

УДК 579.887.9:616.37-078

## МЕТОДИКА ОТРИМАННЯ ДІАГНОСТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ ПОЛІКЛОНАЛЬНИХ ПРОТИАНАПЛАЗМОЗНИХ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ

Семеренська Є.І.

Харківська обласна СЕС МОЗ України, лабораторія відділу особливо небезпечних інфекцій

Тимченко О.М.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України», лабораторія нових та маловивчених інфекційних захворювань (ЛНМІЗ), м. Харків

Анаплазмозна інфекція (AI) (синоніми: анаплазмоз, гранулоцитарний анаплазмоз людини – ГАЛ) – трансмісивне інфекційне захворювання людей та ссавців, що визивається облигатними внутрішньоклітинними патогенами – бактеріями роду *Anaplasma* і характеризується розвитком синдрому загальної інфекційної інтоксикації та специфічним враженням переважно білих клітин крові (найчастіше гранулоцитів) і значно рідше – макрофагів, еритроцитів та тромбоцитів [1-3].

В Україні до теперішнього часу тест-системи для імунологічної діагностики AI не виготовляються. Перші серологічно верифіковані випадки AI на території України здійснені співробітниками лабораторії трансмісивних вірусних інфекцій Львівського НДІ епідеміології та гігієни МОЗ України з використанням препаратів для твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA) з клітинами антигену *A. phagocytophilum*, виготовленими в National Center for Zoonotic, Vector-borne, and Enteric Disease, CDC (1600 Clifton Rd., Atlanta, GA 30333, USA) [4]. Тому актуальним науковим завданням було створення та проведення лабораторно-клінічного випробування вітчизняних експериментальних зразків РНІФ-тест-систем для діагностики AI шляхом виявлення в зразках досліджуваного матеріалу антигену (клітин, мікроколоній) збудника та визначення рівня (титру) протианаплазмозних антитіл у сироватці крові.

При створенні експериментальних зразків РНІФ-тест-систем для виявлення АнгAI (клітин і морул збудника AI) в зразках клінічного матеріалу лабораторією нових та маловивчених інфекційних захворювань ДУ «Інститут мікробіології та імунології АМН України» (ЛНМІЗ) був виготовлений експериментальний зразок протианаплазмозних імуноглобулінів кролячих (проти АнапIгКр) із поліклональних анаплазмозних сироваток отриманих від тварин, імунізованих повним корпускулярним анаплазмозним антигеном (ПК АнгAI).

В якості анаплазмозного антигену при розробці експериментальних зразків РНІФ-тест-систем ЛНМІЗ був використаний штам *Anaplasma marginale* ВІЭВ 1. Бактерійна ліофілізована маса інактивованої культури (виготовлена із 20 мл суспензії з концентрацією  $10^{12}$  клітин/мл) *A. marginale* ВІЭВ 1 отримана від академіка РАСХН, доктора ветеринарних наук, директора ВНДІВ ім. Я.Р. Коваленко М.І. Гулюкіна (м. Москва; <http://www.viev.ru>). Із ліофілізованої маси анаплазм була виготовлена вакцина для імунізації лабораторних тварин.

Анаплазмозна вакцина містить ПК АнгAI, який при введенні в організм лабораторних тварин індукує продукцію специфічних протианаплазмозних поліклональних антитіл (АнAI). Схема технологічного процесу виготовлення інактивованої анаплазмозної вакцини включає чотири послідовні стадії: розведення ліофілізованої бактерійної маси для утворення суспензії ПК АнгAI; очистка та стандартизація ПК АнгAI по концентрації корпускул антигену в об'ємі рідкої фази суспензії; фасування, маркування з зазначенням серії та контрольного номеру, пакування вакцини; перевірка вакцини на повноту інактивації і стерильність.

