

УДК 619:616-085.37:636. 52/.58

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Насонов И.В., доктор ветеринарных наук, доцент¹
Зуйкевич Т.А., кандидат сельскохозяйственных наук¹
Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор²
Журавлева Е.С., кандидат ветеринарных наук¹
Кныш Н.В., кандидат ветеринарных наук¹
Зинина Н.В., кандидат биологических наук¹
Згировская А.А., кандидат биологических наук¹
Яромчик Я.П., кандидат ветеринарных наук, доцент²
Бучукури Д.В., кандидат ветеринарных наук¹
Якубовский С.М., научный сотрудник¹
Осипенко А.Е., младший научный сотрудник¹

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ АДЬЮВАНТОВ И ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ ДЛЯ ГИПЕРИММУНИЗАЦИИ КУР-НЕСУШЕК

Резюме

В статье представлены данные по подбору адъювантов и иммуностимуляторов для повышения выработки трансовариальных иммуноглобулинов, отработана оптимальная схема гипериммунизации кур-несушек. Установлено, что наиболее оптимальным адъювантом для гипериммунизации кур-несушек является Montanide IMS 1313 VG, использование которого приводит к выработке специфических антител в титре $5,67 \log_2$. Применение липополисахарида *Bacillus subtilis* в качестве иммуностимулятора приводит к повышению титра противовирусных антител на $0,17-0,83 \log_2$. Оптимальной схемой гипериммунизации кур-несушек является введение антигенов в виде монокомпонентов в дозе $0,5 \text{ см}^3$ внутримышечно в область грудных мышц четырехкратно с интервалом 14 суток, что способствует повышению уровня специфических антител на $1,0-1,67 \log_2$.

Summary

The article presents data on the selection of adjuvants and immunostimulants was carried out to increase the production of transovarian immunoglobulins, the optimal scheme of hyperimmunization of laying hens was worked out. It was found that the most optimal adjuvant for hyperimmunization of laying hens is Montanide IMS 1313 VG, the use of which leads to the development of specific antibodies in titer of $5,67 \log_2$. The use of *Bacillus subtilis* lipopolysaccharide as an immunostimulant leads to an increase in antiviral antibody titer at $0,17-0,83 \log_2$. The optimal scheme for hyperimmunization of laying hens is use of antigens in the form of monocomponents at a dose of $0,5 \text{ cm}^3$ intramuscularly into the pectoral muscle region four times with an interval of 10–14 days, which increases the level of specific antibodies at $1,0-1,67 \log_2$.

Поступила в редакцию 27.10.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

При современном выполнении мер профилактики ветеринарные врачи сельскохозяйственных организаций сталкиваются со случаями низкой эффективности проводимых ветеринарно-санитарных мероприятий. Использование антибиотиков, сульфаниламидов и других противомик-

робных средств не всегда дает положительный эффект лечения и профилактики, так как отчетливо наблюдается тенденция выраженной лекарственной устойчивости полевых штаммов бактерий. При этом, несмотря на выполняемые меры по срокам ожидания после применения химиотерапевтических препаратов, проблема нали-

чия остаточных количеств антимикробных средств в получаемой животноводческой продукции остается весьма актуальной.

На этом фоне у животных, особенно у молодняка, в массовых масштабах проявляются вирусные пневмоэнтериты, вызванные вирусами диареи, инфекционного ринотрахеита, рота-, коронавирусами с последующим наслоением условно-патогенной микрофлоры, что приводит к снижению сохранности поголовья, прироста живой массы и эффективности проводимых в хозяйстве ветеринарных мероприятий.

На сегодняшний день нет универсальных средств, обладающих широким спектром противoinфекционного действия и высокой эффективностью для лечения молодняка крупного рогатого скота и профилактики у них желудочно-кишечных инфекций, вызванных вирусами диареи, инфекционного ринотрахеита, рота- и коронавирусами.

Перспективной 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, водорастворимую фракцию желтков или очищенные IgY [2, 3, 7, 8, 9].

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 [4, 5, 6, 10].

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 птицы 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 работы является подбор эффективных адъювантов и иммуностимуляторов для получения трансвариальных иммуноглобулинов при гипериммунизации кур-несушек.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

Для проведения исследований выполнен подбор адъювантов нового поколения Montanide ISA 61 VG, Montanide IMS 1313 VG, Montanide GEL 01, которые способствуют формированию длительного иммунитета.

