

Розділ 9. Біотехнологія

УДК 619:616.98:579.873.21:615.373:616-076

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЗИТИВНОЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАРАТУБЕРКУЛЕЗА

Завгородний А.И., Позмогова С.А., Гирка М.А., Гончарова Н.В.

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков, e-mail: natali.v.goncharova@gmail.com

В статье представлены результаты изучения активности сывороток крови от кроликов, иммунизированных разными способами в РСК с коммерческим (Российская Федерация) антигеном, изучена динамика антителообразования.

Ключевые слова: паратуберкулез, серология, гипериммунизация, кролики, сыворотки крови, активность, титр антител.

Паратуберкулез – хроническая инфекция жвачных животных. В странах с развитой молочной отраслью животноводства инфицированность скота в стадах составляет от 20 % до 50 %. поголовье КРС в Украине официально считается благополучным по паратуберкулезу. Однако существует вероятность заноса возбудителя инфекции на территорию Украины с закупленным из других стран племенным скотом, а также с генетическим материалом. Общепринятыми диагностическими методами при паратуберкулезе являются реакция связывания комплемента (РСК) и реакция иммунной диффузии в агаровом геле (РИД) [1]. Эти реакции просты по выполнению, не требуют специального оборудования, но для их применения необходима достаточно активная и высокоспецифичная контрольная позитивная сыворотка, которую Украина закупает в России. В связи с глобальным распространением паратуберкулеза возникает потребность в разработке отечественных диагностических препаратов, в частности, контрольной сыворотки для определения активности антигенов в серологических реакциях. На сегодня, для получения положительных сывороток крови существуют различные схемы иммунизации животных, которые различаются способом введения антигена, его дозировкой, количеством введений, интервалом между инъекциями и временем отбора крови [2, 3, 4, 5, 6]. Большинство исследователей считают наиболее эффективным способом иммунизации внутривенное введение антигена, позволяющее в сравнительно короткий срок получить сыворотку крови с высоким титром антител. Однако при применении этого способа нередко развивается анафилактический шок, приводящий к гибели животных. В связи с этим при изготовлении положительных сывороток крови чаще используют другие парентеральные методы введения антигенов. Наибольшее предпочтение отдается подкожному и внутримышечному способам инъекционирования. Эффективность этих методов иммунизации значительно повышается при дробном введении антигена небольшими дозами в различные участки тела животного. При этом немаловажное влияние на степень антителообразования оказывают количество инъекций и интервалы между ними. Активность и специфичность сыворотки, получаемой при гипериммунизации животных, в значительной мере зависит от качества применяемого иммуногенного препарата (степени очистки, штамма *M. avium ssp. paratuberculosis* (MAP), способа его культивирования, состава питательной среды, на которой культивировали микроорганизм). Кроме того, при получении иммунной сыворотки для усиления антителообразования используют различного рода адъюванты.

Целью настоящей работы было разработать схему получения положительной контрольной паратуберкулезной сыворотки крови.

Материалы и методы. Для получения гипериммунных сывороток использовали здоровых кроликов массой 2,5–3 кг, которые на момент эксперимента не реагировали на внутрикожное введение туберкулинов (ППД) для млекопитающих и птиц. Для иммунизации было приготовлено 6 вариантов иммуногенных препаратов: на вазелиновом масле, montanide ISA-70 и физиологическом растворе из инактивированной бактериальной массы референтного штамма *M. Johnei* и эпизоотической культуры № 5809, выращенных на синтетической среде Рейда.

Опытных кроликов иммунизировали по 2 схемам: 1) 3-х кратное подкожное дробное введение иммуногенного препарата в возрастающей концентрации бактериальной массы – 20, 30, 30 мг/мл, с интервалом 7 дней; 2) 4-х кратное введение препарата в концентрации бактериальной массы – 5, 10, 20, 30 мг/мл. Для изучения динамики нарастания титра антител перед каждой последующей иммуностимуляцией из ушной вены отбирали 2 мл крови и исследовали в РСК и РИД. Через 14 дней после последнего введения кроликов обескровливали, отстоявшуюся сыворотку центрифугировали и разливали в стерильные флаконы. Кроме того, от здоровых кроликов была получена контрольная (негативная) сыворотка.

Активность полученных сывороток определяли в РСК в сравнении с паратуберкулезной сывороткой (СибНИВИ, РФ) с помощью коммерческого антигена для РСК (СибНИВИ, РФ), серия № 2, рабочий титр 1:100.

