

**NONSPECIFIC AND ANTIGEN-SPECIFIC PROPERTIES OF TRANSFER FACTOR OBTAINED FROM COLOSTRUM IN COWS SENSITIZED TO SALMONELLA PATHOGEN****V. Postoi***e-mail: vikylyj@meta.ua*National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine  
15, HeroyivOborony Str., Kyiv, 03041, Ukraine

*A promising direction for the treatment and prevention of many animal diseases caused by viruses, bacteria and other infectious agents is transfer factor usage. The article presents new data on the study of nonspecific and antigen-specific properties of transfer factor derived from bovine colostrum. Colostrum from immunized cows of black-and-white breed was used in order to obtain transfer factor. To sensitize the animals of experimental group, the vaccine was administered to cows twice at doses of 10 cm<sup>3</sup> and 15 cm<sup>3</sup> in 1.5 months before parturition. Animals of the control group were given an appropriate amount of physiological saline solution. The concentrated vaccine against Salmonellosis in calves from the Kherson Biofactory was used for immunization. To determine the presence of sensitization to Salmonella agent, an allergic skin test was used in 14 days after immunization. Colostrum samples were taken immediately and in 2 days after parturition of cows. Isolation of the transfer factor preparations from colostrum was carried out according to the method modified by the Department of Microbiology, Virology and Biotechnology of NUBIP of Ukraine. In order to assess the ability of transfer factor derived from vaccinated cows' donors to transfer the condition of specific sensitization, a leukocyte migration inhibition test was made by G. Freemel method with the use of transfer factor in different dilutions. To do this, a leukocytes suspension from mice spleen that was previously incubated with different dilution of the studied preparation with the addition of a specific antigen was used. The results of studies have shown that transfer factor obtained from colostrum in cows, sensitized to the salmonellosis pathogen, has pronounced antigen-specific properties against the Salmonella dublin. In addition, it is established that the antigen-specific properties of transfer factor depend on the degree of its dilution. Thus, transfer factor obtained from the colostrum can be used to transfer cell-mediated immunity into other animals to diseases against which pathogens the animals donors are immunized.*

**Key words:** *transfer factor, colostrum, leukocyte migration inhibition test, dialyzable leukocyte extract*

**НЕСПЕЦИФІЧНІ ТА АНТИГЕНСПЕЦИФІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТРАНСФЕР-ФАКТОРА, ОТРИМАНОВОГО З МОЛОЗИВА СЕНСИБІЛІЗОВАНИХ ДО ЗБУДНИКА САЛЬМОНЕЛЬОЗУ КОРІВ****В. В. Постой***e-mail: vikylyj@meta.ua*Національний університет біоресурсів і природокористування України,  
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

*Перспективним напрямком для лікування та профілактики багатьох хвороб тварин, викликаних вірусами, бактеріями та іншими інфекційними агентами, є використання трансфер-фактора. У статті наведено нові дані щодо вивчення неспецифічних та антигенспецифічних властивостей трансфер-фактора, отриманого з молозива корів. Для отримання трансфер-фактора використовували молозиво імунованих корів чорно-рябої молочної породи. Для сенсibilізації тварин дослідної групи за 1,5 місяця до отелення 10 коровам дворазово вводили вакцину у дозах 10 см<sup>3</sup> та 15 см<sup>3</sup>. Тваринам контрольної групи вводили відповідну кількість фізіологічного розчину. Для імунізації використовували концентровану вакцину проти сальмонельозу телят Херсонської біофабрики. Для визначення наявності сенсibilізації до збудника сальмонельозу проводили алергічну шкірну пробу через 14 діб після імунізації. Після отелення корів відразу та через 2 доби відбирали проби молозива. Виділення препарату трансфер-фактора з молозива проводили за методикою, модифікованою кафедрою мікробіології, вірусології та біотехнології НУБіП України. Для оцінки здатності трансфер-фактора, отриманого від вакцинованих корів-донорів, переносити стан специфічної сенсibilізації ставили реакцію інгібіції міграції лейкоцитів згідно з методикою Г. Фрімеля за використання різних розведень трансфер-фактора. Для цього використовували суспензію лейкоцитів селезінок мишей, які*

попередньо інкубували за різного розведення досліджуваного препарату з додаванням специфічного антигену. Результати досліджень показали, що трансфер-фактор, який отриманий з молозива корів, сенсibilізованих до збудника сальмонельозу, володіє вираженими антигенспецифічними властивостями проти *Salmonella dublin*. Крім того, встановлено, що антигенспецифічні властивості трансфер-фактора залежать від ступеня його розведення. Отже, трансфер-фактор, що виділений з молозива, може бути використаний для передачі клітинно-опосередкованого імунітету іншим тваринам до хвороб, проти збудників яких імунізовано тварин-донорів.

