

На правах рукописи

УДК619:616.98:578.83.31-076-084.]:636:612.017.11/.12

Амиров Акмал Холмуродович



**ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ В ДИАГНОСТИКЕ
ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

16.00.03 — ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Смоленск - 2004

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Смоленской научно-исследовательской ветеринарной станции ГНУ Смоленского НИИСХ Россельхозакадемии

- Научный руководитель: доктор ветеринарных наук,
профессор
Петр Альбинович Красочко
- Научный консультант: доктор ветеринарных наук,
старший научный сотрудник
Олег Георгиевич Новиков.
- Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук,
старший научный сотрудник
Виктор Васильевич Куриннов
(ГНУ ВНИИВВиМ, г. Покров)
- доктор ветеринарных наук,
профессор
Владимир Александрович Мищенко
(ФГУ ВНИИЗЖ, п. Юрьевец)

Ведущая организация: ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии

Защита диссертации состоится 4 июня 2004 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 006.003.01 при ГНУ Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии по адресу: 601120, Владимирская обл., Покров, ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Автореферат разослан «14» апреля 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук Савукова В.Я.

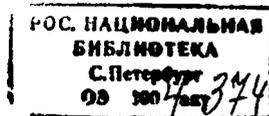
1. Общая характеристика работы

Актуальность темы

Специализация молочного и мясного скотоводства способствует более рациональному использованию в практике достижений науки. Однако интенсификация животноводства ставит ряд порой трудноразрешимых проблем перед ветеринарной медициной в плане эффективной системы профилактики инфекционных заболеваний, поражающих различные возрастные группы крупного рогатого скота, что может быть обусловлено высокой концентрацией поголовья на ограниченной площади, нарушением микроклимата, неполноценным кормлением, технологическими стрессами и другими условиями. Вследствие этого, появляется значительное количество особей, особенно среди молодняка, с ослабленной резистентностью, поэтому возрастает вероятность возникновения инфекционных болезней и повышается роль бактерио- и вирусносительства.

За последние годы в хозяйствах Смоленской области, у клинически здоровых животных в сыворотке крови обнаруживаются антитела к вирусам ВД КРС (вирусной диареи), что связано с вирусносительством, которое приводит к неконтролируемому распространению возбудителя инфекции. До сих пор ветеринарные специалисты не вооружены надежными способами выявления латентной формы ВД КРС. Однако ВД КРС в России практически не изучена, особенно в проявлении эпизоотического процесса. Ранняя диагностика, и своевременное выявление скрытых вирусносителей являются важным фактором в оздоровлении хозяйств от ВД КРС и предупреждения распространения инфекции.

Для успешного осуществления комплекса противоэпизоотических мероприятий большое значение имеют экспресс-диагностика и достоверность полученных результатов. Методы, имеющиеся в арсенале ветеринарных лабораторий, недостаточно эффективны для экспресс-диагностики ВД КРС из-за низкой их чувствительности и производительности, продолжительности анализа, что



является сдерживающим фактором принятия срочных мер и проведения эпизоотологического мониторинга.

Очевидна необходимость разработки и усовершенствования высокочувствительных и автоматизированных методов лабораторной диагностики вирусной диареи КРС. Наиболее перспективными для этой цели по нашему мнению являются методы на основе твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА), который продемонстрировал высокую эффективность для диагностики и серологического мониторинга инфекционного ринотрахеита КРС, парагриппа-3. Указанные методы позволяют в течение короткого времени исследовать большое количество проб биологического материала для детекции как антигенов возбудителей, так и специфических антител.

Необходимость совершенствования и внедрения в лабораторную диагностику вирусной диареи крупного рогатого скота высокоэффективных методов являются актуальной проблемой для ветеринарной медицины, что и послужило основанием для выбора темы диссертационной работы.

Цель и задачи исследования

Целью настоящих исследований являлась разработка и усовершенствование средств и методов лабораторной диагностики вирусной диареи крупного рогатого скота и мониторинг болезни в хозяйствах Смоленской области.

Для выполнения указанной цели было необходимо выполнить следующие задачи:

1. Изучить распространение вирусной диареи крупного рогатого скота и этиологию энтеритов телят, заболеваемости коров маститами и эндометритами в хозяйствах Смоленской области.
2. Исследовать роль респираторной и желудочно-кишечной патологии в падеже и выбытии молодняка КРС в хозяйствах Смоленской области.
3. Разработать и создать иммунореагенты и методы ТФ ИФА для диагностики ВД КРС путем обнаружения специфических антигенов возбудителя в патологическом материале и специфических антител к возбудителю болезни в сыворотке крови животных, молоке и молозиве коров.

4. Усовершенствовать схему лабораторной диагностики вирусной диареи крупного рогатого скота с включением ТФ ИФА.