Результаты исследований. По результатам проведенных исследований установлено, что интенсивность иммуногенеза и активность полученной сыворотки зависели от дозы и кратности вводимого препарата, применяемого адъюванта и культуры *M. Avium*, из которых был изготовлен иммуногенный препарат, при этом иммуногенные свойства препарата не зависели от степени патогенности культуры. Кроме того, при изучении иммуногенеза в динамике установлено, что выявление комплементсвязывающих и преципитирующих антител отличается по срокам их обнаружения. Так, комплементсвязывающие антитела выявляли после 2-й иммуностимуляции, а преципитирующие – после тотального обескровливания. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, через 7 дней после первой иммунизации кроликов антитела в сыворотке крови не обнаруживали, что свидетельствовало о недостаточном антигенном раздражении и времени для иммуногенеза.

Таблица 1 – Динамика накопления титра антител в сыворотке крови кроликов, иммунизированных разными способами в РСК и РИД

Отбор крови для исследований	Схема I: 3-кратное введение – 20, 30, 30 мг/мл					
	Иммуногенный препарат из <i>M. Johnei</i>			Иммуногенный препарат из № 5809		
	На вазелин. масле	На montanide ISA-70	На ФР	На вазелин. масле	На montanide ISA-70	На ФР
Перед 2-й иммуниз.	-	-	-	-	-	-
Перед 3-й иммуниз.	1:320	1:180	-	1:60	1:40	-
Перед обескров.	1:400	1:220	1:20	1:180	1:140	1:10
РИД: перед обескров.	1:4	S не разв.	S не разв.	1:2	S не разв.	S не разв.
Схема II: 4-кратное введение – 5, 10, 20, 30 мг/мл						
Перед 2-й иммуниз.	-	-	-	-	-	-
Перед 3-й иммуниз.	1:80	1:20	-	-	-	-
Перед 4-й иммуниз.	1:260	1:180	1:10	1:20	1:10	-
Перед обескров.	1:360	1:220	1:20	1:80	1:80	1:10
РИД: перед обескров.	1:2	S не разв.	S не разв.	S не разв.	S не разв.	S не разв.

Примечание: ФР – физиологический раствор; S – сыворотка крови

Перед 3-им введением (через 7 дней после 2-го введения) иммуногенных препаратов по I схеме в сыворотке крови выявляли антитела на препараты из референтного штамма и из культуры № 5809 в титрах 1:320 и 1:60 на вазелиновом масле; 1:180 и 1:40 на montanide ISA-70, соответственно. По второй схеме иммунизации антитела в этот срок выявляли только на препараты, изготовленные из референтного штамма на адъювантах в титрах 1:80 (вазелиновое масло) и 1:20 (montanide ISA-70). У животных после повторного введения препаратов на физиологическом растворе положительных реакций не наблюдали ни в одном случае.

Перед обескровливанием (через 14 дней после 3-го введения) (схема I) титр антител на референтный штамм возрос до 1:400 и 1:220 (вазелиновое масло и montanide ISA-70), тогда как на эпизоотическую культуру № 5809 максимальный титр антител составлял 1:180 и 1:140. В этот же срок были выявлены антитела у животных, которым вводили препарат на физиологическом растворе в титрах 1:20 (реф. штамм) и 1:10 (№ 5809). Кроме того, при исследовании испытуемых сывороток в РИД через 18–48 часов после постановки реакции наблюдали образование одной или двух линий преципитации между центральной лункой с антигеном и периферическими лунками с сыворотками, причем сыворотки, полученные на препараты, изготовленные на адъювантах, реагировали в разведениях 1:4 (реф. штамм) и 1:2 (№ 5809).

Перед 4-ой иммунизацией по второй схеме у животных, которым вводили препараты из референтного штамма на адъювантах титр антител увеличился до 1:260 (вазелиновое масло) и 1:180 (montanide ISA-70), титры антител на препараты из культуры № 5809 находились на низком уровне – 1:20 (вазелиновое масло) и 1:10 (montanide ISA-70). В этот период положительную реакцию в титре 1:10 наблюдали на суспензию референтного штамма на физиологическом растворе.

После обескровливания (через 14 дней после 4-ой иммунизации) антитела на референтный штамм выявляли в титрах 1:360 (вазелиновое масло) и 1:220 (montanide ISA-70), на культуру № 5809 на адъювантах – 1:80, титр антител на препараты на физиологическом растворе составлял 1:20 (реф. штамм) и 1:10 (№ 5809). В РИД все испытуемые сыворотки образовывали линии преципитации.