**Ключові слова:** трансфер-фактор, молозиво, реакція інгібіції міграції лейкоцитів, діалізний екстракт лейкоцитів.

### Постановка проблеми

Використання трансфер-фактора для лікування та профілактики інфекційних захворювань тварин та птиці є надзвичайно актуальним для ветеринарної науки та практики. Однак, багато питань щодо методів отримання трансфер-фактора, його властивостей та можливостей практичного застосування є недостатньо вивченими. Наразі залишається спірним питання про специфічність підвищеної чутливості сповільненого типу, що виникає після застосування трансфер-фактора. В окремих випадках перенесення підвищеної чутливості сповільненого типу пояснюють неспецифічною стимуляцією прихованої сенсibilізації реципієнтів. Однак, у багатьох дослідках не вдається показати перенесення підвищеної чутливості сповільненого типу [6].

### Аналіз останніх досліджень і публікацій

Термін «трансфер-фактор» (Transfer factor), або «фактор перенесення», запропонував Н. Lawtence, який вперше в 1955 р встановив можливість перенесення підвищеної чутливості сповільненого типу до туберкуліну і М-антигену стрептокока у практично здорових людей за допомогою лізату лейкоцитів крові донорів, сенсibilізованих цими речовинами [10]. Трансфер-фактори є по суті невеликі імунні молекули месенджерів, які виробляються у всіх вищих організмів. У 1955 році вперше було здійснено перенесення гіперчутливості уповільненої типу до туберкуліну і білка-М стрептокока екстрактами зруйнованих лейкоцитів [11]. Трансфер-фактори спочатку були описані як імунні молекули, які отримані з крові або клітин селезінки і викликають гіперчутливість уповільненого типу та синтез лімфокінів, а також зв'язування антигенів. Вони мають молекулярну масу 3500–10000 дальтон і складаються виключно з амінокислот [8]. У 2000 р. Kirkpatrick виявив в С-кінцевих фрагментів різних трансфер-факторів загальну амінокислотну послідовність LLYAQDL/VEDN і припустив, що дана ділянка бере участь у зв'язуванні трансфер-факторів з

рецепторами Т-клітин [9]. Н. Lawtence вважав, що трансфер-фактор є древньою частиною імунної системи і являє собою "архаїчний діалект в мові клітин" [12].

Встановлено здатність виділеного трансфер-фактора, який наявний в діалізаті лейкоцитів серед інших компонентів, переносити клітинно-опосередкований імунітет від імунізованого донора до неімунізованого реципієнта [7]. Досліджувалась ефективність використання трансфер-фактора у лікуванні та профілактиці інфекційних, інвазійних та онкологічних хвороб тварин та людей, зокрема, при лікуванні хвороби Ауескі [5], чуми м'ясоїдних [2], туберкульозі [15], пневмонії [16], стафілококової інфекції [1], сепсисі [13], сальмонельозі [14], ротавірусній інфекції телят, парагрипу, інфекційному ринотрахеїті великої рогатої худоби [4] тощо.

Таким чином, враховуючи низку зростаючих новітніх засобів та методів профілактики і лікування хвороб тварин є актуальним питанням сучасної науки. З огляду на це, дослідження неспецифічних та антигенспецифічних властивостей трансфер-фактора, отриманого з молозива сенсibilізованих корів на часі.

### Мета, завдання та методика досліджень

Метою дослідження було визначити неспецифічні та антигенспецифічні властивості трансфер-фактора, отриманого з молозива сенсibilізованих до збудника сальмонельозу корів.

