

Эффективность антительного ответа молодняка овец на иммунизацию рекомбинантным миостатином

*Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания
животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»
Боровск, Калужская обл., РФ*

В.А. Езерский

XX научно-практическая межрегиональная конференция
«БИОМЕДИЦИНА И БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ»
- 2024 -

**ФГБУН «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»**

Рекомбинантный миостатин (pMSTN), обладающий достаточной иммуногенностью, может быть использован для повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот, свиньи, лошади, кролики), птицы за счет индукции синтеза специфических аутоантител к миостатину, блокирования его действия и стимуляции роста мышечной ткани.

Аминокислотная последовательность миостатина идентична у всех сельскохозяйственных животных. **Рекомбинантный миостатин**, как антиген, может стать универсальным средством для повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных, птицы.

Предполагаемый механизм действия **pMSTN**: временное блокирование активности эндогенного миостатина с помощью аутоантител.

Цель: оценить иммунный ответ ягнят, полученный при разных способах введения вакцины с рМСТ

Задачи:

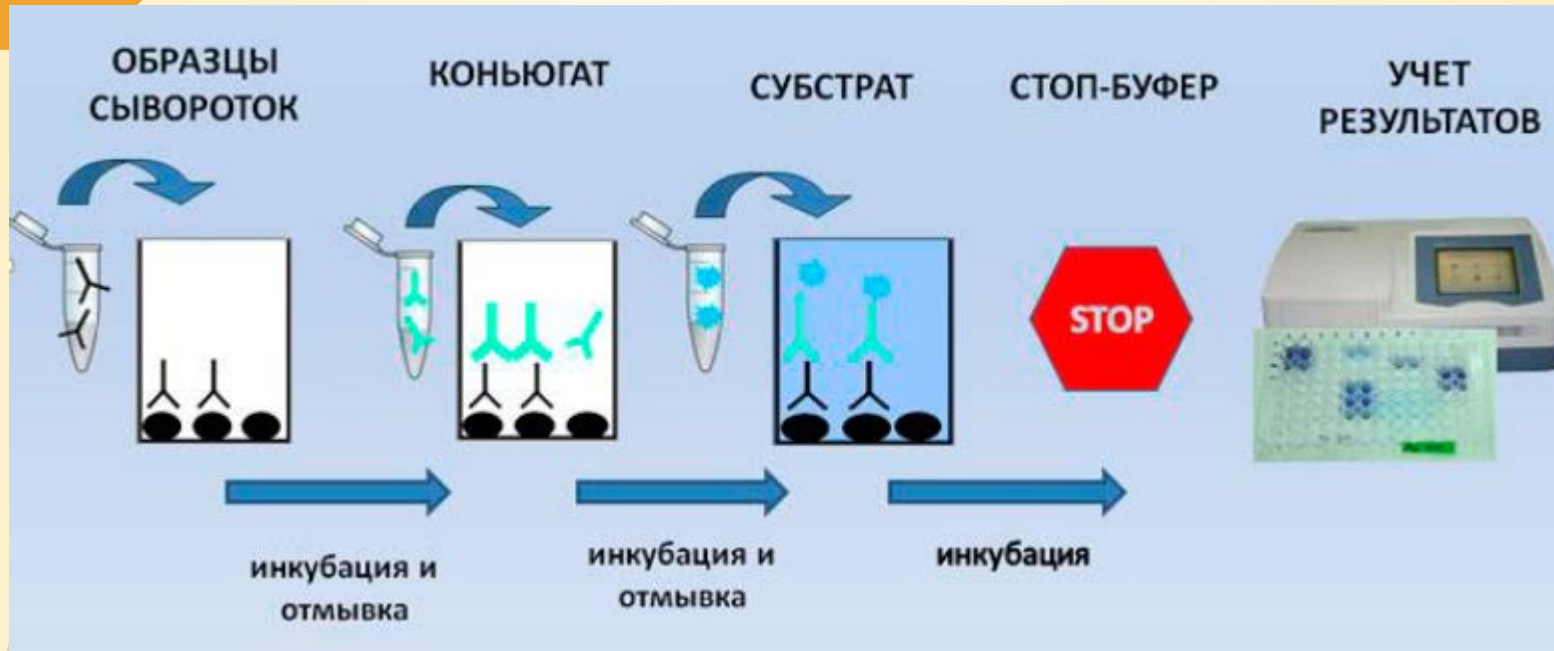
1. Иммунизация ягнят рекомбинантным миостатином (рМСТ)
2. Проверка титра антител