Кроме адъювантов, оценивали влияние иммуностимулятора (липополисахарид *Bacillus subtilis*) в концентрации 30 мкг/кг веса на выработку специфических противовирусных антител.

В качестве антигенной части для смешивания с адъювантами и иммуностимулятором использовали антигены вируса диареи (ВД), инфекционного ринотрахеита (ИРТ), рота- (РВ) и коронавируса (КВ) крупного рогатого скота, инактивированные теотропином в 0,2%-ной концентрации в течение 48 ч. Антигены вводили курам-несушкам в дозе 0,5 см³ внутримышечно в область грудных мышц четырехкратно с интервалом 14 суток. Смешивание антигенов с адъювантом Montanide ISA 61 VG проводилось соответственно в соотношении по массе 50:50, с Montanide GEL 01 – в соотношении 80:20, с Montanide IMS 1313 VG – в соотношении 50:50.

Для проведения экспериментов было сформировано 9 групп кур-несушек (8 опытных и одна контрольная) по 3 головы в каждой, которых иммунизировали по следующей схеме: 1-я группа – антиген ВД с Montanide ISA 61 VG; 2-я группа – антиген ВД с Montanide ISA 61 VG и липополисахаридом (ЛПС); 3-я – антиген ВД с Montanide GEL 01; 4-я – антиген ВД с Montanide GEL 01 и ЛПС; 5-я – антиген ВД с Montanide IMS 1313 VG; 6-я – антиген ВД с Montanide IMS 1313 VG и ЛПС; 7-я – антиген ВД+ИРТ+КВ+РВ с Montanide ISA 61 VG; 8-я – антиген ВД+ИРТ+КВ+РВ с Montanide ISA 61 VG и ЛПС; контрольная группа получала физиологический раствор

в дозе 0,5 см³ внутримышечно в область грудных мышц четырехкратно с интервалом 14 суток.

Через 14 суток после последнего введения у кур были отобраны пробы крови из подкрыльцовой вены и снесенные яйца с целью определения наличия антител к применяемым вирусным антигенам в реакции нейтрализации.

Отработан способ получения желточных иммуноглобулинов из яиц. Для этой цели куриные яйца промывали водой и обрабатывали изопропиловым спиртом. Яичную скорлупу осторожно, не повреждая желточный мешок, вскрывали, желток отделяли от белка и помещали на фильтровальную бумагу. Перекачивая желток на бумаге, насколько возможно, удаляли остаток белка. Затем оболочку желтка прокалывали ланцетом или кончиком пипетки и желток помещали в пробирки на 50 см³. К желтку добавляли органическую смесь, состоящую из хлороформа, этанола, 2-пропанола, ФСБ и этилацетата (в % (v/v) соотношении 21,6:6,5:36:18:18 соответственно) в количестве, равном 2 объемам желтка. Содержимое пробирки интенсивно перемешивали и пробирки в горизонтальном положении помещали на качалку при комнатной температуре на 20 мин. Затем пробирки центрифугировали при 2500 об/мин в течение 20 мин. После центрифугирования содержимое пробирки разделялось на 3 фазы. Нижняя фаза представляет собой белый хлопьевидный осадок альбуминов и липопротеинов. Средняя фаза желтого цвета содержит липиды и фосфолипиды. Верхняя прозрачная фаза представляет фракцию искомым иммуноглобулинов. Верхнюю фазу отбирали шприцем, переносили в чистые пробирки на 50 см³, объем регистрировали и добавляли 2 объема ФСБ. Далее в пробирки вносили 12 % (w/v) сухого измельченного ПЭГ-6000 и интенсивно перемешивали до полного растворения ПЭГ. Через 20 мин преципитирующие иммуноглобулины осаждали центрифугированием при 2500 об/мин в течение 20 мин. Супернатант декантировали. Осадок рас-

творяли в ФСБ в объеме, равном первоначальному объему желтка.

Концентрацию белка во фракции иммуноглобулинов определяли путем измерения оптической плотности растворов при 280 нм, используя 1%-ный раствор БСА в качестве стандарта.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При проведении исследований по подбору адъювантов и иммуностимуляторов для гипериммунизации кур-несушек были получены результаты, представленные в таблице.

