

ВЕТЕРИНАРНІ НАУКИ

УДК 619:616.98:636.8

DOI: 10.15587/2313-8416.2017.97681

РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ ЛІКУВАЛЬНО-ДІАГНОСТИЧНОЇ СИРОВАТКИ ПРОТИ ВІРУСУ КАЛІЦИВІРОЗУ КОТІВ

© Т. Г. Козленко, В. В. Недоссков, О. Г. Мартинюк

Розроблено ефективну схему імунізації для отримання гіперімунної сироватки проти вірусу каліцивірозу котів. Антиген вводили комбіновано підшкірно та внутрішньом'язово з одночасним застосуванням імуностимулюючого препарату «Імунофан».

Проведено виділення глобулінової фракції білків шляхом висалювання сірчанокислим амонієм. Одержували фракцію чистих імуноглобулінів G, що у два рази вище питомої ваги імуноглобулінів вихідної сироватки

Ключові слова: імуноглобуліни, гіперімунна сироватка, вірус, антиген, антитіла, каліцивіроз котів, глобулін, лікування

1. Вступ

Враховуючи важливість використання високо-ефективних засобів діагностики каліцивірозу, науковий і практичний інтерес представляє розробка способу отримання високоактивного та специфічного антигену каліцивірусу. Останній буде використаний для імунізації тварин-донорів з метою одержання гіперімунних протикаліцивірусних сироваток. Вони будуть корисні для виготовлення лікувальних та діагностичних препаратів для серологічних реакцій.

Препарати внутрішньосудинних імуноглобулінів, які одержують із плазми донорів, сьогодні стали одними із основних продуктів на світовому ринку завдяки їхньому успішному застосуванню для профілактики і лікування багатьох інфекційних, аутоімунних і запальних захворювань. У дослідженні розглядаються процеси виробництва гіперімунної сироватки та виділення з неї специфічних імуноглобулінів, в контексті їхньої вартості і виходу цільового продукту, який має бути високої якості, а також безпечним.

2. Літературний огляд

Більшість імунологічних методів дослідження передбачають застосування імунних сироваток, одержуваних з крові тварин, імунізованих різними антигенами, при цьому активність останніх істотно впливає на результати дослідження [1, 2].

Для отримання сироваток необхідно підібрати раціональну схему імунізації тварин. Під цим розуміють перш за все такі фактори, як фізико-хімічний склад антигену, доза, способи, інтервали і кратність введення антигену, загальну тривалість циклу імунізації, застосування ад'ювантів та імуномодуляторів. Загальновідома залежність антитілоутворення від дози антигену, що вводиться тварині. Рівень імунної ві-

дповіді організму залежить від дози антигену, який буде введений, оскільки занадто велика доза може викликати імунне виснаження організму, а замала – недостатнє імунне подразнення, що приводить до зниження титрів антитіл. При введенні великих доз антигену утворюються антитіла з низьким ступенем афінитету і їх синтез триває протягом довгого часу. Зменшуючи дозу, можна підібрати таку, яка буде індукувати синтез високоафінних антитіл [3, 4].

Результати вивчення залежності антитілоутворення від кратності введення антигену свідчать про очевидну перевагу багаторазової імунізації перед одноразовою. Інтервали між ін'єкціями імуногену розраховуються емпіричним шляхом, причому результати дослідів зазвичай можуть бути використані лише стосовно конкретного препарату. Простежується залежність між способом введення антигену і рівнем антитіл в сироватці крові тварин. Основними причинами цього є швидкість, з якою антиген поширюється від місця ін'єкції, і ймовірність його проходження через лімфатичні вузли та інші органи імунної системи [1, 5].

Встановлено, що окрім шляху введення та підбору ад'ювантів, застосування різноманітних імуномодулюючих препаратів забезпечує підвищення біологічної активності антигену та імунного статусу тварин-продуцентів гіперімунних сироваток крові. Вчені успішно використовували у своєму дослідженні імуностимулюючі препарати, одним з яких був колоїдний розчин поліпренілфосфату із хвої ялиці («Фоспреніл»). Встановлено, що останній підвищує природну резистентність організму, стимулює продукцію інтерферону, інтерлейкінів (ІЛ-1, ІЛ-2), фактору некрозу пухлин (ФНП), активність природних кіллерів і фагоцитоз [5].

Використання імуномодулятора «Тималіну» сприяє значному підвищенню титрів специфічних сироваткових антитіл за рахунок зростання числа антитілопродукуючих клітин в результаті стимуляції функції макрофагів і хелперних Т-клітин. «Циклофосфан», який є класичним імуносупресором, також активує макрофаги, стимулюючи фагоцитарну, цитотоксичну і супресивну (в відношенні головним чином Т-лімфоцитів) функції [6].