Ранее:

1. Была разработана **тест-система** для определения титра антител к миостатину в крови овец.
 - Получены и очищены IgG овцы; получен аффинный сорбент с иммобилизованными овечьими антителами;
 - Выделенными IgG овцы иммунизированы кролики для получения кроличьих антител против овечьих IgG («Кролик-анти-Овца»);
 - Получены аффинно очищенные антитела «Кролик-анти-Овца»);
 - Получены конъюгаты антител «Кролик-анти-Овца» с пероксидазой хрена (ПХ)
 - Проведена оценка качества конъюгата «Кролик-анти-Овца/ПХ» и подобрано рабочее разведение для его использования в ИФА;
 - Подобраны условия проведения ИФА, оценена иммуногенность рекомбинантного миостатина у иммунизированных овец.
2. **Иммунизированные рМСТ** кролики и овцы показали иммуногенную активность рекомбинантного миостатина.

Схема ИФА (тест-система)

Непрямой вариант - для выявления специфических антител



Пояснения:

- 1. Антиген** – рекомбинантный миостатин, иммобилизация на твердой фазе (планшет); **Первые антитела**, специфичные к рМСТ – **образцы сыворотки** иммунизированных рМСТ животных (овец);
- 2. Конъюгат (Вторые антитела)** - аффинно очищенные АТ кролик-анти-IgG овцы, конъюгированные с пероксидазой хрена.
- 3. Субстрат** для пероксидазы хрена - хромоген (3,3',5,5'-тетраметилбензидин ТМБ); субстратный буфер (содержит перекись водорода).
- 4. Стоп-буфер** – раствор, останавливающий ферментативную реакцию

Конъюгат – АГ или АТ, меченные ферментной меткой.

Основные требования к **конъюгату**:

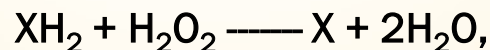
- высокий антителыный титр и высокая афинность к АГ/АГ, чтобы его можно было использовать в большом разведении для уменьшения неспецифического связывания;
- достаточная специфичность в рабочем разведении;
- достаточная ферментативная активность конъюгата.

Основные требования к **ферментам-меткам**:

- высокая каталитическая активность,
- возможность получения фермента в высоко очищенном состоянии,
- сохранение каталитической активности после химической модификации при получении *конъюгатов* фермент-АТ(АГ),
- стабильность,
- простота и чувствительность метода определения активности фермента.

Для ферментативной метки применяют **пероксиду хрена (ПХ)**, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу и т. д.