Таблица. – Определение оптимальных адъювантов и иммуностимуляторов для гипериммунизации кур-несушек

Группа кур-несушек	Антиген	Титр антител в РН, log ₂
Опытная группа № 1	ВД + ISA 61 VG	4,33±0,33
Опытная группа № 2	ВД + ISA 61 VG + ЛПС	5,0±0
Опытная группа № 3	ВД + IMS 1313 VG	5,67±0,33
Опытная группа № 4	ВД + IMS 1313 VG + ЛПС	6,0±0
Опытная группа № 5	ВД + GEL 01	4,67±0,33
Опытная группа № 6	ВД + GEL 01 + ЛПС	5,5±0,5
Опытная группа № 7	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG (антитела к ИРТ)	4,33±0,33
	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG (антитела к ВД)	4,0±0
	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG (антитела к РВ)	4,0±0,58
	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG (антитела к КВ)	4,67±0,33
Опытная группа № 8	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG + ЛПС (антитела к ИРТ)	4,5±0,5
	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG + ЛПС (антитела к ВД)	4,0±0
	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG + ЛПС (антитела к РВ)	4,0±0
	ИРТ+ВД+РВ+КВ + ISA 61 VG + ЛПС (антитела к КВ)	4,5±0,5
Контрольная группа	-	0

В результате проведенных исследований по подбору адъювантов и иммуностимуляторов для гипериммунизации кур-несушек установлено, что наиболее оптимальным адъювантом является Montanide IMS 1313 VG (опытная группа № 2), применение которого приводило к выработке специфических антител в организме птицы в титре 5,67 log₂, что на 1,0–1,67 log₂ выше в сравнении с адъювантами Montanide GEL 01 и Montanide ISA 61 VG.

Применение в качестве иммуностимулятора бактериального липополисахарида, выделенного из *Bacillus subtilis*, приво-

дило к повышению титра противовирусных антител на 0,17–0,83 log₂.

Разработан и применен простой и высокопроизводительный метод выделения желточных иммуноглобулинов, не требующий дорогостоящего оборудования. В основу разработанного метода положен принцип жидко-жидкостного фазного разделения липидной и белковой фракций яичных желтков с использованием смеси органических растворителей.

Выход иммуноглобулинов составил 80–100 мг с одного яйца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Наиболее оптимальным адъювантом для гипериммунизации кур-несушек является Montanide IMS 1313 VG, применение которого приводило к выработке специфических антител в организме птицы в титре $5,67 \log_2$.

2. Применение в качестве иммуностимулятора бактериального липополисахарида, выделенного из *Bacillus subtilis*, приводило к повышению титра противовирусных антител на $0,17-0,83 \log_2$.

3. Оптимальной схемой гиперимму-

низации кур-несушек является схема, включающая введение антигенов вирусов в виде монокомпонентов в дозе $0,5 \text{ см}^3$ внутримышечно в область грудных мышц четырехкратно с интервалом 14 суток, что способствует повышению уровня специфических антител на $1,0-1,67 \log_2$.

4. Отработанный метод выделения трансвариальных иммуноглобулинов из яйца кур-несушек способствует получению очищенной иммуноглобулиновой фракции в количестве 80–100 мг иммуноглобулинов с одного яйца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каплин, В. С. *IgY-технологии в медицине. Желточные антитела птиц в иммуноterapiи* / 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 // *Journal of immunological methods*. – 1993. – Vol. 160. – № 2. – P. 207–214.
3. De Meulenaer, B. *Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: a review* / B. De Meulenaer, A. Huyghebaert // *Food and Agricultural Immunology*. – 2001. – Vol. 13. – № 4. – P. 275–288.
4. *Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha* / P. Klimentzou [et al.] // *Peptides*. – 2006. – Vol. 27. – № 1. – P. 183–193.
5. *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. – № 2. – P. 281–290.
6. Polson, A. *Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens* / A. Polson, M. B. von Wechmar, M. H. V. Van Regenmortel // *Immunological communications*. – 1980. – Vol. 9. – № 5. – P. 475–493.
7. *Chicken egg yolk antibodies, production and application: IgY-Technology* / R. Schade [et al.] (ed.). – Springer Science & Business Media, 2000.
8. *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.] // *Alternatives to laboratory animals*. – 2005. – Vol. 33. – № 2. – P. 129–154.
9. *The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE* / A. I. Taylor [et al.] // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48. – № 3. – P. 558–562.
10. *Gene gun-supported DNA immunisation of chicken for straightforward production of poxvirus-specific IgY antibodies* / P. T. Witkowski [et al.] // *Journal of immunological methods*. – 2009. – Vol. 341. – № 1–2. – P. 146–153.