5. Провести серологический мониторинг вирусной диареи крупного рогатого скота в хозяйствах Смоленской области с использованием ТФ ИФА.

Научная новизна

Усовершенствована схема получения гипериммунных сывороток против вирусной диареи крупного рогатого скота, отработаны методы отбора и подготовки проб молока для исследования в ИФА.

Впервые был проведен иммунологический мониторинг вирусной диареи крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Смоленской области, что позволило уточнить эпизоотологическую ситуацию, сроки циркуляции колостральных и поствакцинальных антител и определить их диагностическое значение.

Практическая значимость

Усовершенствованные нами методы диагностики диареи крупного рогатого скота, изложенные в «Методических рекомендациях по использованию иммуноферментного анализа для выявления антител класса Ig G к вирусу диареи крупного рогатого скота», внедрены в работу Смоленской областной ветеринарной лаборатории и Научно-исследовательской ветеринарной станции.

Всего в течение 1999-2003 гг. при проведении диагностических исследований в указанных учреждениях исследовано 457 проб материалов от больных коров и телят 1-6 месячного возраста. Выполнено более 700 экспертных исследований.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Причины заболеваемости и падежа молодняка КРС при болезнях респираторной и желудочно-кишечной этиологии, заболеваемости коров маститами и эндометритами в хозяйствах Смоленской области.

2. Характеристика иммунореагентов и методов диагностики вирусной диареи крупного рогатого скота, разработанных на основе твердофазного иммуноферментного анализа для обнаружения специфических антигенов возбу-

дителя в патологическом материале и специфических антител к возбудителю болезни в сыворотке крови КРС, молозиве и молоке коров.

3. Усовершенствованная схема лабораторной диагностики вирусной диареи крупного рогатого скота, основанная на применении методов твердофазного иммуноферментного анализа.

4. Распространение вирусной диареи крупного рогатого скота в хозяйствах Смоленской области, установленное с использованием разработанных методов твердофазного иммуноферментного анализа.

Личный вклад соискателя

Представленные в диссертационной работе экспериментальные исследования, теоретический и практический анализ полученных результатов проведены автором самостоятельно. В выполнении работы по разделам 3.3.1, 3.3.2, 3.4.1., 3.4.4., 3.7. практическую и консультативную помощь оказывали сотрудники ГНУ СНИВС: Гамаюнов В.М., Турлаков А.П. Авторский вклад составляет — около 80%.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы доложены и одобрены на заседаниях Ученого Совета Смоленской НИВС (1999-2002 гг.), Международной научно-практической конференции «Биолого-экологические проблемы различных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей, (г. Покров, 2002 г.); Международной научно-практической конференции «ИЭКВМ — 80 лет на передовом рубеже ветеринарной науки (г. Харьков, 2002 г.); Международной научно-практической конференции «Достижения та перспективы розвитку ветеринарної медицини» (Полтава, 2002 г.); Научно-производственной конференции «Внедрение достижений ветеринарной науки в сельскохозяйственное производство», посвященной 70-летию Смоленской НИВС (Смоленск, 2002).

Публикация результатов исследований

По материалам диссертации опубликовано 4 научные работы.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 104 страницах машинописного текста и состоит из: введения, обзора литературы по теме, изложения материалов основных методов, результатов исследований, обсуждения результатов, выводов и практических предложений. Список использованной литературы включает 170 работ, из них 85 отечественных авторов. Материалы диссертации иллюстрированы 27 таблицами и 1 рисунком. В приложении приводятся документы, подтверждающие научную и практическую значимость результатов работы.

2. Собственные исследования

Работа выполнена в период с 1999 по 2003 гг. в отделе инфекционных болезней крупного скота и свиней Смоленской НИВС, в отделе вирусных и прионных инфекций РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси», в Смоленской областной ветеринарной лаборатории, в районных ветеринарных лабораториях Смоленской области, животноводческих хозяйствах Смоленской области.

2.1. Материалы

Штаммы вирусов:

В работе использовались вакцинные штаммы вируса диареи "Орегон С-24У", "ВК-1 № 28" с инфекционной активностью не менее 6,51g ТЦД/50, полученные из ВГНКИ ветпрепаратов и Всероссийского института экспериментальной ветеринарии им.Я.Р.Коваленко, а также вирусвакцина, сухая культивированная против ВД КРС (производства Ставропольской биофабрики), живая культуральная вирусвакцина против ВД КРС (разработанная и изготовленная в отделе вирусных и прионных инфекций РНИУП «ИЭВ им.С.Н.Вышелесского НАНБ»), преципитирующие антигены ВД КРС (производства Украинского НИИ экспериментальной и клинической ветеринарной медицины) и антигены для постановки РИД (производства Приволжской биофабрики), эритроцитарный диагностикум, содержащий антигена вируса

диареи (изготовленный в отделе вирусных и прионных инфекций РНИУП «ИЭВ им.С.Н.Вышелесского НАНБ»).