В результате проведенных исследований было установлено, что наибольший титр антител (1:400) вырабатывается при 3-х кратной гипериммунизации кроликов иммуногенным препаратом,

изготовленным из референтного штамма MAP на вазелиновом масле. Несмотря на то, что эпизоотическая культура № 5809 являлась более вирулентной, максимальный титр антител в сыворотке крови у иммунизированного этой культурой кролика, был значительно ниже и не превышал 1:180. Кроме того, результаты исследований показали, что уровень накопления специфических антител зависел также от используемых адъювантов. Наибольшее стимулирующее действие на иммуногенез оказывали препараты на вазелиновом масле. Так, максимальные титры антител у иммунизированных кроликов с применением вазелинового масла составляли 1:400 при иммунизации штаммом *M. Johnei* и 1:180 при иммунизации культурой № 5809. Титры антител при применении montanide ISA-70 не превышали 1:180 и 1:140, соответственно. Сыворотки, полученные в результате иммунизации кроликов иммуногенным препаратом на физиологическом растворе, были малоактивными с титром антител не выше 1:20.

Дальнейшим этапом было сравнительное определение активности у полученной нами сыворотки с коммерческой. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Активность сыворотки крови кролика, иммунизированного по схеме I в сравнении с коммерческой сывороткой.

Разведения сывороток													
Сыворотка, полученная от кролика по схеме I									Коммерческая сыворотка				
1:10	1:40	1:80	1:280	1:320	1:360	1:400	1:440	1:480	1:10	1:40	1:80	1:120	1:160
#	#	#	#	#	#	+++	+	-	#	#	+++	++	-
Примечания:													
<ul style="list-style-type: none"> • Знаки «#» и «+++» – положительная реакция, 100 % и 75 % задержки гемолиза эритроцитов, соответственно; • Знаки «++» и «+» – отрицательная реакция, 50 % и 25 % задержки гемолиза эритроцитов, соответственно; • Знак «-» – отрицательная реакция, 100 % гемолиз эритроцитов. 													

Из результатов таблицы 2 видно, что активность сыворотки, полученной по разработанной нами схеме, гораздо выше (титр 1:400), чем у коммерческой сыворотки (титр 1:80).

Таким образом, 3-кратное подкожное (в три точки) введение кроликам эмульсии из референтного штамма MAP в концентрациях 20, 30, 30 мг/мл на вазелиновом масле с интервалом 7 дней, обеспечивает максимальное накопление титра антител в сыворотке крови.

Выводы. Разработанный метод гипериммунизации кроликов является наиболее эффективным и рациональным способом получения высокоактивной сыворотки крови для проведения серологического исследования в РСК на паратуберкулез.

Список литературы

1. OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. 2008. – (ch. 2.2.6, Paratuberculosis).
2. Григорьева, Н.И. Активность и специфичность сывороток от кроликов, гипериммунизированных микобактериями туберкулеза птичьего вида и возбудителем паратуберкулеза [Текст] / Н.И. Григорьева // Бюллетень НИИЭВ им. Я.Р. Коваленко. - М. - 1990. - Вып. 73-74. - С. 76-80.
3. Алиев, А.И. Фадеева Н.Г. Применение РНГА для диагностики паратуберкулеза животных [Текст] / А.И. Алиев, Н.Г. Фадеева // Сб. н. Работ Даг НИВИ. - 1976. - Т. № 8. - С. 82-86.
4. Лебедева, А.И. Получение гипериммунных сывороток при туберкулезе [Текст] / А.И. Лебедева // Материалы науч.-произв. конф. по болезням с/х животных и птиц. - Псков, 1968. - С. 160-164.
5. Новикова, М.П. Метод изготовления паратуберкулезной позитивной сыворотки для РСК [Текст] / М.П. Новикова // Сб. н. работ СибНИВИ. 1972. - Вып. 20. - С. 34-37.
6. Софонов, А.М. Сравнительное изучение схем иммунизации кроликов для получения специфических сывороток [Текст] / А.М. Софонов // Сб. н. Трудов MBA. 1980. - Т. 16. - С. 40-41.

PRODUCING A POSITIVE SERUM FOR SEROLOGICAL DIAGNOSTIC OF PARATUBERCULOSIS

Zavgorodniy A.I., Pozmogova S.A., Girka M.A., Goncharova N.V.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov

The aim of this work was to develop a scheme for producing a paratuberculosis blood serum for a positive control.

Materials and Methods:

- hyperimmunisation of healthy rabbits by the two schemes;
- the study of the dynamics of antibody increase in CFT and AGID;
- obtaining hyperimmune blood sera from rabbits after exsanguination;
- a comparative determination of the activity of the produced blood sera.