ПХ катализирует реакцию

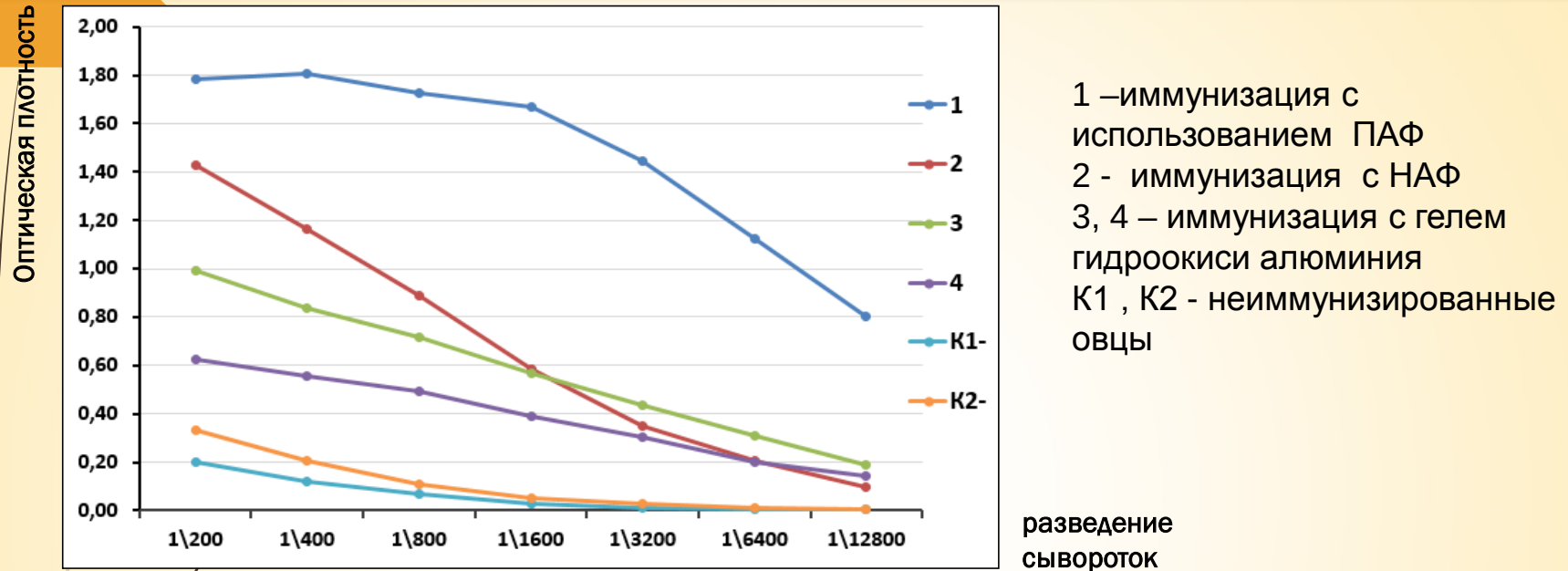


XH_2 - восстановленный хромоген, X – окисленный хромоген

Восстановленный бесцветный ТМД в пероксидазной реакции превращается в окисленную окрашенную форму с максимумом ОП при 450 нм, регистрируемой фотометрически.

Предварительный эксперимент:

Титр сывороток овец, иммунизированных рМСТН - 14 суток после вакцинации.

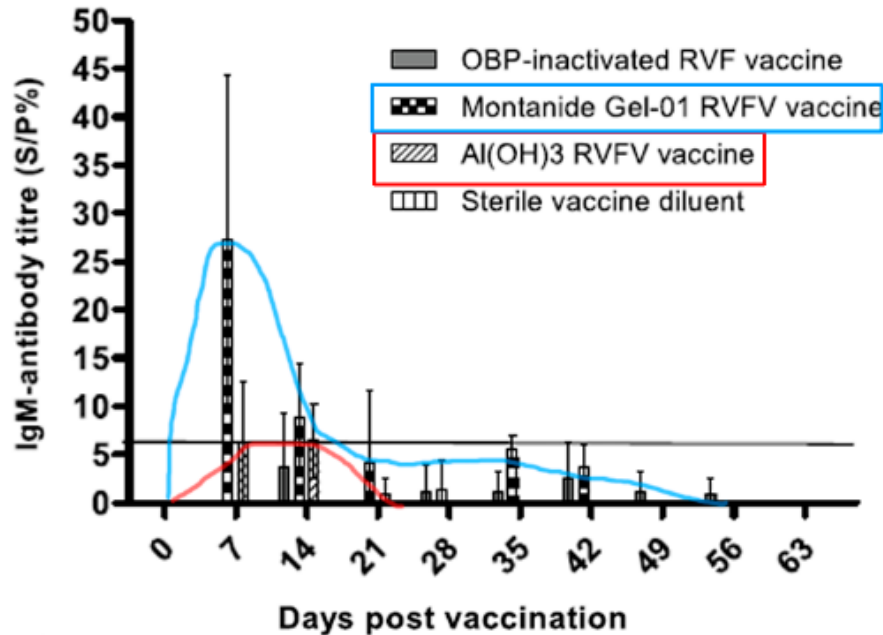


Выводы:

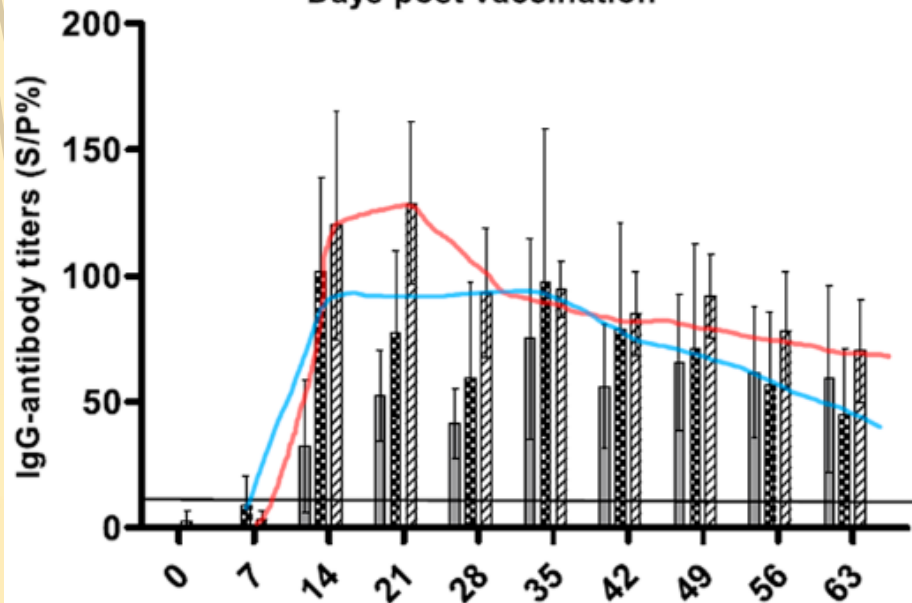
- 1) оптимальное разведение сывороток для ИФА - 400-800 раз. ОП сывороток иммунизированных животных в 4-15 раз выше, чем у контрольных;
- 2) титр сывороток зависит от используемого адъюванта и места введения антигена (высокий титр – при подкожной иммунизации с ПАФ, низкий – в/мышечно с гелем гидрооксида алюминия);
- 3) рМСТ овец обладает иммуногенной активностью и может быть использован для иммунизации животных в составе вакцин.

Из других исследований *:

Типичный профиль адаптивного иммунного ответа у овец



Общий уровень антител IgM и IgG, после иммунизации овец инактивированной вакциной вируса лихорадки Рифт-Валли (RVF). Титры антител измерены методом ИФА.



* Matsiela M.S., Naicker L., Khoza T. et al. Safety and immunogenicity of inactivated Rift Valley Fever Smithburn viral vaccine in sheep. *Virology Journal*. 2023;20:221. Doi: 10.1186/s12985-023-02180-2

Схема эксперимента

Животные: ягнята (баранчики) мериносовой породы в возрасте 4 месяцев.

Были сформированы 3 группы по 8 голов в каждой группе: контрольная (**К** – не иммунизировали), первая опытная (**ВМ** – внутримышечное введение вакцины), вторая опытная (**ПК** – подкожное введение вакцины).

Вакцина: раствор рМСТ (2 мг/мл в буфере с 4 М мочевиной) смешивали с равным объемом геля гидроокиси алюминия (ГА) (Щелковский биокомбинат).

Доза: 1 мг рМСТ/голову.



Внутримышечное (ВМ) введение вакцины: одноточечно в область холки.

Подкожное (ПК) введение вакцины: 3-4 точки по 200-300 мкл в паховой области (место инъекции, лишенное плотного шерстного покрова).

Взвешивание животных и **взятие крови** для определения титра антител к миостатину проводили перед введением вакцины, через 14 и 28 суток после вакцинации.