Позитивні результати отримані при використанні імунокоректора «Імунофану» синтетичного гекопептиду, який впливає на зростання титру і тривалість циркуляції специфічних антитіл [7, 8].

У дослідженні [9], одна і та ж кінцева мета може бути досягнута різними шляхами, але в будь-якому випадку, схема імунізації, запропонована для виробництва, повинна відповідати певним вимогам. Головною з вимог є – можливість отримання сироваток з досить високим титром специфічних антитіл за порівняно короткий проміжок часу при мінімальних затратах антигенного й іншого матеріалу.

Враховуючи вище викладене, науковий і практичний інтерес досліджень представляє розробка способу отримання високоактивного та специфічного антигену каліцивірусу.

3. Мета та задачі дослідження

Мета дослідження – отримання високоактивних, специфічних гіперімунних сироваток проти вірусу каліцивірозу котів.

Для досягнення мети були поставлені наступні задачі:

а) розробити раціональну схему гіперімуназації тварин, що включає підбір тварин-донорів, антигену, його дози, способу, інтервалу та кратності введення, загальної тривалості циклу імуназації, застосування ад'ювантів й імуностимуляторів.

б) Виділити імуноглобуліни класу G з одержаних сироваток крові тварин-продуцентів шляхом виділення глобулінової фракції.

4. Матеріали та методи досліджень

Як продуцентів сироваток крові були використані кролі. Антигеном при проведенні гіперімуназації служив ізолят К-2, накопичений в культурі клітин СтФК з активністю 8,5 ЦПД₅₀/см³. Антиген був очищений від клітинного детриту шляхом низькошвидкісного центрифугування суспензії (6000 об/хв., впродовж 30 хв); осаджений і концентрований сульфатом амонію, в подальшому очищений з використанням градієнтів концентрації сахарози та інактивованій формаліном у концентрації 0,2 % за температури 37 °С і експозиції 72 години.

У схемі гіперімунації використовували 12 дорослих кролів, обох статей породи «Шиншила» масою 2,5–3,0 кг, з яких було сформовано групи по тварини у кожній.

Тваринам першої групи антиген вводили внутрішкірно в 5 точок по 0,1 см³. Тваринам другої групи антиген вводили внутрішньом'язово по 0,5 см³. Тваринам третьої групи антиген вводили комбіновано: підшкірно по 0,5 см³ та внутрішньом'язово по 0,5 см³ на 1-й та 21-й день. Тваринам четвертої групи вводили мікрофільтрат незараженої культури клітин (контрольна група).

Також тваринам вводили імуностимулятор Імунофан у дозі 0,2 см³ підшкірно у кожному циклі імуназації.

Серологічна оцінка ефективності гіперімунації проводилась в РН, яку ставили за загальноприйнятною методикою проти 100 ЦПД₅₀/см³ КВК [10].

З метою одержання очищених імуноглобулінів класу G з одержаних сироваток крові кролів провели виділення глобулінової фракції. Для цього з одержаних гіперімунних сироваток крові кролів виділяли загальну фракцію глобулінів шляхом висолювання сірчанокислим амонієм за 40 % насиченості та гель-проникною хроматографією на ультрагелі АсА-34 та одержували фракцію імуноелектрофоретичних чистих імуноглобулінів G.

Для розділення фракцій суспензію глобулінів вносили в колонку з ультрагелем АсА-34, зрівноваженням 0,01–0,02 М ФСБ, рН 7,2–7,4. Підготовку, упаковку колонки та гельфільтрацію проводили згідно настанови виробника (Pharmacia, Італія). Фракцію імуноглобулінів відбирали окремо, а далі осаджували сульфатом амонію при насиченні до 40 %, при експозиції з останнім впродовж 30 хвилин за температури 4 °С, з наступним центрифугуванням при 2 тис. об/хв. впродовж 30 хвилин. Від солей сульфату амонію суспензію одержаних імуноглобулінів очищали шляхом діалізу проти 0,01 М ФСБ, рН 7,2–7,4, впродовж 12 годин.

Кількісне визначення білка проводили за методом Лоурі.

5. Результати досліджень та їх обговорення

Після апробації розробленої схеми гіперімуназації (табл. 1) визначали титри антитіл до вірусу каліцивірозу на 14-ту та 28-му добу досліду за допомогою реакції нейтралізації.

