



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 62118

(13) A

(51) 7 A61K39/395

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ ЕРИТРОЦИТАРНОГО ІМУНОГЛОБУЛІНОВОГО ДІАГНОСТИКУМУ ДЛЯ ЕКСПРЕС-ІНДИКАЦІЇ БОРЕЛІЙ В КЛІЩАХ

1

2

(21) 2002119442

(22) 27 11 2002

(24) 15 12 2003

(46) 15 12 2003, Бюл. № 12, 2003 р.

(72) Білецька Галина Вацлавівна, Лозинський Ігор Миколайович, Шоломей Михайло Володимирович, Семенишин Оксана Богданівна, Козловський Михайло Михайлович, Друль Оксана Стефанівна
(73) ЛЬВІВСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА ГІГІЄНИ МІНІСТЕР-

СТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ, Білецька Галина Вацлавівна

(57) Спосіб приготування діагностичного для експрес-індикації борелій в кліщах включає в себе одержання діагностичного для РИГА на основі імуноглобуліну, який відрізняється від існуючих тим, що вперше в якості сировини для імуноглобуліну використовується сироватка крові мишей, імунізованих антигеном борелій

Винахід відноситься до галузі медицини, а саме імунології, стосується лабораторної діагностики

Іксодові кліщові бореліози (ІКБ), або хвороба Лайма (ХЛ) - відносно нова нозологія, що офіційно реєструється в нашій країні з 2000р. Накопичені на даний час дані виявили важливу роль ХЛ в інфекційній патології населення і засвідчили існування в багатьох регіонах нашої країни чисельних щорічних випадків захворювання людей на Лайм-бореліоз. Тільки у Львівській області за даними офіційної реєстрації захворюваність ХЛ зросла від 0,48 у 2000р. до 1,57 у 2001р. В країнах, що межують з Україною, кількість "нових" свіжих випадків щорічно складає 5,7 на 100000 населення (Росія). Враховуючи це, а також високий процент хронізації та інвалідизації серед хворих на ХЛ, широкий спектр її клінічних проявів, актуальним завданням є виявлення природних вогнищ ХЛ на території України і оцінка їх епідемічної активності, що дасть можливість картування природних осередків, прогнозування епідситуації і створення системи епіднагляду за цією інфекцією. Оскільки основним показником напруженості (активності) природного осередку є рівень інфікованості збудником ХЛ основних переносників - іксодових кліщів, необхідним є надійний, але простий і доступний метод індикації борелій в кліщах-переносниках. В даний час для цього широко використовується метод мікроскопії

фіксованих, або витальних препаратів із кліщів. Тривала процедура розтину кожного кліща, видобування з нього кишківника і мікроскопічного обстеження обмежує проведення масових скринінгових досліджень. Необхідне суттєве збільшення об'єму лабораторних досліджень на ХЛ може бути реальним при наявності доступного і, одночасно, високоспецифічного і чутливого лабораторного тесту. Недосконалість сучасної системи виявлення інфікованих кліщів та вивчення умов циркуляції збудника ХЛ зумовлює необхідність пошуку прискорених ефективних методів лабораторної діагностики та розробки нових високочутливих діагностичних препаратів. На сучасному рівні індикація збудника ХЛ у розвинутих країнах здійснюється недоступними для нас за ціною методами - ПЛР та імуно-блотінгу. Використання більш дешевого і широко розповсюдженого методу - РИГА - потребує наявності в лабораторії відповідного устаткування і тест-системи, яка в Україні не виробляється.

В основу винаходу поставлено завдання виготовлення діагностичного для виявлення борелій в кліщах з допомогою реакції непрямой гемаглютинації (РНГА), якою володіє більшість спеціалістів практичних лікувально-профілактичних закладів. Не менш важливе значення має і той факт, що, на відміну від інших вищезгаданих методів, РНГА не потребує спеціального устаткування і може застосовуватись при широких скринінгових

(19) UA (11) 62118 (13) A

обстеженнях на ХЛ також в польових умовах

Таким чином, в основі винаходу є створення високочутливого та специфічного бореліозного діагностичного на основі імуноглобуліну, одержаного з імунної сироватки мишей з використанням для експрес-індикації борелій в кліщах методом РНГА. Дуже важливим є те, що виготовлений діагностичний препарат одночасно може бути використаний для лабораторної діагностики ХЛ у хворих методом реакції гальмування реакції непрямой геммаглютинації (РГНГА).

Перша стадія розробки включала одержання специфічної імунної сироватки. Імунна сироватка для виготовлення специфічного імуноглобуліну отримана шляхом багаторазової імунізації білих безпородних лабораторних мишей антигеном борелій *Borrelia burgdorferi*.

Винахідницький рівень досягається тим, що розроблений спосіб імунізації мишей призводить до одержання імунної сироватки з високим виходом імуноглобуліну, який володіє високоспецифічною дією.

Способи імунізації мишей ілюструються наступними прикладами.