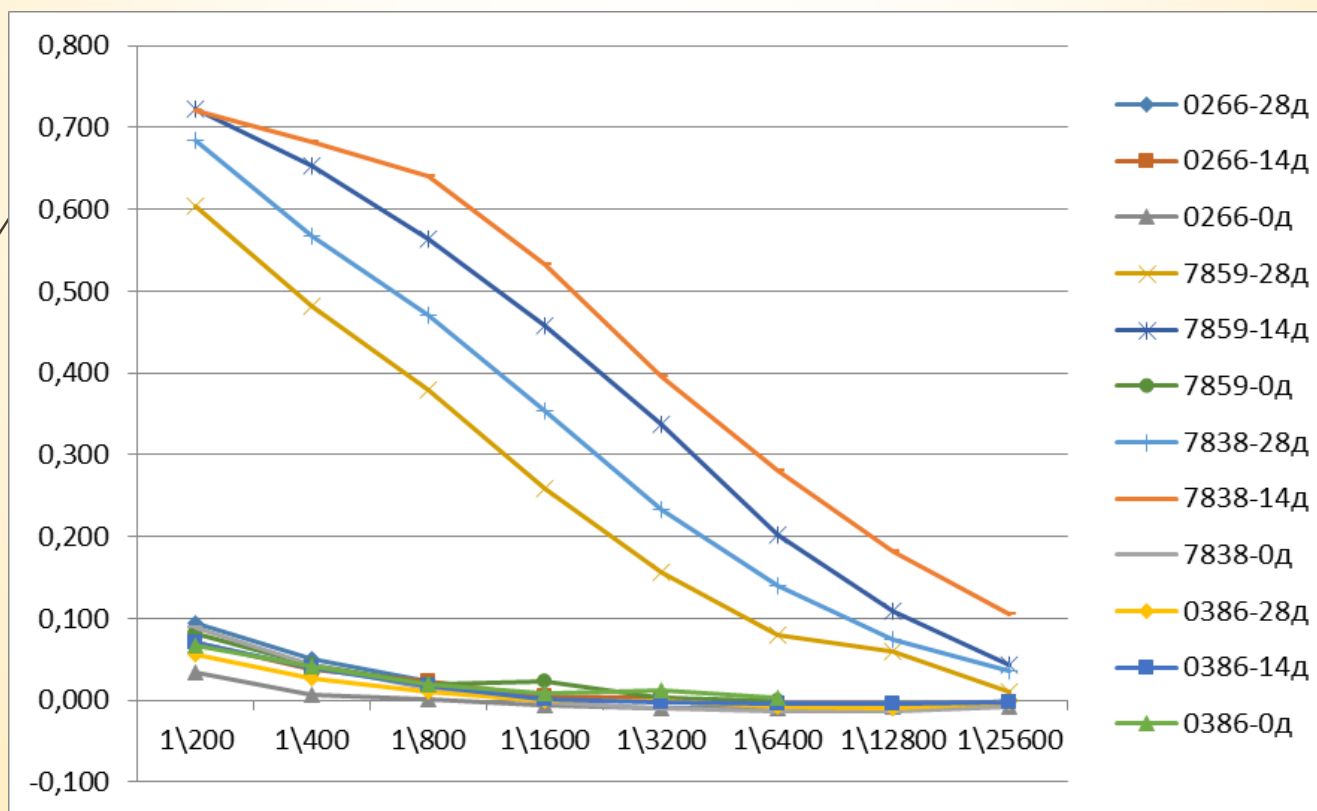
Длительность эксперимента – 28 суток с момента иммунизации.