Для отримання трансфер-фактора в якості тварин-донорів молозива використовували імунізованих корів чорно-рябої молочної породи. На час проведення досліджень господарство було вільне від інфекційних та інвазійних хвороб. Для сенсibilізації тварин дослідної групи за 1,5 місяця до отелення 10 коровам дворазово вводили вакцину (з інтервалом 10 діб) у дозах 10 см<sup>3</sup> та 15 см<sup>3</sup>. Тваринам контрольної групи вводили відповідну кількість фізіологічного розчину. Імунізацію тільних корів здійснювали концентрованою формол-галуневою вакциною проти сальмонельозу (паратифу) телят,

виготовленою Херсонською біофабрикою (ТУ У 46.15.158-96; суспензія із інактивованої формаліном культури штаму *Salmonella dublin* (*S. dublin*) 373 ( $4 \times 10^7$  КУО/см<sup>3</sup>) з додаванням алюмокалієвих галунів та хлористого кальцію). Для визначення наявності сенсibiliзації до збудника сальмонельозу використали алергічну шкірну пробу через 14 діб після імунізації. Після отелення корів одразу та через дві доби відбирали проби молозива в ємності з невеликою кількістю розчину Хенкса з антибіотиками. Виділення препарату трансфер-фактора з молозива проводили за методикою, модифікованою на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології НУБіП України. Після чого ставили реакцію інгібіції міграції лейкоцитів за використання різних розведень трансфер-фактора. Реакцію проводили у пластикових чашках Петрі під шаром агарози за методикою Г. Фрімеля. З метою оцінки здатності трансфер-фактора, що отриманий від вакцинованих корів-донорів, переносити стан специфічної сенсibiliзації використовували суспензію лейкоцитів селезінок мишей, які попередньо інкубували за різного розведення досліджуваного препарату з додаванням специфічного антигену. Для отримання суспензії лейкоцитів використовували селезінку нелінійних білих мишей. Селезінки відбирали у стерильних умовах і переносили в охолоджене живильне середовище Ігла-МЕМ з антибіотиками. Результати реакції фіксували шляхом обробки чашок з метанолом протягом 20 хвилин, а потім стільки ж з 35%-ним формальдегідом. Шар агарозного гелю обережно відокремлювали скальпелем, чашки ополіскували дистиллятом. Фарбування зон міграції проводили за методом Романовського-Гімзе. Потім за допомогою фотозбільшувача зони міграції проектували на папір за однакового збільшення, позначали зони міграції маркером, вирізали та зважували. За результат приймали середнє значення маси спроектованих зон міграції 7 лунок. Індекс міграції (ІМ) визначали за формулою:

$$ІМ = A \div B \times 100\%$$

де А – середнє значення маси зон міграції у дослідних тест-системах; В – середнє значення маси зон міграції у контролі.

Позитивною реакцією на антиген вважали пригнічення міграції не менше, ніж на 20 %, що відповідає індексу міграції  $\leq 80$  %. ІМ визначали за відношенням спроектованої площі міграції дослідних зразків до контрольних. Ступінь

сенсibiliзації лімфоцитів є обернено пропорційним до величини ІМ: чим вищий рівень сенсibiliзації, тим меншою є зона міграції лейкоцитів і ІМ, і навпаки, якщо ІМ наближається до 100 %, то це свідчить про нижчий рівень сенсibiliзації. Отримані результати були оброблені згідно з загальноновизнаними методами статистики.

### Результати досліджень

Реакція інгібіції міграції лейкоцитів дозволяє виявити неспецифічні та антигенспецифічні властивості трансфер-фактора, оцінити опосередковану клітинами імунну відповідь, визначити його імуномодуючу властивість впливати на продукцію сенсibiliзованими лімфоцитами медіаторів різнобічної дії [3]. Неспецифічна реактивність визначається за дії трансфер-фактора на інтактні клітини, а антигенспецифічні ефекти спостерігаються при міграції клітин під впливом трансфер-фактора разом з антигеном. Дана реакція високоспецифічна і є одним із показників гіперчутливості сповільненого типу.

Результати реакції інгібіції міграції лейкоцитів, оброблених досліджуваними зразками трансфер-фактора, який було отримано з молозива сенсibiliзованих до збудника сальмонельозу корів, наведені у таблиці 1. Як свідчать результати досліджень, маса спроектованих зон міграції у контрольних пробах без антигену до *S. dublin* становила  $18,0 \pm 0,82$  мг, а індекс міграції складає 100 %.

За обробки тест-клітин нерозведеними зразками відмічено пригнічення міграції лейкоцитів при контакті із антигеном до *S. dublin*. Причому, різниця маси спроектованих зон міграції дослідних проб порівняно до аналогічних показників контролю була вірогідною і становила  $8,02 \pm 0,77$  мг ( $p < 0,001$ ).

