

УДК 619:616-085.36:636.52/58:619:579.842.11
<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-26-30>

Насонов И.В., доктор ветеринарных наук, профессор
Радюш И.С., кандидат ветеринарных наук, доцент
Кныш Н.В., кандидат ветеринарных наук
Захарик Н.В., кандидат ветеринарных наук
Романовская Н.Б., ветеринарный врач

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск

ГИПЕРИММУНИЗАЦИЯ КУР ЯЙЦЕНОСНЫХ ПОРОД ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ К *ESCHERICHIA COLI* ЖЕЛТОЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Резюме

В данной статье представлены результаты исследований по подбору адъювантов и оптимальной схемы гипериммунизации кур-несушек для получения специфических к *Escherichia coli* желточных иммуноглобулинов. Установлено, что для получения специфических желточных иммуноглобулинов достаточно двух иммунизаций кур формализованным антигеном *Escherichia coli* (3×10^9 КОЕ/мл) с адъювантом Montanide ISA 70 или Montanide ISA 206. Использование адъюванта Montanide ISA 70 в соотношении по весу 70:30 с антигеном и адъюванта Montanide ISA 206 в соотношении по весу 50:50 с антигеном является равноценным.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, эшерихиоз, антиген, антитела, иммунитет, куры-несушки, адъюванты, гипериммунизация кур, желточные иммуноглобулины, конъюгаты специфических антител с антибиотиками.

Summary

This article presents the results of studies on the selection of adjuvants and the optimal scheme for hyperimmunization of *Escherichia coli* laying hens to obtain specific yolk immunoglobulins. It was found that to obtain specific yolk immunoglobulins, two immunizations of chickens with formalized *Escherichia coli* antigen (3×10^9 CFU/ml) with Montanide ISA 70 or Montanide ISA 206 adjuvant are sufficient. The use of Montanide ISA 70 in an adjuvant:antigen ratio of 70:30 by weight, respectively, and Montanide ISA 206 in an adjuvant:antigen ratio of 50:50 by weight, respectively, is equivalent.

Keywords: *Escherichia coli*, escherichiosis, antigen, antibodies, immunity, laying hens, adjuvants, hyperimmunization of chickens, yolk immunoglobulins, conjugates of specific antibodies with antibiotics.

Поступила в редакцию 02.11.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Применение антибиотиков позволило успешно бороться со многими инфекциями, поражающими птицу при промышленном ведении птицеводства. Однако сегодняшние реалии таковы, что при постоянном, а зачастую бесконтрольном применении антибиотиков мы сталкиваемся с ростом числа возбудителей болезней, которые приобрели устойчивость к антибактериальным средствам, и уже большая часть обычных антибиотиков не оказывает эффекта против внутриклеточно локализованных бактерий.

Во всем мире интерес ученых направлен на поиск новых методов борьбы с возбудителями бактериальных инфекций, позволяющих сократить использование антибиотиков. Одним из современных методов лечения и профилактики бактериальных инфекций у животных и птиц является применение специфических желточных иммуноглобулинов (IgY), полученных из яиц иммунизированных кур [2], а также применение конъюгатов специфических антител с антибиотиками.

Доклинические исследования с использованием лабораторных животных по-

казали: лечение инфекций с помощью конъюгатов антител с антибиотиками гораздо более эффективно, чем лечение одними антибиотиками [5]. Бимодальная структура конъюгированной формы антител позволяет усилить противобактериальную эффективность антител за счет сочетанного действия ключевых свойств антител и антибиотиков [6]. Структурные компоненты антител, обуславливающие их аффинные и эффекторные свойства, играют решающую роль в механизмах антибактериального действия антител [2, 3, 4].

Клинические испытания подтверждают, что желточные антитела являются безопасным эффективным средством для лечения и профилактики многих бактериальных болезней животных и птиц [5]. Применение желточных иммуноглобулинов дает толчок собственному иммунитету организма для борьбы с патогеном и стимулирует защитные функции организма.

Использование желточных антител расширяет возможности ветеринарии для использования их при пассивной иммунизации и терапии бактериальных и вирусных заболеваний, а также при создании тест-наборов для диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний.

Перспективным направлением использования желточных иммуноглобулинов в ветеринарии Республики Беларусь является профилактика и лечение эшерихиоза у птиц – распространенного заболевания, поражающего желудочно-кишечный тракт молодняка птицы в возрасте от 3 до 140 дней. Эшерихиоз птиц наносит значительный финансовый ущерб промышленному птицеводству из-за гибели эмбрионов и цыплят, снижения привесов и яйценоскости, неудовлетворительным развитием перерожденного молодняка [1].

