

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
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 ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА АНТИГЕНОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЖЕЛТОЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ ГИПЕРИММУНИЗАЦИИ КУР-НЕСУШЕК

Резюме

В статье приведены данные по разработке метода получения трансовариальных иммуноглобулинов, одним из этапов которой являлось определение оптимального состава и соотношения антигенов вирусов и бактерий для гипериммунизации кур-несушек. В результате проведенных исследований установлено, что в современных условиях ведения животноводства при инфекционных энтеритах телят наиболее распространенными возбудителями являются вирусы диареи, инфекционного ринотрахеита, рота- и коронавируса, а также бактерии *Escherichia coli*, производственные штаммы которых были использованы для иммунизации кур-несушек в виде монокомпонентов. Гипериммунизация птицы по разработанной схеме приводила к выработке специфических антител в титрах 5,0–8,0 log₂, что на 2,0–5,0 log₂ выше в сравнении с сочетанным введением антигенов.

Summary

The article provides data on the development of a method for obtaining transovarian immunoglobulins, one of the stages of which was to determine the optimal composition and ratio of antigens of viruses and bacteria for hyperimmunization of laying hens. As a result of the studies, it was found that in modern conditions of livestock farming with, the most common pathogens of infectious enteritis of calves are bovine viral diarrhea virus, bovine herpesvirus-1, rotavirus and coronavirus, as well as *Escherichia coli* bacteria, the production strains of which were used to immunize laying hens in the form of monocomponents. Hyperimmunization of poultry according to the developed scheme leads to the development of specific antibodies in titers – 5,0–8,0 log₂, which is 2,0–5,0 log₂ higher in comparison with the combined administration of antigens.

Поступила в редакцию 27.10.2020 г.

ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях ведения животноводства у молодняка крупного рогатого скота в массовых масштабах проявляются желудочно-кишечные инфекции, вызванные вирусами диареи, инфекционного ринотрахеита, рота- и коронавирусами с последующим наслоением условно-

патогенной микрофлоры, которые сопровождаются большими потерями в виде низкого уровня сохранности поголовья и прироста живой массы, а также значительного снижения эффективности проводимых в хозяйстве вакцинаций [1, 2].

В связи с этим сегодня, когда устойчивость микроорганизмов к антибио-

тикам постоянно повышается, всё большее значение приобретает пассивная иммунизация, особенно при лечении и профилактике кишечных заболеваний, и этому направлению дает новый импульс возможность получения большого количества дешевых куриных антител [3, 6].

Наиболее изученным классом иммуноглобулинов у млекопитающих является иммуноглобулин класса G (IgG). Его молекулярная структура и функции хорошо изучены. В середине XX века птичьи иммуноглобулины также обозначались как IgG, но в настоящее время известно, что они отличаются от IgG млекопитающих по структуре и функциям. Поэтому было принято решение называть их IgY (от слова «yolk» – желток). Сывороточные иммуноглобулины птиц полностью идентичны желточным. Концентрация IgY в желтке сравнима с концентрацией IgY в сыворотке и составляет 6–13 мг/мл. Большое количество IgY, которое можно получить неинвазивным способом, делает кур идеальным поставщиком специфических антител. Из-за значительной филогенетической дистанции, отделяющей птиц от млекопитающих, иммунологические свойства IgY сильно отличаются от IgG. Так, IgY не взаимодействуют с компонентами комплемента млекопитающих, ревматоидным фактором и Fc-рецепторами млекопитающих, следовательно, IgY-антитела не взаимодействуют с эффекторами иммунной системы млекопитающих и не вызывают системных осложнений при лечении [3].

Благодаря высокой иммунореактивности птиц по отношению к чужеродным белкам инфекционного происхождения (бактериальным, вирусным, паразитарным), а также к растительным токсинам и искусственным, генно-инженерным антигенам аффинность IgY-антитела выше аффинности антител млекопитающих [8].

Кроме того, расходы на содержание птицы значительно ниже, чем на содержание крупных млекопитающих, часто используемых для пассивной иммунизации [4, 5].

Несистемное (местное) введение ан-

тител, специфичных для возбудителей, является привлекательным подходом для установления защитного иммунитета, особенно в отношении желудочно-кишечного тракта. Яйца являются нормальным компонентом питания, нет практически никакого риска от перорального применения IgY [7].

