

ВЕТЕРИНАРИЯ

УДК: 619:616.988:75:636.22/28

И.Я. Строганова

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК К РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОМУ ВИРУСУ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Представлены результаты исследований по подбору биологической системы для получения специфических гипериммунных сывороток к респираторно-синцициальному вирусу крупного рогатого скота.

Ключевые слова: респираторно-синцициальный вирус крупного рогатого скота, гипериммунные сыворотки, белые мыши, морские свинки, бараны, кролики.

I. Ya. Stroganova

BIOLOGICAL SYSTEMS FOR PRODUCTION OF THE SPECIFIC HYPERIMMUNE SERUM TO THE CATTLE RESPIRATORY-SYNCYTIAL VIRUS

The research results on the biological system selection in order to produce the specific hyperimmune serum to the cattle respiratory - syncytial virus are given.

Key words: cattle respiratory - syncytial virus, hyperimmune serum, white mice, guinea pigs, sheep, rabbits.

Введение. В настоящее время в России возрастает удельный вес хозяйств по производству молока. Высокая молочная продуктивность коров часто сопровождается нарушением обмена веществ, что приводит к активизации различных инфекционных агентов [1,2].

Широкое распространение в молочных хозяйствах получили респираторные болезни животных [3,4].

Одним из этиологических агентов данной патологии является респираторно-синцициальный вирус крупного рогатого скота (РСВ КРС), относящийся к семейству Paramyxoviridae рода Pneumovirus. Во многих зарубежных странах его относят к числу наиболее важных патогенов молочного скота [5,6].

Первые сообщения о РСИ КРС в нашей стране относятся к 1975 году [7].

Изучение этой инфекции длительное время сдерживалось из-за высокой лабильности вируса и слабой его способности к размножению в культурах клеток, что, в свою очередь препятствовало разработке диагностических препаратов.

При разработке и применении диагностических тест-систем РНГА и РН необходимо наличие положительного контроля, то есть специфических сывороток к РС-вирусу крупного рогатого скота.

Цель исследований. Подбор биологической системы для получения специфических гипериммунных сывороток к РСВ крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследований. Для получения специфических сывороток использовали биологические системы: белых мышей линии BALB/C; морских свинок; баранов и кроликов.

Гипериммунизацию проводили культуральной вируссодержащей суспензией и концентрированным очищенным вирусом штамма «РС-Б» РС-вируса крупного рогатого скота.

Вирус культивировали в перевиваемых линиях клеток: почки эмбриона овцы (FLK); почки теленка (Т-1); почки зеленой мартышки (46/47); почки теленка (ПТ).

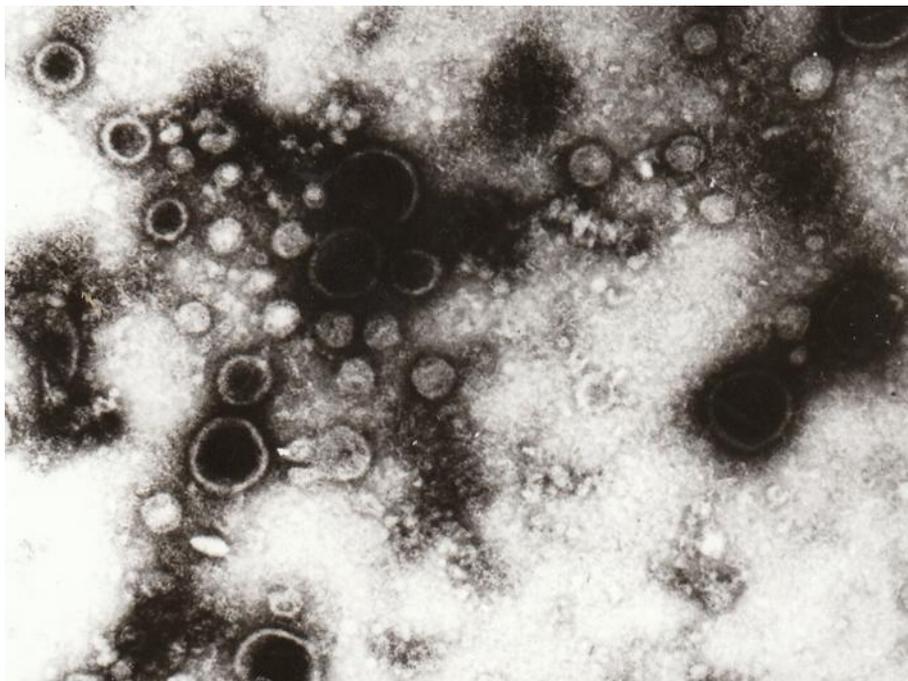
Для культивирования вируса применяли питательные среды Игла, Игла MEM с добавлением 2%-й фетальной сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков по 100 ЕД/мл.