Приклад 1 Групу дорослих білих мишей (20 самок вагою 18-22г) імунізували шляхом внутрішньочеревинного введення (ін'єкції) ім по 0,2мл завису вбитих борелій у фосфатному буфері (ФБФ). Проводили 4-разову імунізацію з інтервалами в 7 днів, після чого у мишей на 7, 14 і 21 день забирали кров з ретроорбітального сплетіння з дотриманням правил Директиви про захист тварин, що використовуються для дослідних і інших наукових цілей [1] і шляхом центрифугування протягом 10хв при 2000об/хв одержували імунну сироватку крові.

Приклад 2 Імунізацію мишей проводили за вище наведеною схемою, але в якості матеріалу для імунізації використовували суміш антигену В гаплі і вакциною БЦЖ в якості ад'юванту в рівних об'ємах (1:1).

Для визначення титру антитіл до борелій готували послідовні розведення одержаної сироватки крові з коефіцієнтом 2, починаючи з розведення 1:16 (1:16, 1:32, 1:64 і т.д.). Титрування сироватки проводили в непрямій реакції імунофлюоресценції (ІРІФ) [2].

Таблиця 1

Порівняльна оцінка титру специфічних бореліозних антитіл в сироватці, одержаній при імунізації мишей

| Матеріал для імунізації | Титр антитіл до борелій в крові мишей після імунізації через | | |
|-------------------------|--|--------|---------|
| | 7 | 14 | 21 день |
| Антиген | 1:128 | 1:512 | 1:512 |
| Антиген+БЦЖ | 1:256 | 1:1024 | 1:1024 |

На підґрунті одержаних даних оптимальною схемою імунізації білих безпородних мишей для одержання високоспецифічної сироватки була визначена 4-разова імунізація сумішшю бореліозного антигену з БЦЖ із забором крові через 14 днів після останньої імунізації.

Друга стадія розробки передбачала одержання з імунної сироватки імуноглобуліну і виготовлення імуноглобулінового діагностичного для РНГА.

Імунну сироватку для одержання імуноглобуліну прогрівали при температурі 56°C протягом 30хв, після чого фракціонували модифікованим риваноло-спиртовим методом [3,4,5], або перед фракціонуванням додатково обробляли відповідного (дивись нижче) виду еритроцитами. Одержаний імуноглобулін сенсibilізували фіксованими акролеїном еритроцитами гусей, барана, людини при двох значеннях (6,4 і 7,2) рН і двох режимах термообробки - 30хв при 56° С і 60хв при 37°C.

Приклад 1 Імунну сироватку прогрівали при температурі 56°C протягом 30хв і центрифугували 5хв при 2000об/хв. Центрифугат обробляли еритроцитами барана з розрахунку 0,1мл на 1,0мл сироватки (1:10) центрифугували 10хв при 2000об/хв, після чого визначали об'єм центрифугату. Оброблену сироватку фракціонували рива-

ноло-спиртовим методом. В одержаному імуноглобуліні визначали концентрацію білку спектрофотометрично при довжині хвилі 280nm. Імуноглобулін сенсibilізували обробленими таніном еритроцитами барана при рН 7,2 в термостаті при температурі 37°C протягом 60хв.

Приклад 2 Імунну сироватку прогрівали при 56°C протягом 30хв і центрифугували 5хв при 2000об/хв. Оброблену сироватку фракціонували риваноло-спиртовим методом. В одержаному імуноглобуліні визначали концентрацію білку спектрофотометрично при довжині хвилі 280nm. Імуноглобулін сенсibilізували обробленими таніном еритроцитами барана при рН 7,2 в термостаті при температурі 37°C протягом 60хв.

Приклад 3 Імунну сироватку прогрівали при температурі 56°C протягом 30хв і центрифугували 5хв при 2000об/хв. Оброблену сироватку фракціонували риваноло-спиртовим методом. В одержаному імуноглобуліні визначали концентрацію білку спектрофотометрично при довжині хвилі 280nm. Імуноглобулін сенсibilізували обробленими таніном людськими еритроцитами при рН 6,4 в термостаті при температурі 56°C протягом 30хв.

Ефект сенсibilізації і встановлення оптимальної концентрації імуноглобуліну визначали в РНГА (таблиця 2).

Таблиця 2

Характеристика бореліозного еритроцитарного імуноглобулінового діагностикуму за основними параметрами* при різних умовах приготування

