на протяжении 7 суток.

**Результаты исследований.** Проведение скрининга бактерий, имеющих общие антигенные детерминанты с вирусами проведены с помощью постановки реакции агглютинации (РА). Из 22 бактерий у 11 обнаружили общие антигены с вирусами ИРТ и ВД.

При подтверждении специфичности данного явления являлась постановка иммуноферментного анализа со стандартными диагностическими наборами для выявления антигенов вирусов ИРТ и ВД в биологическом материале. Исследования проводились в условиях диагностической лаборатории Белорусского государственного ветеринарного центра.

В табл. 1 представлены результаты постановки ИФА при выявлении антигенов вирусов ИРТ и ВД в бактериях.

Таким образом, по результатам ИФА, антигены вируса ИРТ обнаружены в клеточной стенке штаммов *Bac. alvei* ВВИ-1Т и *Bac. alvei* (КМИЭВ-11), а вируса диареи – в штаммах *Bac. alvei* ВВИ-1Т и *Bac. Subtilis* ВВИ-1.

Полученные нами данные позволили предположить, что за биосинтез вирусспецифических белков в бактериях ответственны участки генома соответствующих вирусов.

Наличие генома вируса инфекционного ринотрахеита в бактериальных клетках подтверждено путем идентификации участков ДНК вируса ИРТ с ДНК-зондами, а также постановкой полимеразной цепной реакции (ПЦР).

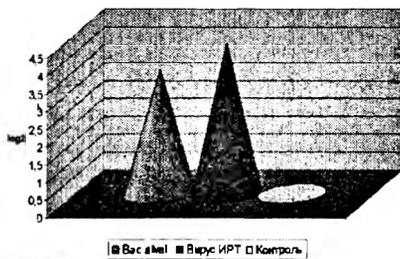
Комплементарность ДНК вируса ИРТ и участков ДНК бактерий проводили методом точечной гибридизации с радиоактивной меткой с ДНК-зондами. После исследований в 8 повторностях установлено, что в штамме *Bac. alvei* (КМИЭВ-11) имеются участки ДНК, комплементарные вирусу ИРТ.

Исследования, проведенные с использованием ПЦР показали, что в этом же штамме *Bac. alvei* (КМИЭВ-11) имеются участки ДНК, идентичные вирусу ИРТ. Для сравнения использовали ДНК, выделенную из вируса ИРТ (штамм 4016) и ДНК из *Bac. alvei* (КМИЭВ-11). Маркеры – участки ДНК – стандартные олигонуклеотидные праймеры вируса ИРТ.

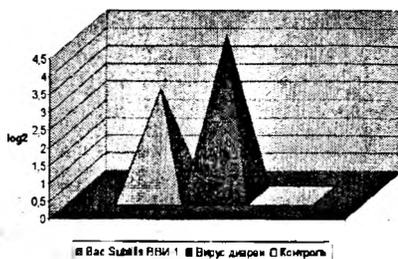
Аналогично *Bac. Subtilis* ВВИ-1 установлены участки РНК, комплементарные вирусу диареи крупного рогатого скота.

**Таблица 2. Результаты постановки реакции нейтрализации с сыворотками от иммунизированных мышей**

№.№ п/п	Группы мышей	Титр антител ( $\log_2$ )	
		ИРТ	ВД
1	Опытная группа № 1 ( <i>Vac.alvei</i> (КМИЭВ-11))	3,5±0,3	0
2	Опытная группа № 2 ( <i>Vac.Subtilis</i> ВВИ-1)	0	3,0±0,2
3	Опытная группа № 3 (Вирус ИРТ, КМИЭВ-6)	4,25±0,5	0
4	Опытная группа № 4 (Вирус диареи, КМИЭВ-7)	0	4,5±0,6
5	Контрольная группа	0	0



**Рисунок 1. Результаты выявления антител к вирусу ИРТ в сыворотках крови от иммунизированных мышей**



**Рисунок 2. Результаты выявления антител к вирусу диареи в сыворотках крови от иммунизированных мышей**

Дальнейшие исследования были направлены на изучение возможности биосинтеза вирусспецифических антител у животных, иммунизированных данными бактериями.

В табл. 2 и на рис. 1 и 2 представлены результаты постановки реакции нейтрализации с сыворотками мышей.

Представленные в таблицах и на рисунках данные свидетельствуют о том, что после иммунизации бактериями у животных вырабатываются противовирусные антитела, титр которых не ниже титра специфических антител, вырабатываемых у животных после иммунизации вирусами. Так, у животных, которых иммунизировали *Vac.alvei* (КМИЭВ-11) титр антител к вирусу ИРТ составлял  $3,5 \pm 0,3 \log_2$ , а у животных, получавших вирус ИРТ -  $4,25 \pm 0,5 \log_2$ . При иммунизации мышей *Vac.Subtilis* ВВИ-1, титр противодиарейных антител был  $3,0 \pm 0,2 \log_2$ , а вирусом диареи -  $4,5 \pm 0,6 \log_2$ .

Полученные данные свидетельствуют о выработке противовирусных вируснейтрализующих антител у животных, иммунизированных бактериями с геномом вирусов и экспрессированными вирусспецифическими белками.

Таким образом, полученные данные позволяют использовать данные бактерии для иммунизации животных и создания у них иммунитета против вирусов ИРТ и ВД.