Инфекционную активность вируса определяли титрованием в чувствительной культуре клеток по цитопатическому действию. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча (1937). Концентрировали и очищали РС-вирус по методу M.Trudel et al.[8]. Электронную микроскопию осуществляли методом негативного контрастирования. Иммунизировали белых мышей линии BALB/c и морских свинок с учетом схемы, предложенной Л.Н. Астаховой и М.Г. Брайнингер [9].

Активность полученных гипериммунных сывороток определяли в реакции нейтрализации (РН) и реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). РН ставили по общепринятой методике, РНГА в соответствии с наставлением.

Результаты исследований и их обсуждение. Гипериммунизация белых мышей линии BALB/c вирусосодержащей культуральной суспензией РСВ с титром инфекционности 4,0 Ig ТЦД 50/мл желаемых результатов не принесла. Поэтому в дальнейшем с этой целью использовали концентрированный и очищенный препарат РС-вируса по методу M. Trudel et al. [8].

Вирус концентрировали полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000) с последующим ультрацентрифугированием в 20–60%-м градиенте плотности сахарозы и хранили при минус 70°C. Контроль препарата осуществляли электронной микроскопией (рис.).



Препарат концентрированного и очищенного вируса. Негативное контрастирование. Увеличение 30000

Иммунизировали морских свинок с учетом схемы, предложенной Л.Н. Астаховой и М.Г. Брайнингер [9]. Полученный РС-вирусный антиген вводили интраназально четыре раза по 0,2 мл в каждый носовой ход с интервалом в 7 дней. Сыворотку от животных получали через 14 дней после последней иммунизации.

В сыворотках крови морских свинок до иммунизации антител к РС-вирусу крупного рогатого скота в РНГА не обнаруживали.

Из полученных данных следует, что концентрированный и очищенный препарат вируса «РС-Б» не обладал ярко выраженной антигенной активностью для морских свинок при указанном способе иммунизации. На его введение у животных синтезировались вируснейтрализующие антитела в разведениях 1:4 – 1:16 и средний титр составил $2,22 \pm 0,11 \text{ Ig}_2$.

Учитывая недостаточный титр антител в полученных сыворотках на мышах и морских свинках, необходимо было подобрать другую биологическую систему для получения специфических сывороток к РСВ КРС. По имеющимся данным Г.Д. Метревели [10], для получения гипериммунных сывороток к штамму «М-82» РСВ КРС автор использовала телят, овец, коз, кроликов и морских свинок.

В наших исследованиях для получения гипериммунных сывороток мы использовали баранов и кроликов (табл.).

Перед введением вируса штамма «РС-Б» РСВ КРС исследовали сыворотки крови баранов и кроликов в РНГА на наличие антител к РСВ и получили отрицательные результаты.