В результаті досліджень антитіла вже були виявлені на 14-у добу за внутрішньошкірного введення антигену та у тварин, імунізованих комбіновано внутрішньошкірно та внутрішньом'язово, титр антитіл складав 6,0 log₂ та 7,5 log₂, відповідно (табл. 2).

Таблиця 1

Схема отримання гіперімунної сироватки крові проти вірусу каліцивірозу на кролях, n=7

Доба	Доза, спосіб і кратність введення		
	I	II	III
1	0.1 мл в 5 точок в/ш	0,5 мл в/м	0,5 мл п/ш+0,5 мл в/м
7	0.1 мл в 5 точок в/ш	0,5 мл в/м	–
14	0.1 мл в 5 точок в/ш	0,5 мл в/м	–
21	0.1 мл в 5 точок в/ш	0,5 мл в/м	0,5 мл п/ш+0,5 мл в/м

Таблиця 2

Динаміка накопичення антитіл проти каліцивірусу в результаті імунізації тварин групспецифічним антигеном вірусу каліцивірозу, n=3

Доба імунізації	Титр антитіл (\log_2)		
	I	II	III
14	6,0±0,8	5,8±0,8	7,5±0,7
28	8,9±0,6	7,6±0,7	9,5±0,7

Максимальні титри антитіл виявляли після четвертої імунізації на 28-му добу у тварин першої і третьої груп 8,9 \log_2 та 9,5 \log_2 відповідно. У тварин другої групи, яким антиген вводили внутрішньом'язово, титр антитіл був найнижчий і складав 5,8–7,6 \log_2 .

Сироватки крові тварин контрольної групи були негативними (рис. 1).

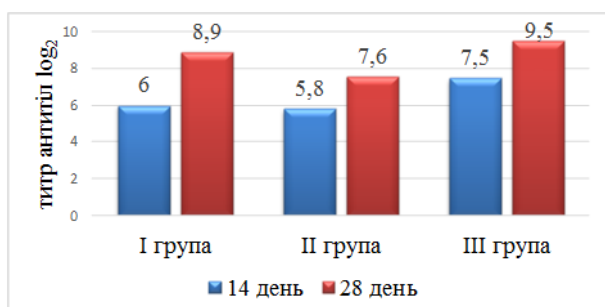


Рис. 1. Динаміка зростання титру антитіл

Таким чином, застосування в схемі гіперімунізації імуностимулюючого препарату «Імунофан» у комплексі з культуральним антигеном дало змогу отримати гіперімумну сироватку крові з високим титром антитіл до вірусу каліцивірозу.

Отже, проведені дослідження на кроликах дають можливість констатувати, що вони є оптимальними тваринами-донорами для одержання сироватки, які забезпечують високий рівень антитіл, простоту проведення та технологічність процесу одержання.

Також доведено, що комбіноване внутрішньошкірне і внутрішньом'язове введення антигену тваринам-продуцентам забезпечує кращий ефект при отриманні гіперімумної сироватки проти каліцивірусу, ніж застосування одного з них. Внутрішньошкірне введення антигенного препарату значно зменшує об'єм використаного імуногену та скорочує термін гіперімунізації.

В цілому була розроблена технологія одержання гіперімумної сироватки проти вірусу каліцивірозу, яка полягала у комбінованій імунізації кролів шляхом введення антигену внутрішньошкірно та внутрішньом'язово, що дозволило отримати гіперімумну сироватку з титром антитіл 9,5±0,7 \log_2 .

З метою одержання очищених імуноглобулінів класу G з одержаних сироваток крові кролів провели виділення глобулінової фракції.

У результаті проведених експериментів була розроблена методика виділення та очищення імуноглобулінів, принцип якої включає наступні етапи:

– центрифугування сироватки при 2 тис. об/хв. впродовж 20–30 хв.;

– дворазове переосадження сульфатом амонію 40 % насиченим, при цьому щоразу осад видаляли центрифугуванням. Після третього висалювання, розчиняли фосфатним буфером рН в об'ємі, що складає 10–25 % вихідного об'єму сироватки.

У фракціях, що одержані з гіперімумних сироваток шляхом осадження сульфатом амонію та гелпроникною хроматографією визначали загальний білок за Лоурі та специфічні імуноглобуліни в реакції нейтралізації з наступним розрахунком питомої активності антитіл в 1 мг білку.

У фракції загальних імуноглобулінів, одержаних після преципітації з специфічною сироваткою сірчанокислим амонієм насиченим до 40 % з наступною гелпроникною хроматографією на ультрагелі АсА–34, питома вага імуноглобулінів на 1 мг білкового розчину була вдвічі вищою у порівнянні з вихідною сироваткою.