Для **определения титра антител** к миостатину использовали собственную разработанную в 2022 году тест-систему

Подбор условий проведения ИФА

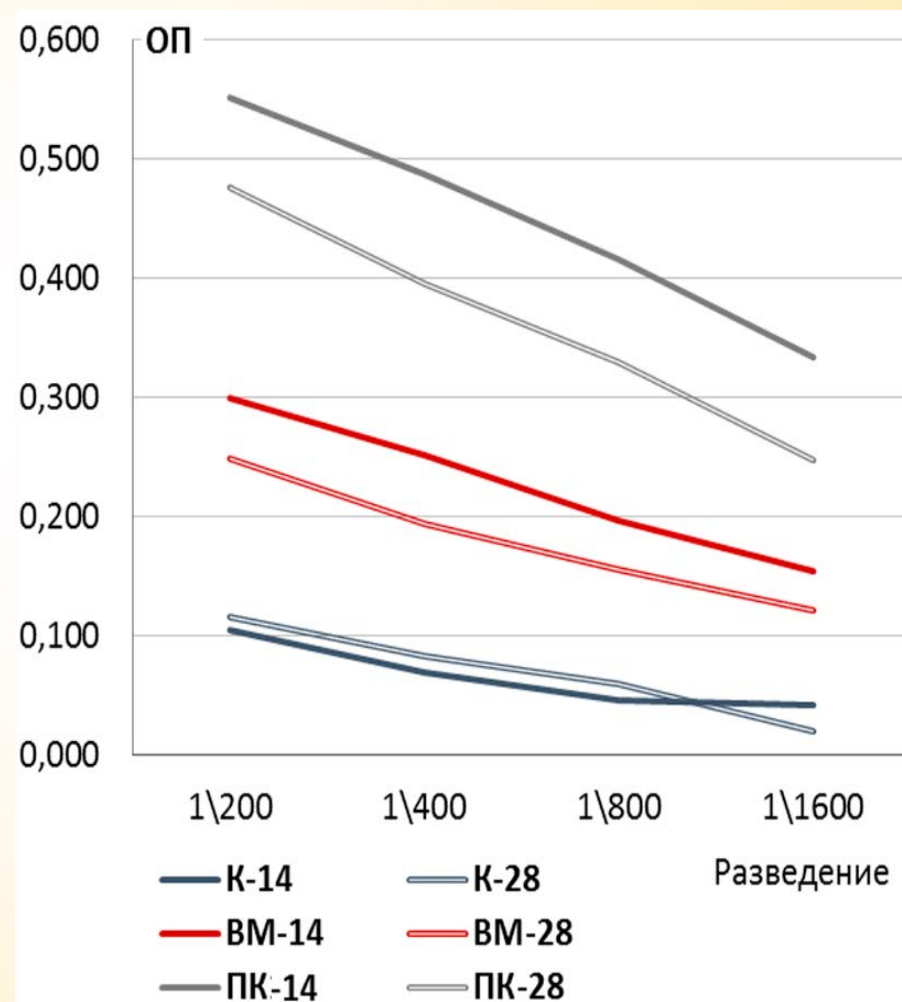
ОП образцов сывороток, взятых до иммунизации, при всех разведениях сывороток находится в интервале 0-0,1 о.е.

Оптимальный диапазон разведения сывороток для ИФА: 1/200-1/1600.



Усредненные данные по титрам антител ягнят контрольной и опытных групп.

	Сутки	Разведения сывороток			
		1\20 0	1\400	1\800	1\160 0
		Баранчики 4 месячного возраста			
К	0	0,136	0,103	0,075	0,055
	14	0,106	0,069	0,046	0,042
	28	0,116	0,084	0,059	0,020
ВМ	14	0,300	0,251	0,197	0,154
	28	0,249	0,195	0,156	0,121
ПК	14	0,551	0,487	0,416	0,334
	28	0,477	0,396	0,330	0,247



Выводы

- Однократная иммунизация ягнят рМСТ в дозировке 1 мг /голову с гелем гидроксида алюминия в качестве адъюванта оказалась достаточно эффективной при подкожном многоточечном введении вакцины
- Для поддержания титра антител необходима вторая иммунизация.
- Для иммунизации рМСТ желательно использовать молодых животных, находящихся в фазе максимального роста.
- У иммунизированных рМСТ 4-х месячных ягнят титр антител (как и среднесуточные привесы массы), был в среднем выше, чем у неиммунизированных.

Спасибо за внимание!