Диагностические сыворотки

При проведении исследований использованы специфические гипериммунные сыворотки из набора диагностикумов Приволжской биофабрики, а также антисыворотки, полученные нами на телятах.

В качестве отрицательных сывороток использованы сыворотки крови от клинически здоровых, не болевших инфекционными заболеваниями телят, эмбриональная телячья сыворотка (производства фирмы Sigma).

Реактивы

Для изготовления буферных растворов, концентрации и очистки вирусов, накопления вирусного материала использованы реактивы: полиэтиленгликоль 6000, натрий фосфорнокислый двузамещенный и калий фосфорнокислый однозамещенный, натрия карбонат и натрия бикарбонат, ортофенилендиамин, перекись водорода, серная кислота, веронал-мединаловый буфер (производства фирм Sigma, Serva, Reanal, Реахим).

Конъюгаты

В работе использованы: конъюгаты пероксидазы хрена с моноклональными антителами против Ig M и Ig G крупного рогатого скота (производства ВИЭВ), конъюгаты пероксидазы хрена с антисывороткой против иммуноглобулинов крупного рогатого скота (производства НИИЭМ им.Гамалеи).

Клеточные культуры

Использовали перевиваемые культуры клеток почки телят ПТ-80 и ПТ (линия Таурус), МДВК, первичные культуры клеток - ПЭК (почки эмбриона коровы), ЛЭК (легких эмбриона коровы).

Среды

- сбалансированный раствор Хенкса по стандартной прописи, рН=7,1-7,4;
- 0,5% раствор гидролизата лактальбумина на растворе Хенкса;
- синтетическая среда 199;

- среда Игла;
- сыворотки крупного рогатого скота;
- агар «Дифко».

Объекты исследований

Исследованы 558 проб сыворотки крови коров, 596 проб сыворотки крови телят различного возраста и клинического состояния, сборного молока коров из 84 хозяйств Смоленской области.

В опытах по изучению диагностической эффективности иммуноферментного анализа использована сыворотка крови от 408 телят различного возраста и 289 проб от коров.

Всего при проведении диагностических исследований было исследовано 269 проб сыворотки крови коров, 188 телят, больных респираторными заболеваниями 1-6 месячного возраста. Выполнено более 700 серологических исследований.

Животные

В качестве основного объекта исследований при определении оптимальной схемы гипериммунизации были использованы 24 гол. молодняка КРС в возрасте от 12 до 18 месяцев черно-пестрой породы из животноводческих хозяйств Смоленской области.

2.2. Методы

2.2.1. Эпизоотологические методы исследования

При изучении распространения вирусных респираторных и желудочно-кишечных заболеваний телят нами обследовано более 30 хозяйств Смоленской области, в которых эпизоотическая обстановка по массовым респираторным и желудочно-кишечным болезням была особенно напряженной. Анализу подвергали технологические приемы комплектования хозяйств телятами, их размещение, условия кормления и содержания, сроки заболевания, широту распространения респираторных болезней с учетом сезона года. В работе использовали комплексный эпизоотологический подход (Бакулов И.А., 1996), включающий методы: описательно-исторический, статисти-

ческий, клинико-гематологический, патологоанатомический, серологический и иммунологический по общепринятым методикам. При оценке эпизоотической ситуации ВД КРС использованы данные Департамента ветеринарии администрации Смоленской области.

2.2.2. Вирусологические методы исследований

Для культивирования вируса диареи использованы первично-трипсинизированные культуры клеток ПЭК (почки эмбриона коровы), ЛЭК(легких эмбриона коровы), а также перевиваемые клетки почки теленка ПТ-80 и ПТ (линия Таурус), МДВК. Для накопления вирусосодержащей жидкости, изучения воздействия различных препаратов на репродукцию вирусов использовали общепринятые методы культивирования вирусов. Учет результатов культивирования осуществляли через 1-6 суток путем микроскопирования под световым микроскопом. Характер ЦПД, типичный для вируса диареи оценивали по интенсивности от 1+ до 4+ .

Гипериммунизацию телят проводили вакцинами: сухой живой культуральной вирусвакциной против ВД КРС (производства Ставропольской биофабрики); живой культуральной вирусвакциной против ВД КРС (разработанной и изготовленной в отделе вирусных и прионных инфекций РНИУП «ИЭВ им. С.Н.Вышелесского НАНБ»).

Для изучения специфичности тест-системы для диагностики ВД КРС телят прививали моновакцинами против вирусной диареи. Вакцины вводили телятам интратрахеально по одной иммунизирующей дозе двукратно с интервалом в 21-28 дней.