Розведення препарату трансфер-фактора супроводжується поступовим зменшенням рівня пригнічення міграції лейкоцитів при контакті із антигеном до *S. dublin*. Так, за розведення трансфер-фактора 1:1 маса зони міграції становила  $9,10 \pm 1,18$  мг, за розведення 1:2 –  $10,92 \pm 0,96$  мг, за розведення 1:4 –  $12,04 \pm 1,32$  мг та за розведення 1:8 –  $13,26 \pm 0,72$  мг. Слід відмітити, що індекс міграції хоча і зменшується з показника  $44,56 \pm 4,27$  % у нерозведеному зразку до показників  $50,56 \pm 6,54$  %,  $60,67 \pm 5,31$  %,  $66,89 \pm 7,32$  % та  $73,67 \pm 4,00$  % відповідно у розведеннях 1:1, 1:2, 1:4 та 1:8, однак залишається достовірний ( $p < 0,001$ ).

Таблиця 1. Результати реакції інгібіції міграції лейкоцитів за використання різних розведень трансфер-фактора ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

| Розведення                 | Робочий антиген                      |                       |                                      |                       |
|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|
|                            | <i>S. dublin</i>                     |                       | <i>E. coli</i>                       |                       |
|                            | маса зон міграції<br>тест-клітин, мг | індекс<br>міграції, % | маса зон міграції<br>тест-клітин, мг | індекс міграції,<br>% |
| Не розведений              | 8,02±0,77                            | 44,56±4,27            | 17,92±0,72                           | 92,83±3,71            |
| 1:1                        | 9,10±1,18                            | 50,56±6,54            | 17,81±0,4                            | 92,28±2,05            |
| 1:2                        | 10,92±0,96                           | 60,67±5,31            | 19,22±0,32                           | 99,59±1,65            |
| 1:4                        | 12,04±1,32                           | 66,89±7,32            | 18,7±0,25                            | 96,89±1,30            |
| 1:8                        | 13,26±0,72                           | 73,67±4,00            | 19,2±0,49                            | 99,48±2,53            |
| 1:16                       | 16,46±0,67                           | 91,44±3,70            | 18,26±0,53                           | 94,61±2,72            |
| 1:32                       | 17,24±0,28                           | 95,78±1,58            | 19,56±0,43                           | 101,35±2,24           |
| Контроль<br>(без антигену) | 18,0±0,82                            | 100±0,00              | 19,3±0,44                            | 100±0,00              |

Подальші розведення досліджуваних зразків трансфер-фактора достовірного пригнічення міграції тест-клітин не проявляли, так індекс міграції лейкоцитів у пробах з розведенням 1:16 та 1:32 становив, відповідно, 91,44±3,70 % та 95,78±1,58 %, що перевищує порогові 80 % і є недостовірним.

За тестування трансфер-фактора, який було отримано з молозива сенсibilізованих до збудника сальмонельозу корів, достовірного пригнічення міграції лейкоцитів при контакті із антигеном до *E. Coli*, незалежно від ступеня розведення, встановлено не було.

Отже, з огляду на отримані дані досить перспективним є профілактичне застосування етіотропних, симптоматичних та регулюючих мікробіоценоз кишечника засобів у комплексі із молозивним трансфер-фактором, отриманим із молозива сенсibilізованих до збудника сальмонельозу корів, що, з огляду на антигенспецифічні та неспецифічні властивості трансфер-фактора, може сприяти підвищенню резистентності телят, зниженню їх захворюваності хворобами травного тракту.

### Висновки та перспективи подальших досліджень

1. Результати реакції інгібіції міграції лейкоцитів свідчать про можливість передачі *in vitro* імунокомпетентним клітинам стану сенсibilізації до збудника сальмонельозу за допомогою антигенспецифічного діалізного екстракту лейкоцитів.

2. Доведено дозозалежний вплив зразків трансфер-фактора на міграцію тест-лейкоцитів при контакті із специфічним антигеном *in vitro*.

Перспективи подальших досліджень спрямовані на вивчення імунобіологічних властивостей трансфер-фактора *in vitro* та *in vivo*.