Использование IgY для пассивной иммунизации в кишечнике может быть определяющим фактором профилактики некоторых кишечных заболеваний, вызванных *Salmonella*, *E. coli* или ротавирусами. Эти антитела обеспечивают почти мгновенную защиту после перорального приема, тогда как активная иммунизация или вакцинация полагается на иммунную систему хозяина, чтобы генерировать иммунный ответ, который, как правило, развивается через несколько дней или недель. Пероральное введение IgY-антител предотвращает антимикробный зонтик, подавляя пролиферацию патогенов и предотвращая повреждение слизистой оболочки, при этом птичьи иммуноглобулины не являются источником воспалительных реакций в желудочно-кишечном тракте [3]. Агглютинирующие или токсиннейтрализующие эффекты IgY делают микроорганизмы неспособными к колонизации поверхности слизистой оболочки или выполнению токсигенных либо других функций, необходимых для проявления их вирулентности [6].

Исходя из вышесказанного, целью данной работы являлось определение оптимального состава антигенов вирусов и бактерий для получения желточных 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», вивария института.

С целью определения этиологической роли возбудителей желудочно-кишечных инфекций у новорожденных телят в животноводческих хозяйствах республи-

ки, неблагополучных по вирусно-бактериальным пневмоэнтеритам, произведен отбор проб патологического материала (фекалии больных телят, содержимое кишечника, клетки эпителия слизистой оболочки тонкого отдела кишечника от павших или вынужденно убитых телят), а также пробы крови больных и переболевших телят, пробы крови и молозива коров-матерей для выявления противовирусных антител.

В работе использованы общепринятые бактериологические методы исследований для определения микрофлоры желудочно-кишечного тракта у телят с клинической картиной заболевания. С этой целью отбор патологического материала проводили от телят, не подвергавшихся антибиотикотерапии.

Патологический материал предварительно измельчали, растирая его в ступке со стерильным кварцевым песком, эмульгировали в изотоническом растворе натрия хлорида или бульоне, освобождали от крупной взвеси центрифугированием и пропускали через фильтры.

В дальнейшем полученный материал высевали на обычные и специальные плотные и жидкие питательные среды: мясопептонный агар и бульон, среду Китта-Тароцци, среды Эндо, Плоскирева, Левина, висмут-сульфитный агар, глюкозо-кровяной агар, мясо-пептонный агар с 8–10 % поваренной соли, МПБ с 1 % глюкозы и 10 % сыворотки крови лошади. Идентификацию выделенных культур проводили на основании морфологических, культуральных, биохимических и серологических свойств.

Этот же материал проверяли в полимеразной цепной реакции (ПЦР) на наличие антигенов вирусов инфекционного ринотрахеита (ИРТ), вирусной диареи (ВД), рота-, коронавируса, парагриппа-3 (ПГ-3) согласно наставлению по применению тест-систем.

Из проб крови телят готовили сыворотки стандартным методом: собранную кровь термостатировали в течение 1 ч при 37 °С. Пипеткой Пастера отделяли сгусток

от стенок пробирки с тем, чтобы облегчить его последующую ретракцию, пробирки с кровью выдерживали в холодильнике при плюс 4 °С в течение 10 ч, после чего форменные элементы крови осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 20 мин.

В сыворотках крови определяли титры антител к ИРТ, ПГ-3, рота- и коронавирусам, ВД в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с использованием эритроцитарных диагностикумов.

Определение оптимального состава антигенов вирусов и бактерий для гипериммунизации кур-несушек проведено на основании исследований по установлению этиологической структуры вирусов и бактерий-возбудителей инфекционных энтеритов молодняка крупного рогатого скота.

Исходя из полученных данных, для гипериммунизации кур-несушек были отобраны следующие штаммы, депонированные в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»:

- штамм ВД крупного рогатого скота «КМИЭВ-V120» – РНК-содержащий, представлен однокитевой РНК. Использован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром 6,5 lg ТЦД₅₀/мл. Вирус поддерживали в серийных пассажах и титровали на перевиваемой культуре клеток почки эмбриона крупного рогатого скота MDBK;

- штамм коронавируса крупного рогатого скота «КМИЭВ-V122» – РНК-содержащий, содержит положительно заряженную, одноцепочечную, несегментированную полиаденилированную РНК. Использован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром 5,25 lg ТЦД₅₀/мл. Вирус поддерживали в серийных пассажах и титровали на культуре клеток MDBK;