6. Висновки

1. Була розроблена раціональна схема гіперімунізації тварин що включає комбіновану схему, що полягає у внутрішньошкірному та внутрішньом'язовому введенні антигену, з інтервалом між імунізаціями 7 діб. Застосування у схемі імуностимулюючого препарату «Імунофан», який забезпечує стабільне одержання високоактивних сироваток крові кролів проти вірусу каліцивірозу з активністю в РН від 6,0 \log_2 до 9,5 \log_2 , які можуть бути застосовані як з діагностичною так і лікувальною метою.

2. Розроблена технологія виділення імуноглобулінів класу G з одержаних сироваток шляхом преципітації сірчанокислим амонієм та гелпроникаючою хроматографією. Встановлено, що питома активність очищених препаратів у два рази вище питомої ваги імуноглобулінів вихідної сироватки, що має важливе значення для вдосконалення технології одержання імуноглобулінів для виробництва діагностичних та лікувальних препаратів.

Література

- Алиева, Е. В. Опыт получения иммунных сывороток для производства диагностических препаратов [Текст] / Е. В. Алиева, И. С. Тюменцева, Е. Н. Афанасьев, М. П. Лаврешин, Н. Е. Афанасьев, Е. А. Горобец и др. // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". – 2008. – № 1. – С. 11–15.
- Рахманина, М. М. Калицивирусная инфекция кошек: биологические свойства возбудителя, эпизоотология, специфические средства и методы профилактики [Текст]: автореф. дис. ... д-ра вет. наук / М. М. Рахманина. – М., 2005. – 47 с.

3. Пронин, А. В. Полипренилфосфаты как адьюванты, поляризирующие иммунный ответ в сторону Th1 [Текст] / А. В. Пронин, С. В. Ожерелков, А. В. Деева, А. В. Санин, А. Н. Наровлянский // Инфекция и иммунитет. – 2012. – № 3. – С. 645–650.
4. Poulet, H. Immunisation with a combination of two complementary feline calicivirus strains induces a broad cross-protection against heterologous challenges [Text] / H. Poulet, S. Brunet, V. Leroy, G. Chappuis // Veterinary Microbiology. – 2005. – Vol. 106, Issue 1-2. – P. 17–31. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.12.010
5. Мазур, Н. В. Розробка способу отримання антирабічної гіперімунної сироватки крові від кролів [Текст] / Н. В. Мазур, В. В. Недосеков, С. А. Ничик, І. М. Полупан // Ветеринарна біотехнологія. – 2016. – № 28. – С. 158–163.
6. Addie, D. Ability of antibodies to two new caliciviral vaccine strains to neutralise feline calicivirus isolates from the UK [Text] / D. Addie, H. Poulet, M. C. Golder, M. McDonald, S. Brunet, J. C. Thibault, M. J. Hosie // Veterinary Record. – 2008. – Vol. 163, Issue 12. – P. 355–357. doi: 10.1136/vr.163.12.355
7. Козленко, Т. Г. Оптимізація методів очистки та інактивації збудника каліцивірозу котів [Текст] / Т. Г. Козленко, В. В. Недосеков // Вісник Полтавської державної аграрної академії. – 2016. – № 4. – С. 92–94.
8. Radford, A. D. The challenge for the next generation of feline calicivirus vaccines [Text] / A. D. Radford, S. Dawson, K. P. Coyne, C. J. Porter, R. M. Gaskell // Veterinary Microbiology. – 2006. – Vol. 117, Issue 1. – P. 8–14. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.004
9. Волков, Г. Л. Технология получения иммуноглобулинов и технологические аспекты очистки [Текст] / Г. Л. Волков // Український біохімічний журнал. – 2006. – Т. 78, № 3. – С. 88–98.
10. Ашмарин, И. П. Статистические методы в микробиологических исследованиях [Текст] / И. П. Ашмарин, А. А. Воробьев. – Л.: Медгиз, 1962. – 180 с.

Дата надходження рукопису 14.02.2017

Козленко Тетяна Григорівна, аспірант, кафедра епізоотології та організації ветеринарної справи, Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: tatiana188981@gmail.com

Недосеков Віталій Володимирович, доктор ветеринарних наук, професор, кафедра епізоотології та організації ветеринарної справи, Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: nedosekov1@rambler.ru

Мартинюк Олександр Григорович, кандидат ветеринарних наук, доцент, кафедра епізоотології та організації ветеринарної справи, Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, Україна, 03041
E-mail: sandr70@gmail.com