В настоящее время при эшерихиозе птиц применяются различные методы лечения: антибиотики, пробиотики, вакцины. Тем не менее, эшерихиоз по-прежнему остается одним из заболеваний, наносящих крупный ущерб промышленному птицеводству. Причин тому множество: применение препаратов без определения чувстви-

тельности к ним микроорганизмов, отсутствие комплексного подхода к решению данной проблемы и др. [1].

Очевидно, что разработка принципиально новых препаратов для лечения эшерихиоза у птиц на основе конъюгированных с антибиотиками антиген-специфических желточных иммуноглобулинов является весьма актуальной и своевременной.

Для получения желточных иммуноглобулинов необходимо проведение гипериммунизации кур-несушек. Поэтому на данном этапе **целью нашей работы** являлся подбор адъювантов и оптимальной схемы гипериммунизации кур яйценосных пород для получения специфических к *Escherichia coli* желточных иммуноглобулинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе отдела болезней птиц, пчел и физико-химических исследований и вивария РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Для иммунизации кур-несушек инфекционным агентом нарабатывали бактериальную массу культуры *Escherichia coli* на среде МПА. Чистоту посевов определяли микроскопией мазков, окрашенных по Граму (эшерихии визуализируются как полиморфные мелкие грамтрицательные палочки с закругленными концами, не образующие спор, расположенные одиночно или попарно), и посевами на агар Эндо, МПА, МПБ, МППБ под вазелиновым маслом и среду Сабуро с последующим просмотром через 18–24 часа культивирования при температуре плюс 37 °С, а на среде Сабуро – при температуре плюс 22 °С через 6 суток.

Колонии эшерихий, выращенные на МПА в течение 20–24 часов, смывали раствором натрия хлорида массовой долей 0,9 %, центрифугировали в течение 20 минут при 3000 об/мин, надосадочную жидкость сливали, а осадок ресуспендировали в растворе натрия хлорида массовой долей 0,9 % до концентрации 3×10^9 КОЕ/мл, инактивировали формалином с содержани-

ем формальдегида не ниже 36 %, который добавляли из расчета 0,3 % к объему. Формалин разводили стерильной дистиллированной водой в соотношении 1:1 и добавляли к бактериальной культуре при постоянном перемешивании.

После добавления формалина культуру выдерживали в термостате при температуре плюс 37 °С в течение 21 суток для полной инактивации токсинов эшерихий. Содержимое флаконов ежедневно тщательно перемешивали. Полноту инактивации контролировали посевом культур во флаконы с бульоном Хоттингера из расчета 3 мл культуры на 100 мл среды. Посевы культивировали в течение суток, а затем пересеивали во флаконы с бульоном Хоттингера и чашки с агаром Эндо.

Патогенные свойства культур *Escherichia coli* изучали в опыте при внутрибрюшинном заражении трех белых мышей массой 14–16 г смывом с агаровой культуры концентрацией 1×10^9 КОЕ/мл в объеме 0,5 мл. Три белые мыши массой 14–16 г служили контролем, им внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл стерильного раствора натрия хлорида массовой долей 0,9 %. Срок наблюдения составлял 3 суток.

Для иммунизации *Escherichia coli* кур-несушек, а также для определения оптимального состава антигена (*Escherichia coli*) и адьюванта, который обеспечивает в организме птицы выработку специфических антител к возбудителю эшерихиоза, были сформированы три группы по 5 кур-несушек в возрасте 140 суток.

Антиген готовили следующим образом:

- формализованный антиген (в дозе 3×10^9 КОЕ/мл) смешивали с адьювантом Montanide ISA 70 в соотношении по весу адьювант:антиген 70:30;

- формализованный антиген (в дозе 3×10^9 КОЕ/мл) смешивали с адьювантом Montanide ISA 206 в соотношении по весу адьювант:антиген 50:50.

Кур первой группы иммунизировали четырехкратно с интервалом 10–14 суток формализованным антигеном (*Escherichia coli*) в дозе 3×10^9 КОЕ/мл с адьюван-

том Montanide ISA 70 в 4 точки внутримышечно в область грудных мышц; кур второй группы – четырехкратно с интервалом 10–14 суток формализованным антигеном (*Escherichia coli*) в дозе 3×10^9 КОЕ/мл с адьювантом Montanide ISA 206 в 3 точки в область грудных мышц; курам третьей группы (контроль) вводили раствор натрия хлорида массовой долей 0,9 % в 3 точки в область грудных мышц.