- штамм вируса ИРТ крупного рогатого скота «КМИЭВ-V123» – ДНК-геномный, содержит непрерывную линейную двуспиральную ДНК. Использован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром 6,75 lg ТЦД₅₀/мл. Вирус поддер-

живали в серийных пассажах и титровали на культуре клеток MDBK;

- штамм ротавируса крупного рогатого скота «КМИЭВ-V116» – РНК-содержащий, диаметр вириона 70–75 нм, нуклеиновая кислота представлена 11 сегментами двунитевой РНК. Использован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром $7,0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$. Вирус поддерживали в серийных пассажах и титровали на культуре клеток СПЭВ;

- штаммы бактерий *Escherichia coli* с адгезивными антигенами K88 (F4), K99 (F5), A20 (F17). Концентрация бактериаль-

ных клеток – $500 \text{ млн}/\text{см}^3$. Среда культивирования – бульон Хоттингера.

Для определения оптимального соотношения антигенов вирусов и бактерий при гипериммунизации птицы подобраны группы по 3 головы кур-несушек в возрасте 147 суток.

Кур иммунизировали внутримышечно в большую грудную мышцу вирусосодержащим материалом и бактериальной суспензией четырехкратно с интервалом 14 суток согласно схеме, представленной в таблице 1.

Таблица 1. – Схема гипериммунизации кур-несушек для определения оптимального соотношения антигенов вирусов и бактерий

Группа животных	Антигены	Доза на одно введение, см ³
Опытная группа № 1	ИРТ	0,5
Опытная группа № 2	ВД	0,5
Опытная группа № 3	ротавирус	0,5
Опытная группа № 4	коронавирус	0,5
Опытная группа № 5	<i>E. coli</i>	0,5
Опытная группа № 6	ИРТ+ВД	1,0
Опытная группа № 7	ИРТ+ВД+рота	1,5
Опытная группа № 8	ИРТ+ВД+рота+корона	2,0
Опытная группа № 9	ИРТ+ВД+рота+корона+ <i>E. coli</i>	2,5
Контрольная группа	физ. раствор	0,5

Через 14 суток после последней иммунизации отбирали пробы крови из подкрыльцовой вены иммунизированных кур-несушек с целью получения сыворотки и проверки ее на наличие антител к вирусам в РНГА и бактериям в реакции агглютинации (РА).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Нами было обследовано 12 животноводческих хозяйств, в которых реги-

стрировались инфекционные пневмоэнтериты. Проведены серологические исследования 110 проб биологического материала (сывороток крови) от переболевших пневмоэнтеритами телят 1–3-месячного возраста на наличие антител к вирусам ПГ-3, ИРТ, ВД, рота- и коронавирусам в РНГА (таблица 2). Положительными в РНГА считали пробы с титром не менее $4,0 \log_2$.

Таблица 2. – Распространение вирусов-возбудителей инфекционных пневмоэнтеритов молодняка крупного рогатого скота

Возбудитель	Исследовано проб	Положительно реагировало	%
ПГ-3	110	56	50,9
ИРТ	110	69	62,7
ВД	110	87	79,1
Ротавирус	110	75	68,2
Коронавирус	110	63	57,3

Как показывают данные таблицы 2, отмечается широкая циркуляция вирусозбудителей пневмоэнтеритов среди молодняка крупного рогатого скота в хозяйствах республики независимо от клинического состояния животных. Уровень антителоносительства к вышеуказанным вирусам у телят 1–3-месячного возраста колеблется в диапазоне значений от 50,9 до 79,1 %. Средний титр специфических антител составлял при этом 4,85 log₂.

Для установления этиологической структуры бактерий-возбудителей инфекционных энтеритов молодняка крупного рогатого скота отобрано 100 проб патматериала от павших и вынужденно убитых по причине вирусно-бактериальных энтеритов телят, из которых выделено 85 культур микроорганизмов.

В результате проведенных исследований при патологии желудочно-кишечно-

го тракта телят из патматериала выделены следующие бактерии: *Escherichia coli* (48,8 %), *Proteus mirabilis* (18,4 %), *Klebsiella pneumoniae* (15,2 %), *Salmonella spp.* (9,9 %), *Pseudomonas aeruginosa* (2,3 %), *Citrobacter freundii* (2,1 %), *Enterobacter aerogenes* (2,1 %) и др. Выделенные изоляты *E. coli*, *Pr. mirabilis*, и *Kl. pneumoniae* были патогенными для белых мышей.