Ліофілізовану бактеріальну масу в оригінальній ємкості розчиняли стерильним 0,9 %-им NaCl в об'ємі вказаному виробником. Очистку ПГ АнгAI від дериватів еукаріотичних клітин здійснювали методом різношвидкісного центрифугування. Попеременно проведено три цикли низькошвидкісного центрифугування (при 500 об./хв. впродовж 3 хв., для подальшої роботи використовували супернатант) і високошвидкісного центрифугування (при 8000 об./хв. впродовж 10 хв., для подальшої роботи відбирали осад). Із осаду що утворився після останнього циклу центрифугування, готували стандартизовану суспензію шляхом його послідовного розведення забуференим (з рН=7,0) 0,075 М розчином NaCl, а визначення концентрації корпускул АнгAI проводили з допомогою камери Горяєва. Стандартизовані суспензії (з концентрацією корпускул ПК АнгAI ~  $10^9$  /мл) розливали по 10,0 мл в стерильні скляні флакони об'ємом 20 мл, щільно закривали гумовими пробками, заочували алюмінієвими ковпачками і маркували (етикетками, на яких вказували: найменування вакцини, номер серії, номер контролю, об'єм у флаконі, дату виготовлення (місяць, рік), термін придатності, умови зберігання, інформацію, що дані зразки вакцини є експериментальними і призначені для науково-дослідної роботи та поперевживальний надпис «Перед використанням збовтати!»). Додаткову стерилізацію вакцин здійснювали методом щадящої термоінактивації: флакони з розфасованою суспензією ПК АнгAI двічі (з перервою через добу) прогрівали при  $t^{\circ} = (60 \pm 5) ^{\circ}\text{C}$  впродовж 30 хв. Контроль стерильності (повноту інактивації) проводили шляхом висіву з 20 % (одного з п'яти вибірково вибраного флакону вакцини, в подальшому цей флакон вибраковували) по 0,2 см<sup>3</sup> суспензії паралельно в дві пробірки із поживними середовищами МПА, МПБ, агаром Сабуро для визначення контамінації бактеріальною і грибовою мікрофлорою (ГОСТ 28085-89) «Препарати біологічні. Методи бактеріологічного контролю». Крім того, для підтвердження повного знезараження анаплазм в зразках вакцини ставили біологічну пробу шляхом внутрішнь оперитонеального введення двом білим мишам вагою (16-18 г) по 0,5 мл препарату вакцин. Посіви на МПА і МПБ інкубували впродовж десяти діб при  $t^{\circ} = (35 \pm 0,5) ^{\circ}\text{C}$ , а на агарі Сабуро при  $t^{\circ} = (22 \pm 0,5) ^{\circ}\text{C}$ . За мишами, які отримали вакцину, спостерігали впродовж трьох тижнів. В подальших експериментах застосовували препарати вакцин, які були визнані стерильними - при вибірково висіві не було отримано росту мікроорганізмів на поживних середовищах і не відмічено захворювання та загибель тварин при постановці біологічної проби.

Для імунізації тварин в ЛНМІЗ виготовлена анаплазмозна вакцина в кількості п'ять флаконів по 10 мл, серія V.1/2009, KN 1V.

Зовнішній вигляд анаплазмозної вакцини. Однорідна, прозора рідина (у п'яти флаконах по 10 мл, закритих гумовими пробками і закритими алюмінієвими ковпачками та наклеєною відповідною етикеткою) із ледь білим опалесцюючим відтінком і незначним осадом білого кольору, який при струшуванні легко розбивається з утворенням однорідної мутної суспензії.

В склад вакцини входить: суспензія ПК АнгAI штаму *A. marginale* ВІЭВ 1 (наближено,  $10^9$  корпускул/мл), 0,075 М розчин NaCl до 100 %.

Вакцини зберігали в холодильнику при  $t^{\circ}=4-6^{\circ}\text{C}$  терміном до дванадцяти місяців.

Групу кролів (три тварини в групі) імунізували анаплазмозною вакциною двома циклами (в першому циклі дві ін'єкції, в другому – три ін'єкції) за такою схемою:

Перший цикл вакцинації:

- перша ін'єкція – 0,1 мл підшкірно (перша доба);
- друга ін'єкція – 0,5 мл підшкірно (четверта доба);

Другий цикл вакцинації (розпочали через п'ятдесят дві доби після останньої ін'єкції):

- перша ін'єкція – 0,5 мл підшкірно (перша доба другого циклу або п'ятдесят третя доба від першої ін'єкції першого циклу);
- друга ін'єкція – 0,5 мл внутрішньом'язово (шоста доба другого циклу або п'ятдесят вісьма доба від першої ін'єкції першого циклу);
- третя ін'єкція – 0,5 мл внутрішньовенно в крайову вену вуха (тринадцята доба другого циклу або шістдесят п'ята доба від першої ін'єкції першого циклу).

Пробний забір зразків крові у імунізованих тварин проводили на п'ятий день після останньої ін'єкції вакцини для контрольного визначення у зразках крові рівня АнтАІ методом РНІФ. При достатньому рівні специфічних антитіл із крайової вени вуха проводили два повторних (з інтервалом сім діб) відбори крові (близько 15-20 мл крові від кожної тварини за один відбір). Забрану кров в скляних або пластикових центрифужних пробірках (об'ємом на 50 мл) термостатували при  $t^{\circ}=(37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ . Згусток, що утворився, відокремлювали від стінки запаяною Пастерівською піпеткою, після чого ємкості витримували при  $t^{\circ} = 4-6^{\circ}\text{C}$  впродовж 12 годин. Потім пробірки врівноважували стерильним фізіологічним розчином і здійснювали центрифугування при 1000 об./хв. впродовж 15 хв. для відокремлювання сироватки від інших компонентів крові. Сироватку відбирали в стерильні флакони, додавали в якості консерванту 0,5 % (об'єм/об'єм) хлороформ і зберігали в холодильнику при  $t^{\circ}=4-6^{\circ}\text{C}$  до виділення глобулінової фракції.

