УДК 619:620.3:616.98-006

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОФІЛАКТИЧНИХ ПРОТИЛЕЙКОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ВІВЦЯХ

Тонська Т.Г., к.вет.н.
Національний університет біоресурсів і природокористування України, м.Київ

Експериментально доведено на вівцях що при системному використанні інактивованої вакцини проти лейкозу великої рогатої худоби з попереднім уведенням специфічного олігорибонуклеопептиду, обумовлює в організмі овець активацію клітинної ланки імунітету та відносну толерантність гуморальної ланки до інактивованого антигену, що дає змогу диференціювати поствакцинальні антитіла від інфекційних.

Ключові слова: *низькомолекулярний поліпептид, вакцина, імуногенність, лейкоз великої рогатої худоби, вівці антитіла, імунітет.*

Постановка проблеми та аналіз останніх публікацій. У перше десятиліття після відкриття збудника лейкозу великої рогатої худоби вітчизняні [4, 7, 9] та іноземні [10, 13, 16] вчені теоретично й експериментально довели, що ефективно керувати епізоотичним процесом інфекції можна за умов вакцинопрофілактики. Зроблені за останні 40 років науковцями вагомі напрацювання, дали змогу розвинути зазначений напрямок та наблизитися до прикінцевого етапу створення та виробничої апробації вакцин проти лейкозу великої рогатої худоби [1, 2, 3 ,6, 7, 11, 14, 15]. Однак у зв'язку із об'єктивними та суб'єктивними чинниками, запропоновані препарати до цього часу не знайшли визнання та практичного застосування у системі протиепізоотичних заходів. Основними причинами такого стану є: по-перше, неврахування при конструюванні та технології використання імуногенів взаємовідносин паразит – господар; по-друге, відсутність методик диференціації поствакцинальних антитіл, які виявляються протягом 12–30 місяців після щеплення [3, 6], від антитіл інфекційного походження.

Отже, ці та інші проблеми є підставою для зміни методологічного підходу щодо системи використання специфічних препаратів при формуванні імунітету проти ретровірусної інфекції великої рогатої худоби.

Мета досліджень: вивчити вплив системного використання специфічного олігорибонуклеопептиду з активністю фактора переносу (СОФП) та інактивованої вакцини проти лейкозу великої рогатої худоби «Профілейк 3» на формування імунітету у овець, які є найсприйнятливішими до вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ).

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом дослідження слугували СОФП та експериментальна інактивована вакцина проти лейкозу ВРХ

«Профілейк 3». СОФП виділений зі спленоцитів овець-донорів, попередньо сенсибілізованих ВЛ ВРХ.

Вивчення системної дії комплексу препаратів СОФП та інактивованої вакцини проти лейкозу великої рогатої худоби «Профілейк 3» проводили на 3-х групах овець (n=3), вільних від інфекції ВЛ ВРХ. На першому етапі досліджень (1-100 доба) тваринам першої дослідної групи за 3 доби і у день першої інокуляції вакцини уводили підшкірно СОФП у дозі 1,0 $см^3$ з подальшою дворазовою імунізацією. Овець другої дослідної групи імунізували аналогічним імуногеном. Вівцям контрольної групи уводили 0,9 %-й розчин NaCl у відповідних об'ємах з інтервалом 7 діб. На другому етапі (101-290-доба) –вівцям всіх груп (n=3) підшкірно інокулювали 1,0 $см^3$ крові корови, хворої на лейкоз (51,0 Г/л лейкоцитів).

Використано клінічний, гематологічний імунологічний та молекулярно-генетичний методи досліджень. Стан імунної відповіді організму овець на СОФП, вакцину і інфіковану кров оцінювали за показниками гематологічних зрушень та концентрації в сироватці крові специфічних до ВЛ ВРХ антитіл у РІД. Відсутність провірусного геному ВЛ ВРХ підтверджували за результатами полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР).

Результати досліджень та їх аналіз. Упродовж всього періоду експерименту у досліджуваних тварин видимих змін клінічного стану, кількості еритроцитів і вмісту гемоглобіну в крові не виявлено. У овець першої дослідної групи на 3-тю добу після першого уведення СОФП кількість лейкоцитів у крові збільшилась у 1,35 раза за відсутності змін у показниках лімфоцитів, а на 3-тю добу після повторного уведення препарату та першої імунізації – у 1,70 раза. В наступний 20-добовий період досліджень кількісні показники лейкоцитів були в межах фізіологічної норми. У овець другої дослідної групи реакція гемопоезу на перше уведення вакцини була менш активною, ніж на друге. Кількість лейкоцитів крові збільшувалася до 10,00±3,2 Г/л і 12,4±0,4 Г/л відповідно з подальшим зниженням показника до фізіологічного рівня. На 14-у добу після імунізації відсоток лімфоцитів сягав 69,0±1,37 (перше уведення) і 71,0±1,77 (друге уведення).