| Ig | Імуноглобулін оброблено прогріванням, еритроцитами і плазмою крові | | | | | | | | | | | | Імуноглобулін оброблено прогріванням | | | | | | | | | | | |
|-------------|--|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------------------------------------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Еритроцити | Баранячі | | | | Людські | | | | Гусячі | | | | Баранячі | | | | Людські | | | | Гусячі | | | |
| pH | 6 4 | | 7 2 | | 6 4 | | 7 2 | | 6 4 | | 7 2 | | 6 4 | | 7 2 | | 6 4 | | 7 2 | | 6 4 | | 7 2 | |
| t°/час (хв) | 56°/30 | 37°/60 | 56°/30 | 37°/60 | 56°/30 | 37°/60 | 56°/30 | 37°/60 | 56°/30 | 37°/60 | 56°/30 | 37°/60 | 56°/30 | 37°/60 | 56°/30 | 37°/60 | 56°/30 | 37°/60 | 56°/30 | 37°/60 | 56°/30 | 37°/60 | 56°/30 | 37°/60 |
| Д | 1 5 | 1 0 | 1 0 | 0 5 | 1 5 | 2 0 | 2 0 | 1 5 | 3 0 | 2 5 | 2 5 | 2 5 | 0 5 | 0 5 | 0 5 | 0 5 | 1 0 | 0 5 | 1 0 | 0 5 | 2 0 | 2 0 | 2 5 | 2 5 |
| К | - | + | - | - | + | - | - | - | ++ | ++ | ++ | + | - | - | - | - | ± | - | ± | - | ++ | ++ | ++ | ++ |
| КВСА | ± | + | - | - | - | ± | + | - | ++ | ++ | ++ | + | + | - | - | - | ± | - | ± | + | +++ | ++ | ++ | ++ |
| | - | + | ± | - | - | - | + | - | ++ | ++ | ++ | + | ± | + | ± | - | + | - | ± | + | ++ | +++ | + | ++ |
| | ± | - | - | ± | + | - | ± | ± | ++ | ++ | +++ | ++ | ± | ± | - | - | + | - | ± | - | ++ | +++ | ++ | +++ |
| КВАГС | + | - | ± | - | + | + | ± | - | ++ | ++ | +++ | + | - | - | - | - | - | + | + | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| | + | - | ± | ± | + | - | + | ± | ++ | ++ | +++ | + | ± | - | ± | - | ± | - | ± | - | +++ | +++ | ++ | +++ |
| | + | - | + | - | - | ± | ++ | - | ++ | ++ | +++ | ++ | - | - | - | - | + | - | - | ± | +++ | +++ | ++ | +++ |

* Примітка

Д - мінімальна концентрація (мг/мл) імуноглобуліну (гемосенситину), яка в РНГА дала позитивний результат (++++)

К - контроль специфічності з гомолопчною (імуною) сироваткою

КВСА - контроль на відсутність спонтанної аглютинації

КВАГС - контроль на відсутність аглютинації з гомолопчною (імуною) сироваткою

Згідно одержаних даних найвищою сенсibiliзуючою активністю для одержання імуноглобулінового діагностикуму володіють еритроцити барана, а оптимальний результат процесу сенсibiliзації досягається термообробкою суміші "еритроцити + імуноглобулін" протягом 60хв при 37°C і pH 7,2 без попередньої обробки імуноної сироватки еритроцитами

Для порівняльної характеристики і оцінки ак-

тивності, специфічності і чутливості РНГА з виготовленим діагностичним препаратом в якості прототипу використовували непряму реакцію імунофлюоресценції з корпускулярним бореліозним антигеном (таблиця 3) Обстежували суспензію, виготовлену згідно із загально прийнятою методикою [6] з 10екз (одна проба) кліщів Ixodes ricinus

Таблиця 3

Порівняння ефективності РНГА, нРІФ як методів індикації В burgdorferi в кліщах

| Проби кліщів за №№ | Результат виявлення борелій | |
|--------------------|-----------------------------|------|
| | РНГА | нРІФ |
| 1 | + | + |
| 2-8 | - | - |
| 9 | + | - |
| 10 | + | + |
| 11-28 | - | - |
| 29 | + | + |
| 30-36 | - | - |

Таким чином, проведені дослідження вперше дозволили одержати вгичизняний імуноглобуліновий діагностикум для індикації борелій в кліщах методом РНГА, яка за ефективністю не поступається нРІФ Виявлені властивості одержаного діагностичного препарату дозволяють пропонувати вищезгаданий спосіб з метою одержання високоспецифічного діагностичного препарату для експрес-індикації борелій в кліщах

Джерела інформації

1 Захист тварин, що використовуються для дослідних і інших наукових цілей // Директива Європейського Союзу та Всесвітньої організації охорони здоров'я №86/381/ЕЕС від 24 12 1989р

2 Методические указания по эпидемиологии, диагностике, клинике и профилактике болезни Лайма / под ред проф Э И Коренберга - Москва МЗ СССР, 1991 -С 26-29

3 Horejsi I O ucinku nvanilu na bilkoviny krevniho sera // Cas Lek Cesk -1952 -№91 -S 24-25, 704-707

4 Губенко ТЛ Риванол-спиртовой метод получения гамма-глобулина из плацентарной сыворотки Труды Одесского НИИЭМиГ - Одесса - 1960 -С 35-39

5 Сравнительное изучение препаратов антимфоцитарного иммуноглобулина, полученных различными методами / Ступина Э В, Про-

хоров А В , Арепьева А А , Борзенок Л Ф // Печеные сывороточные препараты - Москва, 1976 - С 134-141

6 Громашевский В Л Методы изоляции арбовирусов // Арбовирусы Сб науч трудов - Москва, 1986 - С 90-93