Первый раз барана иммунизировали культуральной вирусосодержащей суспензией с титром вируса 3,0–4,0 Ig ТЦД_{50/мл}, что желаемых результатов не принесло. Затем использовали концентрированный препарат РСВ КРС с 5%-м полиэтиленгликолем с последующим центрифугированием при 6,5 тыс. об/мин в тече-

ние 40 мин, который вводили с адъювантом Фрейнда 1/1. Иммунизировали дважды, вводили препарат по 20 мл внутримышечно с интервалом 14 дней. В дальнейшем иммунизировали трижды с интервалом в 14 дней. Через две недели после последней иммунизации брали кровь для получения сыворотки, которую исследовали в РНГА и РН. Титр антител к РСВ КРС составил $11,02 \pm 0,05$ Ig₂ и $6,08 \pm 0,09$ Ig₂ соответственно.

Титры антител в сыворотках крови баранов и кроликов, гипериммунизированных РС-вирусом крупного рогатого скота (n=3)

Биологические системы	Количество	Титры антител Ig ₂ M±m; P<0,05	
		РНГА	РН
Бараны:			
до иммунизации	3	-	0
осле иммунизации	3	$11,02 \pm 0,05$	$6,08 \pm 0,09$
Кролики:			
до иммунизации	3	-	0
после иммунизации	3	$10,05 \pm 0,07$	$5,38 \pm 0,16$

Примечание: -- не выявлены антитела; 0 – не исследовали.

Кроликов гипериммунизировали трижды: с интервалом 14 дней вводили препарат концентрированного вируса, обработанного ультразвуком с адъювантом Фрейнда 1/1 по 2 мл внутримышечно. Через две недели после последней иммунизации брали кровь, получали сыворотку и исследовали в РНГА и РН, титр антител составил $10,05 \pm 0,07$ Ig₂ и $5,38 \pm 0,16$ Ig₂ соответственно.

Выводы. Были подобраны биологические системы для получения специфических гипериммунных сывороток к РСВ КРС – бараны и кролики, на них получали сыворотки с титром антител в реакции нейтрализации $6,08 \pm 0,09$ Ig₂ и $5,38 \pm 0,16$ Ig₂, которые и использовали в дальнейшей работе.

Литература

1. Шахов А.Г., Самохин В.Т. Нарушение обмена веществ у стельных коров // Мат-лы круглого стола отд. вет. медицины РАСХН. – М., 2000. – С. 10–14.
2. Федоров Ю.Н. Иммунный статус и инфекционные болезни новорожденных телят и поросят // Ветеринария. – 2006. – № 11. – С. 3–5.
3. Глотова Т.И. Инфекционный ринотрахеит и вирусная диарея крупного рогатого скота (диагностика, молекулярно-биологические свойства возбудителей, эффективность противовирусных препаратов): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Новосибирск, 2006. – 39 с.
4. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Респираторные болезни телят вирусно-бактериальной этиологии // РАСХН, Сиб. отд-ние, ИЭВСиДВ. – Новосибирск: Агрос, 2008. – 258 с.
5. Larsen L.E., Tjornehoj K., Viuff B. Extensive sequence divergence among bovine respiratory syncytial viruses isolated during recurrent outbreaks in closed herds // Journal of Clinical Microbiology. – 2000. – Vol. 38. – P. 4222–4227.
6. Brodersen B.W. Bovine respiratory syncytial virus // Vet Clin North Am Food Anim. Pract. – 2010. – Vol. 26. – P. 323–333.
7. Гуненков В.В., Халенев Г.А., Сюрин В.Н. Респираторно-синцитиальная инфекция // Животноводство и ветеринария. – М., 1975. – Т.8. – С. 70–76.
8. Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus / M. Trudel [et al.] // Arch. Virol. – 1989. – Vol. 107. – P. 141–149.
9. Астахова Л.Н., Брайнингер М.Г. О методах иммунизации пригодных для серийного приготовления диагностических сывороток к РС-вирусу // Вопр. этиологии, эпидемиологии, патогенеза и диагностики вирусных заболеваний: сб. – Свердловск, 1976. – С. 3–9.
10. Метревели Г.Д. Биологические свойства вируса и серологическая диагностика РС-инфекции крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1989. – 19 с.