Передімунізаційне уведення СОФП суттєво вплинуло на формування поствакцинальних антитіл. Як видно з табл. , у овець першої групи, на відміну від другої, специфічних антитіл до ВЛ ВРХ не виявляли впродовж 98 діб (перший етап досліду) (табл.).

У тварин другої групи через 50 діб середній титр антитіл становив 0,83±0,17 $\log_2$, а на 98-у добу у всіх овець наявність гуморальної ланки імунітету не виявлено. Короткостроковість прояву ознак протилейкозного імунітету за показниками РІД може бути обумовлена особливостями антигенних детермінант низькомолекулярних білків gp 51 і p 24 та інших складових. За Н.В. Медуніциним [5] відсутність циркулюючих антитіл не є доказом слабкого імунітету. При деяких інфекціях основну роль відіграють клітинні механізми захисту.

Таблиця

Концентрація специфічних антитіл (log_2) у сироватці крові овець за РІД (n=3)

Доба досліду	Перша дослідна група	Друга дослідна група	Контроль
За 3 доби до щеплення	-	-	-
	Уведення СОФП		
1	-	-	-
	Уведення СОФП + вакцинація	Вакцинація	Уведення 0,9 % р-н NaCl
3	-	-	-
7	-	-	-
	Вакцинація	Вакцинація	Уведення 0,9 % р-н NaCl
16	-	н (33%)	-
20	-	н (33%)	-
28	-	н (100%)	-
50	-	0,83±0,17	-
98	-	-	-
101	ПЛР негативна		
	Інфікування ВЛ ВРХ		
112	6,33±1,20	6,33±1,20	-

Примітка: н – позитивна реакція з нативним титром антитіл; - – негативна реакція

Підтвердженням наявності активного імунітету у тварин після імунізації є матеріали другого (190-добового) етапу досліджень. Дані досліджень наведені на рисунку свідчать, що у тварин імунізованих груп у перші дні після інокуляції вірусовмісного матеріалу формується особливий імунний статус, який на 11-ту добу (перше дослідження) після контакту зі специфічним патогеном виявлявся активною реакцією гуморальної ланки імунітету із середнім титром антитіл 6,33±1,20 log_2 (за РІД). У цей період кількісні показники лейкоцитів крові овець першої дослідної групи збільшилися всього у 1,22 раза, а у другої – не змінювалися.

Ознаки гуморальної ланки імунітету виявлялись інтенсивним накопиченням у сироватці крові високого рівня антитіл проти ВЛ ВРХ у перші 20–30 діб досліду (стадія активізації гуморальної ланки імунітету). У подальший період активність антитіл у крові імунізованих тварин динамічно знижувалася (стадія регресії антитілоутворення).