### References

- Buchvald, S., Perepechkina, N. P., Salov, V. F. & Mats A. N. (1985). Mestnyy spetsificheskyy immunnyy otvet k belku A Staphylococcus aureus v limfoidnoy tkani mindalin cheloveka [Local specific immune response to A Staphylococcus aureus protein in human lumbar lymphoid tissue]. *Zhurnal mikrobiologii. epidemiologii. Immunobiologii*, 5, 78–83 [in Russian].
- Tashuta, O. S. (2007). Vyznachennia imunobiologichnoi aktyvnosti transfer faktora, spetsyfichnoho shchodo zbudnyka chumy miasoidnykh [Determination of immunobiological activity of a transfer factor specific to the causative agent of plague of carnivores]. *Naukovyi visnyk Natsionalnoho ahrarnoho universytetu*, 109, 195–200 [in Ukrainian].
- Skybitskyi, V. H., Spivak, M. Ya. & Stepaniuk, O. V. (2000). Metodichni rekomendatsii z otrymannia ta testuvannia faktora perenesennia aktyvnoho imunitetu proty patohennykh bakterii ta virusiv [Methodical recommendations for the receipt and testing of the factor for the transfer of active immunity against pathogenic bacteria and viruses]. Kyiv : NAU [in Ukrainian].
- Kukharkina, O. V. (2003). Poluchenie i izuchenie svoystv preparatov faktora perenosa protiv nekotorykh virusnykh i bakterialnykh infektsiy zhivotnykh [Obtaining and studying the properties of drugs transfer factor against some viral and bacterial infections of animals] (Avtoreferat dissertatsii kandidata biologicheskikh nauk). FGU "Federalnyy

tsestr okhrany zdorovia zhyvotnykh", Vladimir [in Russian].

5. Stepaniuk, O. V. (1999). Vlastyvoli faktora perenesennia (FP) do zbudnyka khvoroby Auiieski [Properties of the transfer factor (AF) to the pathogen Aujeszky]. *Veterynarna medytsyna Ukrainy*, 9, 14–15 [in Ukrainian].

6. Burger, D. R., Klesius, P. H., Vandenberg, A. A., Vetto, R. M. & Swann A. I. (1979). Transfer of keyhole limpet hemocyanin dermal reactivity to man with bovine Transfer Factor. *Cell. Immunol.*, 43, 192–196. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(79\)90162-X](https://doi.org/10.1016/0008-8749(79)90162-X).

7. Delgado, R., Romano, E. & Beffort, E. (1981). Dialyzable leukocyte extract therapy in immunodepressed patients with cutaneous leishmaniasis. *Clin. Immunol. and Immunopathol.*, 19, 351. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(81\)90078-7](https://doi.org/10.1016/0090-1229(81)90078-7).

8. Kirkpatrick, C. H. (1993). Structural nature and functions of transfer factors. *Ann NY Acad Sci*, 685, 362–368. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb35889.x>.

9. Kirkpatrick, C. H. (2000). Transfer factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules. *Molecular Med.*, 6, 332–337. <https://doi.org/10.1007/BF03401941>.

10. Lawrence, H. (1949). The cellular transfer of coetaneous hypersensitivity to tuberculin in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 71, 516–522. <https://doi.org/10.3181/00379727-71-17242>.

11. Lawrence, H. (1955). The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leukocytes. *Clin. Invest.*, 32, 219–230. <https://doi.org/10.1172/JCI103075>.

12. Lawrence, H. S. & Borkowsky, W. (1983). A new basis for the immunoregulatory activities of transfer factor--an arcane dialect in the language of cells. *Cellular Immunology*, 82, 102–16. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(83\)90145-4](https://doi.org/10.1016/0008-8749(83)90145-4).

13. Lokaj, I. (1988). Dialysate of leukocyte homogenate in the treatment of sepsis. *Bratisl. Lek. Listy*, 89(8), 586–590.

14. Mykula, I. (1993). Stabilization of salmonella – specific dialyzable leucocyte extracts. *Vetrinary immunology and immunopatology*, 32, 103–112. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(92\)90072-X](https://doi.org/10.1016/0165-2427(92)90072-X).

15. Pekarek, I., Cech, K. & Barnet, K. (1992). The clinical use of specific transfer factor. *Recent advances in Transfer Factor and dialyzable leukocyte extracts* (pp. 256–263). Tokyo.

16. Wilson, G. B., Metcalf, J. F. & Fudenberg, H. H. (1982). Treatment of Mycobacterium fortuitum infection with transfer factor. New methodology for evaluating TF potency and predicting clinical response. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 23, 478–491. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(82\)90132-5](https://doi.org/10.1016/0090-1229(82)90132-5).