На основании результатов исследований установлено, что в этиологической структуре желудочно-кишечных болезней телят основное место занимают вирусы ИРТ, ВД, рота- и коронавирусы, бактерии *E. coli*, клебсиеллы, протей и др.

Результаты опытов по определению оптимального соотношения антигенов вирусов и бактерий для гипериммунизации кур-несушек представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Определение оптимального соотношения антигенов вирусов и бактерий для гипериммунизации кур-несушек

Группа животных	Антиген	Титры антител в РНГА и РА, log ₂
Опытная группа № 1	ИРТ	5,0
Опытная группа № 2	ВД	5,0
Опытная группа № 3	ротавирус	6,0
Опытная группа № 4	коронавирус	5,0
Опытная группа № 5	<i>E. coli</i>	8,0
Опытная группа № 6	ИРТ	4,0
	ВД	5,0
Опытная группа № 7	ИРТ	4,0
	ВД	5,0
	ротавирус	4,0
Опытная группа № 8	ИРТ	4,0
	ВД	4,0
	ротавирус	5,0
	коронавирус	3,0
Опытная группа № 9	ИРТ	4,0
	ВД	3,0
	ротавирус	4,0
	коронавирус	3,0
	<i>E. coli</i>	5,0
Контрольная группа	ИРТ	0
	ВД	0
	ротавирус	0
	коронавирус	0
	<i>E. coli</i>	2,0

В результате проведенных исследований установлено, что оптимальной является схема иммунизации кур-несушек с использованием монокомпонентов вирусов и бактерий, применение которой приводило к выработке специфических антител в организме птицы в титрах 5,0–8,0 log₂, что на 2,0–5,0 log₂ выше в сравнении с сочетанным введением антигенов.

Такие результаты обусловлены тем, что многокомпонентные смеси, по-видимому, оказывают чрезмерную иммунологическую нагрузку на организм птицы, что приводит к снижению уровня гуморального ответа на каждый антиген в отдельности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В современных условиях ведения животноводства по данным серологических исследований степень распространения вирусов-возбудителей инфекционных пневмоэнтеритов молодняка крупного рогатого скота составляет: ПГ-3 – 50,9 %, ИРТ – 62,7 %, ВД – 79,1 %, ротавируса – 68,2 %, коронавируса – 57,3 %. Средний

титр специфических антител при этом – 4,85 log₂.

В процессе проведения бактериологических исследований патматериала при патологии желудочно-кишечного тракта выделены *Escherichia coli* (48,8 %), *Proteus mirabilis* (18,4 %), *Klebsiella pneumoniae* (15,2 %), *Salmonella spp.* (9,9 %), *Pseudomonas aeruginosa* (2,3 %), *Citrobacter freundii* (2,1 %), *Enterobacter aerogenes* (2,1 %) и др.

2. Оптимальной является иммунизация кур-несушек с использованием монокомпонентов вирусов (ИРТ, ВД, рота- и коронавируса) и бактерий (*E. coli*), которая приводит к выработке специфических антител в организме птицы в титрах 5,0–8,0 log₂, что на 2,0–5,0 log₂ выше в сравнении с сочетанным введением антигенов. Применение монокомпонентов вирусов и бактерий для гипериммунизации кур позволит в дальнейшем конструировать препараты на основе трансвариальных иммуноглобулинов к вирусам и бактериям, циркулирующим в каждом конкретном хозяйстве.

ЛИТЕРАТУРА

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. Притыченко [и др.] // *Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак почета» государственная академия ветеринарной медицины»*. – 2012. – Т. 48, № 1. – С. 54–59.
3. 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.
4. *Руководство по вакцинному и сывороточному делу*. – М., 1978. – 440 с.
5. *Руководство по профилактике в практическом здравоохранении* / под ред. И. С. Глазунова, Р. Г. Оганова [и др.] – М., 2000. – 217 с.
5. Mine, Y. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review / Y. Mine, J. Kovacs-Nolan // *Journal of medicinal food*. – 2002. – Vol. 5. – № 3. – P. 159–169.
6. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients / E. Nilsson [et al.] // *Pediatric pulmonology*. – 2008. – Vol. 43. – № 9. – P. 892–899.
7. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy / E. Spillner [et al.] // *Biologicals*. – 2012. – Vol. 40. – № 5. – P. 313–322.