Загальний об'єм анаплазмозної поліклональної сироватки, отриманої від трьох тварин імунізованих вакциною склав, наближено, 50 мл.

Для отримання протиАнапІgКр був застосований стандартний метод подвійного осадження  $\gamma$ -глобулінових фракцій поліклональних анаплазмозних сироваток сульфатом амонію (з  $\text{pH}=6,8-7,0$ ) при 50 %-ій насиченості суміші. З метою підвищення ефективності осадження проводили центрифугування суміші при 6000 об./хв. впродовж 20 хв. Супернатант відкидали, а осад розчиняли в 25 мл стерильної дистильованої води і очищали методом мембранного діалізу впродовж трьох діб (перші дві доби – проти дистильованої води, третю добу – проти забуференого фізіологічного розчину з  $\text{pH}=7,2$ ). Повноту очищення  $\gamma$ -глобулінових фракцій від сульфату амонію контролювали хіміко-аналітичним методом із використанням 10 %-го (маса/об'єм) розчину  $\text{BaCl}_2$ . Після завершення очищення препаратів  $\gamma$ -глобулінових фракцій до них додавали азид натрію до кінцевої концентрації 0,05 % (маса/об'єм) для запобігання мікробного проросту. Визначали об'єм отриманих зразків протиАнапІgКр, концентрацію білка спектрофотометричним методом (в режимі вимірювання максимумів поглинання ультрафіолетового світла при довжині хвилі 260 нм і 280 нм), титри специфічних (протианаплазмозних) і неспецифічних (гетерологічних) антитіл методом РНІФ із використанням стандартизованого і стабілізованого діагностичного ПК АнгАІ та гетерологічних антигенів (по відношенню до АнтАІ). Ретельно гомогенізували препарат протиАнапІgКр і об'ємом по 1,0 мл розфасовували та запаювали в скляні ампули, проводили їх маркування (вказували назву імунобіологічного препарату, серію і контрольний номер, об'єм в ампулі, термін придатності, умови зберігання). Загальний об'єм виготовлених протиАнапІgКр (СК1/2009, К№1) становить 20 мл.

Отриманий експериментальний зразок протиАнапІgКр за зовнішнім виглядом є помірно-каламутною, напівпрозорою, однорідною із незначною опалесценцією рідиною з сіро-білим відтінком, яка після струшування не містить помітних неозброєним оком включень і осаду.

Препарат являє собою колоїдний розчин в ФСБ (з  $\text{pH}=7,0$ )  $\gamma$ -глобулінової фракції протианаплазмозних поліклональних сироваток кролів, який містить в якості консерванту 0,05 % азиду натрію. Концентрація білку в препараті протиАнапІgКр становить  $(2,213\pm 0,077)$  мг/мл, робочий титр – 1:8.

Основними біологічними характеристиками якого є високий рівень специфічності, здатність вступати в імунологічні реакції із антигенами (клітинами і мікроколоніями) анаплазм, адсорбуючись на їх поверхні, що забезпечує отримання чіткої люмінесцентно-мікроскопічної картини для оцінки диференційних характеристик при відтворенні РНІФ.

### Список літератури

1. Васильева, И. С. Новые болезни, передаваемые иксодовыми клещами (Ixodidae). Эрлихиозы и анаплазмозы человека [Электронный ресурс] / И. С. Васильева / Режим доступа: <http://lib.2005.rat-info.ru/files/>.
2. Гратц, Н. Трансмиссивные инфекционные заболевания в Европе. Их распространение и влияние на общественное здравоохранение [Текст] / Норманн Гратц ; пер. с англ. // ВОЗ. – 2005. – С. 87-118.
3. Dumler, J. S. Anaplasma and Ehrlichia infection [Text] / J. S. Dumler // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2005. – Vol. 1063. – P. 361-373.
4. Білецька, Г. В. Гранулоцитарний анаплазмоз (ГАЛ) – нова природно-осередкова інфекція в Україні [Текст] / Г. В. Білецька, О. Ю. Новохатній, І. І. Бень // Матеріали науково-практичної конференції «Актуальні питання епідагляду за особливо небезпечними інфекціями, санатрона охорона території, біологічна безпека» – Іллічівськ, 8-10 вересня, 2009. – С. 122-123.

## PROCEDURE OF RECEPTION OF A DIAGNOSTIC PREPARATION POLYCLONAL ANTIANAPLASMOSIS IMMUNOGLOBULINS

*Semerenskaya E.I.,*

*Kharkov Regional Sanitary Epidemiological Station*

*Timchenko O.M.*

*SE «I.I.Mechnicov Institute of Microbiology and Immunology, AMS of Ukraine», Kharkov*

*Stages reception of a diagnostic preparation polyclonal antianaplasmosis immunoglobulins and its characteristic (specification) are presented in this article.*