С целью получения сыворотки и проверки ее на наличие антител к *Escherichia coli* в реакции агглютинации (РА) отбирали пробы крови из подкрыльцовой вены иммунизированных кур-несушек на протяжении всего опыта, а также на 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки после последнего введения антигена с адьювантами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При посевах на МПБ, МПА и агар Эндо через 18–24 часа культивирования при температуре плюс 37 °С наблюдали рост характерных для *Escherichia coli* колоний: в МПБ – диффузный рост с образованием интенсивной равномерной мути и легко разбивающийся осадок, в отдельных пробирках отмечали появление поверхностной пленки и кольца на стенках пробирки; на МПА отмечали рост гладких, выпуклых, блестящих, с ровными краями серо-белых колоний диаметром 2–4 мм, иногда сливающихся в сплошное наложение и хорошо суспендируемых в растворе натрия хлорида с массовой долей 0,9 %; на агаре Эндо – рост розовых и бесцветных колоний с интенсивно окрашенным центром. При микроскопии мазков, окрашенных по Граму, микроорганизмы визуализировались как полиморфные мелкие грамотрицательные палочки с закругленными концами, не образующие спор, расположенные одиночно или попарно. При посеве в МППБ под вазелиновым маслом и среде Сабуро с последующим просмотром через 18–24 часа культивирования в МППБ при температуре плюс 37 °С, а на среде Сабуро – при температуре плюс 22 °С через 6 суток роста микроорганизмов не наблюдалось.

Escherichia coli была признана патогенной для белых мышей, так как 2 мыши погибли после заражения культурой *Escherichia coli* в течение 3 суток наблюдения, и из органов павших животных была выделена исходная культура.

Изготовленный для иммунизации кур-несушек антиген считали стерильным, так как рост эшерихий в течение 72 часов

во флаконах с бульоном Хоттингера и на чашках Петри с агаром Эндо отсутствовал.

При иммунизации кур-несушек первой группы на 10-е сутки после 2-й иммунизации средний титр антител в сыворотке крови в РА с аутоантигеном *Escherichia coli* составил $6,244 \pm 0,24 \log_2$, а при иммунизации кур-несушек второй группы – $6,644 \pm 1,0 \log_2$ (таблица).

Таблица. – Титр антител к *Escherichia coli* при иммунизации кур-несушек формализованным антигеном с применением различных адъювантов в виде величин, обратных разведениям

Группа	После 2-й иммунизации, сут.		После 3-й иммунизации, сут.	После 4-й иммунизации, сут.		
	10	14	7	7	14	21
	средний титр антител, \log_2					
Формализованный антиген (3×10^9 КОЕ/мл) с адъювантом Montanide ISA 70	$6,244 \pm 0,24$	$7,044 \pm 0,24$	$7,144 \pm 0,65$	$6,394 \pm 0,63$	$6,394 \pm 0,25$	$5,894 \pm 0,63$
Формализованный антиген (3×10^9 КОЕ/мл) с адъювантом Montanide ISA 206	$6,644 \pm 1,0$	$7,044 \pm 0,40$	$5,394 \pm 0,48$	$6,644 \pm 0,45$	$6,894 \pm 0,25$	$6,644 \pm 0,55$
Контроль (раствор натрия хлорида массовой долей 0,9 %)	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.

Как видно из таблицы, средний титр антител к *Escherichia coli* у птиц первой группы на 14-е сутки после 2-й иммунизации на $0,8 \log_2$ (при $p < 0,05$) выше среднего титра антител птиц данной группы, регистрировавшегося на 10-е сутки после 2-й иммунизации. У птиц второй группы средний титр антител к *Escherichia coli* на 14-е сутки после 2-й иммунизации на $0,4 \log_2$ выше среднего титра антител птиц той же группы на 10-е сутки после 2-й иммунизации, однако увеличение среднего титра не является достоверным.

Средний титр антител к *Escherichia coli* у птиц первой группы на 7-е сутки после 3-й иммунизации на $0,1 \log_2$ выше такового у птиц данной группы на 14-е сутки после 2-й иммунизации. У птиц второй группы средний титр антител к *Escherichia*

coli на 7-е сутки после 3-й иммунизации на $1,65 \log_2$ достоверно (при $p < 0,05$) ниже среднего титра антител птиц той же группы на 14-е сутки после 2-й иммунизации.

На 7-е и 14-е сутки после 4-й иммунизации наблюдалась тенденция к снижению среднего титра антител к *Escherichia coli* у птиц первой группы на $0,75 \log_2$ по сравнению со значениями среднего титра антител у птиц данной группы на 7-е сутки после 3-й иммунизации.