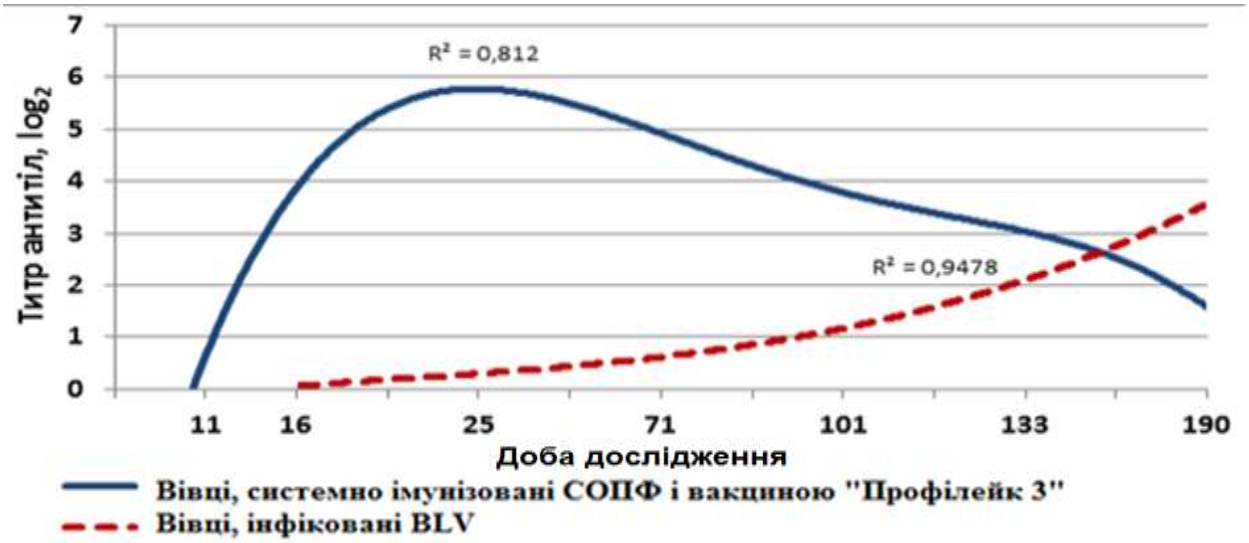

Рис. Титри антитіл сироватки крові овець різних фенотипових груп (лінії тренду)

На відміну від виявлених закономірностей антитілоутворення в організмі імунізованих тварин, у інтактних овець (контрольна група) після інфікування вірусом лейкозу динамічно підвищувалася концентрація антитіл, що свідчить про розвиток лейкозного процесу [10, 12].

Результати досліджень свідчать, що передвакцинне уведення тваринам СОФП зумовлює формування в імунній системі організму тварин попередню готовність до зустрічі з антигеном – феномен інформаційної пам'яті. Такий стан організму обумовлює формування специфічного імунітету при уведенні інактивованої вакцини проти лейкозу великої рогатої худоби «Профілейк 3» з наступним формуванням інформаційної пам'яті. Цей механізм можна уявляти, як пасивне перенесення з олігорибонуклеопептидом лімфоцитів донорів імунологічної пам'яті попередньо презентованого антигену до ефекторних клітин реципієнтів [8].У такому стані первинна імунна відповідь на імуноген у реципієнта СОФП може виявлятися формуванням триваложивучих клітин пам'яті, здатних активно реагувати на зустріч із специфічним антигеном.

Висновки:

1. Розроблена і апробована двостадійна система формування поствакцинального імунітету в організмі овець, яка полягає у дворазовому з інтервалом 3 доби підшкірному уведенні специфічного олігорибонуклеопептиду з активністю фактора переносу до антигенів вірусу лейкозу великої рогатої худоби у об'ємі 1 $см^3$ та подальшої дворазової з інтервалом 7 діб імунізації інактивованою вакциною проти лейкозу великої рогатої худоби «Профілейк 3», що обумовлює формування імунітету проти ВЛ ВРХ без прояву поствакцинальної фази антитільної імунної реакції на імунізуючий препарат.

2. Уведення вівцям, сенсибілізованим специфічним олігорибонуклеопептидом із активністю фактора переносу до антигенів вірусу лейкозу великої рогатої худоби та імунізованим інактивованою

вакциною проти лейкозу великої рогатої худоби «Профілейк 3» крові, хворої на лейкоз корови в дозі 1,0 $см^3$ (51,0 Г/л лейкоцитів) спричиняє на 11-у добу імунну відповідь з активністю антитіл у сироватці крові 6,33±1,20 log_2 та наступне динамічне зниженням титру антитіл на 190-у добу до 1,67±0,67 log_2 (період спостереження), що є ознакою зниження активності або призупинення функціонування ретровірусної інфекції. У інтактних овець (контроль) після інфікування, починаючи з 16 до 190 доби (періоду спостереження), динамічно підвищується вміст антитіл до 3,67±1,20 log_2, що характерно для розвитку лейкозного процесу.

Список використаних джерел:

1. Бусол В.А. Методические подходы к конструированию и использлванию вакцинных препаратов при ретровирусных инфекциях / В.А. Бусол, О.В. Шаповалова // Общая эпизоотология: иммунол., экол. и методол. пробл.: Материалы междунар. науч. конф. 20–22 сент. 1995 г. – Х.: ИЭКВМ. – 1995. - С. 396–398.
2. Иммуногенность рекомбинантного вируса осповакцины, экспрессирующего оболочечный гликопротеид вируса бычьего лейкоза / [А.Ф. Валихов, В.С. Кузьмичев, Л.А. Иванова и др.] // Труды ВИЭВ. – М. – 1991 – Т. 70. – С. 92–100.
3. Результати використання вакцини «Лейкозав» у профілактиці і боротьбі з лейкозом великої рогатої худоби / [А.І. Завірюха, Г.А. Завірюха,Т.Б. Гобка і інш.] // Міжв. темат. наук. зб. – 2003. – № 82. – С. 240–246.
4. Кукайн Р.А. Теоретические основы иммунопрофилактики лейкоза крупного рогатого скота / Р.А. Кукайн, Л.І. Нагаєва // Теорет. и практ. вопросы ветеринарии. – Тарту, 1983. – Т. 3. – С. 17–18.
5. Медуницин Н.В. Вакцинология / Н.В. Медуницин. – М. : Триада–Х, 2004. – 446 с.
6. Результати застосування у широкому виробничому досліді в системі чинних протилейкозних заходів вакцини проти лейкозу великої рогатої худоби / [Л. Нагаєва, В. Горжеєв, М. Павленко та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 1998. – № 5. – С. 19–22.
7. Иммунопрофилактика лейкоза крупного рогатого скота / [М.И. Парфанович, В.М. Жданов, А.М. Поверенный и др.] // Актуал. вопросы вет. вирусологии. – Казань, 1980. – С. 139–140.
8. Скибіцький В.Г. Оцінка та корекція клітинного імунітету у тварин: методичні вказівки для спеціалістів ветеринарної медицини, співробітників науково–дослідних і навчальних закладів, аспірантів і студентів факультету ветеринарної медицини / В.Г. Скибіцький, В.В. Столюк, Р.М. Чумак. – К.: НАУ, 2005. – С. 24.
9. Вакцинация крупного рогатого скота против инфекции вируса бычьего лейкоза / [В.П. Шишков, Р.А. Кукайн, Б.З. Иткин и др.] // Докл. ВАСХНИЛ. – 1979. – № 9. – С.24–26.

10.BLV p 24 expression in BLV infected cattle and detection BLV p 24 receptors in cattle afflicted with tumorous leucosis in vivo / H. Burkhardt, E. Ristau, S. Rosenthal, M. Miller // Acta Virol. – 1989. – Vol 33, № 5. – P. 410–416.

11.Protection of sheep against bovine leukemia virus (BLV) infection by vaccination with recombinant vaccina viruses, expressing NLV envelope glycoproteins: correlation of protection with CD 4 T–cell response to gp 51 peptides / [M. Gatei, H. Naif, S. Kumar et al.] // J. Virol. – 1993. – № 67. – P. 1803–1810.

12.Antibody titres in cattile clinically and subclinscally infected with bovine leukemia virus / J. Kono, H. Hatakeyama, H. Ishirawa, H. Sentsui // Vet. Mikrobioll. – 1981. –Vol. 6, № 2. – P. 167–170.

13.Miller J.M. Precipitating antibody to a internal antigen of the C–type virus associated with bovine limfosarcoma / J.M. Miller, C. Olson // J.Nat.Cancer Inst. 1974. – Vol.49, №5. – P. 1459–1469.

14.Cloning and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus gag gene in Iranian isolate / G. Nikbakht, M. Rabbani, M. Emmem, E. Rezatofighi // Int. J. Vet. Res. – 2010. – Vol. 4, № 4. – P. 253–258.

15.Peptidebased bovine leukemia virus (BLV) vaccine that induces BLV – Env specific Th–1 type immunity / K. Ohishi, H. Kabeya, H. Amanuma, M. Onuma // Leukemia. – 1997. – № 3. – P. 223–226.

16.Protection by vaccination against bovine leukemia virus infection in sheep / [Okuma M., Hodatsu N., Yamamoto et al.] // Am. J. of Vet. Res. – 1984. – №6. – P. – 1212–1215.

17.Protective effects of a live attenuated bovine leukaemia virus vaccine with deletion in the R3 and G4 genes / M. Reichert, G.H. Cantor, L. Willems, R. Kettmann // J. Gen. Virol. – 2000. – 81. – P. 965–969.

Тонская Т.Г. Исследования профилактических противолейкозных препаратов на овцах

Экспериментально доказано, что системное использование инактивированной вакцины против лейкоза крупного рогатого скота «Профилейк 3» с предварительным введением специфического низкомолекулярного полипептида, обуславливает в организме овец активизацию клеточного звена иммунитета и относительную толерантность гуморального звена к инактивированому антигену, что позволяет дифференцировать поствакцинальные антитела от антител, возникающих при инфекционном процессе.

Ключевые слова: инактивированная вакцина, олигорибонуклеопептид, фактор переноса, лейкоз, крупный рогатый скот, овцы, антитела, иммунитет

Tonska T.G. Research antileukemic prevention study on sheep

The developed system of complex use of inactivated vaccine against bovine leukemia with previous injection of specific oligoribonucleopeptide with activity of transfer factor activates in sheep organisms a cellular immunity and condition of relative humoral tolerance to inactivated antigen, allowing differentiating post-vaccine antibodies against infectious ones.

Keywords: inactivated vaccine, oligoribonucleopeptide, transfer factor, bovine leukemia, cattle, sheep, antibodies, immunity