Results of investigations:

- immunogenesis intensity and activity of obtained blood serum depended on the dose and the frequency of injected drug, adjuvant and MAP strain used for drug preparation. The immunogenic properties of the drug did not depend on the pathogenicity of used strain;
- identification of the complement binding and the precipitating antibodies is different in the terms of their detection;
- the highest antibody titer (1:400) is set at 3-fold hyperimmunization of rabbits by immunogenic drug prepared from reference MAP strain diluted by the Vaseline oil;
- the activity of the positive serum obtained according to our scheme is much higher (titer 1:400) than in imported serum (titer of 1:80);
- 3-fold subcutaneous injection (in three places) of the emulsion of the reference MAP strain in concentrations of 20, 30 and 30 mg / ml diluted by the Vaseline oil with an interval of 7 days in rabbits provides the maximum accumulation of the antibody titer in the blood serum.

Conclusions. The developed method of rabbit hyperimmunization is the most effective and efficient way of producing the highly active blood serum for a serological diagnosis of paratuberculosis in CFT.

Keywords: paratuberculosis, serology, hyperimmunisation, rabbits, blood serum, serum activity, antibody titer.

УДК 576.535:575:[546.57+546.714-31]-022.532

ВПЛИВ НАНОЧАСТОК АРГЕНТУМУ ТА ДВООКИСУ МАНГАНУ НА ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ПОКАЗНИКИ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН FLK-BLV

Стегній М.Ю., Магац Д.Ю., Юрченко О.М.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, e-mail: stegniy@vet.kharkov.ua

У статті аналізується можливість використання нанотехнологій у ветеринарній практиці, а саме у біотехнологічному процесі культивування перещеплюваної культури клітин FLK-BLV та виготовлення лейкозного антигену. У дослідженнях використовували наступні методику: експрес-метод суправітального фарбування для визначення збереженості клітин, цитологічний контроль мітотичної активності та стабільності перещеплюваної культури клітин FLK-BLV, виготовлення препаратів хромосом для цитогенетичного аналізу з метою визначення змін хромосомного набору під впливом наночастинок, дослідження форм і кількості патологічних мітозів.

Дослідження цитогенетичних параметрів та мітотичної активності сублінії перещеплюваної культури клітин FLK-SBBL показали зміння кількості хромосом під впливом наночастинок двоокису Мангану. Модальний клас хромосом у контрольному варіанті становив 60, у варіантах під дією двоокису Мангану в розведеннях 1:20 та 1:100 – 56–58 та 54–56 відповідно. Під дією Аргентуму в розведенні 1:20 модальний клас становив від 56 до 60 хромосом.

У процесі цитологічних досліджень виявлено зміни мітотичної активності зі зміщенням піку МА за часом відносно до контролю. Основними формами патологічних мітозів, виявлених у процесі досліджень, були К-мітоз і пола метафаза, кількість яких була найбільшою на другу добу культивування майже у всіх варіантах. Крім того, виявлено негативний вплив наночастинок Аргентуму 1:20 (змінення морфології клітин) та двоокису Мангану (руйнування моношару) на дослідну культуру клітин.

Ключові слова: культура клітин FLK (fetal lamb kidney), наночастки металів, цитогенетичні параметри, мітотична активність, патологічні мітози.

Методи культур клітин на сучасному етапі розвитку широко використовуються у найбільш перспективних прикладних та фундаментальних дослідженнях в області ветеринарії, біології, вірусології, мікробіології, імунології, цитології та генетики.

Перещеплювана культура клітин FLK (fetal lamb kidney) на сьогодні займає лідируючу позицію серед клітинних продуцентів вірусу лейкозу великої рогатої худоби (BLV) [1]. Клітини ембріональної нирки вівці, хронічно інокульовані лейкоцитами-носіями вірусу лейкозу великої рогатої худоби (FLK-BLV), були отримані Van Der Maaten M.J., Miller J.M у 1976 році в США, штат Айова, у вигляді моношару в культуральному середовищі RPMI 1629 з 10 % ембріональної сироватки ВРХ [2, 3].

У Національному науковому центрі «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» зібрана Колекція культур клітин тваринного походження, яка становить національне надбання України з 2004 року. У цій Колекції зберігаються також 3 сублінії перещеплюваної культури клітин FLK-BLV: FLK-71, FLK-SBBL та FLK-50/100.

Останнім часом відбувається активний розвиток нанотехнологій та інтенсивне використання їх здобутків у всіх галузях виробництва, у тому числі біотехнологічній промисловості, медицині