У птиц второй группы, напротив, наблюдалась тенденция к увеличению среднего титра антител к *Escherichia coli*. Так, на 7-е сутки после 4-й иммунизации титр антител на $1,25 \log_2$ выше среднего титра антител птиц той же группы на 7-е сутки после 3-й иммунизации. На 14-е сутки после 4-й иммунизации средний титр

антител к *Escherichia coli* у данной группы составил $6,894 \pm 0,25$, что на $0,25 \log_2$ выше среднего титра антител птиц той же группы на 7-е сутки после 4-й иммунизации и на $1,5 \log_2$ достоверно (при $p < 0,05$) выше среднего титра антител на 7-е сутки после 3-й иммунизации. У птиц первой группы на 21-е сутки после 4-й иммунизации титр специфических антител к *Escherichia coli* продолжал снижаться и составил $5,894 \pm 0,63 \log_2$. У птиц второй группы также наблюдалась тенденция к снижению среднего титра антител к *Escherichia coli*. Так, на 21-е сутки после 4-й иммунизации титр антител составил $6,644 \pm 0,71 \log_2$, что на $0,25 \log_2$ ниже среднего титра антител птиц той же группы на 14-е сутки после 4-й иммунизации. Однако снижение титра специфических антител в данной группе происходило более плавно, чем в первой.

В дальнейшем наблюдалось более быстрое снижение титра антител. Так, на 28-е сутки после 4-й иммунизации средний титр антител составил для первой группы $5,233 \pm 1,85$ (на $0,66 \log_2$ ниже среднего титра антител птиц той же группы на 21-е сутки после 4-й иммунизации), для второй группы – $4,096 \pm 2,07$ (на $2,548 \log_2$ ниже среднего титра антител птиц той же группы, чем на 21-е сутки после 4-й иммунизации).

У птиц контрольной группы на протяжении всего опыта антитела к *Escherichia coli* отсутствовали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для иммунизации кур-несушек достаточно двух введений формализованного антигена *Escherichia coli* (в дозе 3×10^9 КОЕ/мл) с адъювантом Montanide ISA 70 в соотношении по весу адъювант:антиген 70:30 или того же антигена с адъювантом Montanide ISA 206 в соотношении по весу адъювант:антиген 50:50.

При иммунизации кур *Escherichia coli* в качестве адъюванта можно использовать как Montanide ISA 70, так и Montanide ISA 206, поскольку достоверных отличий среднего титра антител у птиц между опытными группами не выявлено.

Для получения желточных иммуноглобулинов мы будем использовать яйцо от иммунизированных кур несушек, полученное на 10–21-е сутки после 2-й иммунизации, так как в этот период в сыворотках крови кур регистрировались наиболее высокие значения титра антител.

Наши дальнейшие исследования будут направлены на разработку способов физико-химической модификации выделенных желточных иммуноглобулинов из яйца иммунизированных *Escherichia coli* кур-несушек для последующей конъюгации с антибиотиками и испытание антибактериальной эффективности конъюгированных антител с антибиотиками на экспериментальных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Винокуров, В. Ю. Колибактериоз (эшерихиоз) кур: эпизоотология, диагностика, профилактика и меры борьбы : дис. ... канд. ветеринар. наук : 06.02.02 / В. Ю. Винокуров. – Персиановский, 2010. – 120 л.
2. Каплин, В. С. Использование желточных антител птиц (IgY) для пассивной иммунизации сельскохозяйственных и домашних животных / В. С. Каплин, О. Н. Каплина // Ветеринария Кубани. – 2018. – № 4. – С. 19–24.
3. Каплин, В. С. IgY-технологии. Желточные антитела птиц / В. С. Каплин, О. Н. Каплина // Биотехнология. – 2017. – Т. 33, № 2. – С. 29–40.
4. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: a review / E.P.V. Pereira [et al.] // Int. Immunopharmacol. – 2019. – № 73. – P. 293–303.
5. Egg yolk IgY antibodies : a therapeutic intervention against group A rotavirus in calves / C. Vega [et al.] // Res. Vet. Sci. – 2015. – № 103. – P. 1–10.
6. Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion / P. B. Conlon [et al.] // Nature Microbiology. – 2016. – P. 1–7.
7. Production of Egg yolk immunoglobulin against *Escherichia coli* from White Leghorn and Lohmann chickens / J. F. Liou [et al.] // Journal of Animal and Veterinary Advances. – 2011. – Vol. 10, № 18. – P. 2349–2356.