Кровь для проведения серологических исследований у иммунизированных и контрольных телят брали из яремной вены в объеме 10-15 мл. Сыворотку получали общепринятым методом и хранили при -20°С до исследования.

И

2.2.3. Серологические методы

Включали в себя проведение серологических исследований для оценки диагностической эффективности средств и методов диагностики вирусной диареи.

Реакциянейтрализации

Реакцию нейтрализации (РН) ставили с постоянной дозой вируса диареи и различными разведениями сывороток. Исследуемую сыворотку разводили поддерживающей средой от 1:2 до 1:256 и смешивали с вирусосодержащей жидкостью одного из вирусов, содержащей 100 доз вируса. После контакта вируса с сывороткой смесь вносили на сформированный монослой культуры клеток, добавляли поддерживающую среду и культивировали в течение 7 суток с ежедневным микроскопированием культуры клеток. Учет реакции осуществляли по наличию ЦПД, характерного для данного вируса. При наличии ЦПД — реакция отрицательная, отсутствие ЦПД — реакция считалась положительной. Титром антител считали последнее разведение исследуемой сыворотки, в котором отсутствовали изменения клеточного монослоя .

Реакцияиммунодиффузии

Реакцию иммунодиффузии (РИД) использовали для сравнительной оценки антител к вирусу диареи, выявляемых в других иммунологических реакциях. Для этого использовались преципитирующие антигены ВД (производства Украинского НИИ экспериментальной и клинической ветеринарной медицины) и антигены для постановки РИД (производства Приволжской биофабрики). Реакцию ставили в 1%-ном геле агар "Дифко" на 0,25 М вернал-мединаловом буфере. Учет результатов проводили через 24-72 часа. При оценке результатов РИД учитывали наличие полос преципитации между лунками с антигенами и специфическими или исследуемыми сыворотками (положительной считалась реакция при наличии 1-2 полос преципитации).

Реакция непрямой гемагглютинации

Реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) ставили с целью выявления антител к вирусу диареи в стандартных и исследуемых сыворотках крови с помощью эритроцитарного диагностикума, содержащего антигены вируса диареи, изготовленных в отделе вирусных и прионных инфекций РНИУП «ИЭВ им. С.Н.Вышелесского НАНБ». Постановку РНГА осуществляли путем раститровки исследуемых сывороток крови в микротитраторе системы Такачи в объеме 0,025 мл и добавления в каждую лунку с раститрованной сывороткой 0,025 мл соответствующего эритроцитарного диагностикума. Учет реакции проводили через 1,5-2 часа. Положительной РНГА считается агглютинация эритроцитарного диагностикума на 3+ и 4+ при разведении сыворотки 1:8 (для ВД КРС).

Твердофазный иммуноферментный анализ

Твердофазный иммуноферментный анализ (ТФ ИФА) использовали для выявления антител и вирусных антигенов в биологическом материале (пораженные органы и ткани, сыворотки крови). С этой целью использовали непрямой (для выявления антител) и конкурентный (для выявления вирусных антигенов) методы твердофазного ИФА. При постановке непрямого метода ТФ ИФА антиген вируса диареи иммобилизовали на твердой фазе пластин для ИФА. После внесения исследуемых сывороток связавшиеся с антигеном антитела выявляли конъюгатами пероксидазы хрена с антисывороткой к иммуноглобулинам крупного рогатого скота или моноклональными антителами против Ig M или Ig G крупного рогатого скота и субстратной смесью, состоящей из раствора ортофенилендиамина и перекиси водорода. Интенсивность окраски субстратной смеси прямо пропорциональна концентрации антител в исследуемой сыворотке крови. Учет реакции осуществляли визуально или на вертикальных спектрофотометрах "Дайнатек", "Титертек-Мультискан МСС/330" при длине волны 494 нм. Положительным результатом считали превышение показателя оптической плотности хромогенного субстрата

в лунках после контакта исследуемой сыворотки по сравнению с контрольной отрицательной сывороткой в 2 и более раз.

Для выявления вирусных антигенов использовали конкурентный метод ТФ ИФА, при котором предварительно объединяли исследуемый антиген с заранее известной положительной сывороткой и после 1-2 часового контакта выявляли не связавшуюся часть антител с помощью твердофазного ИФА, метод постановки которого описан выше. Положительным результатом считали снижение показателя оптической плотности хромогенного субстрата в лунках после контакта смеси исследуемая проба+специфическая сыворотка по сравнению с специфической сывороткой в 1,5 и более раз.

2.2.4. Статистические методы

Биометрическая обработка цифрового материала, полученного в экспериментальных исследованиях, проводилась по Р.Б.Стрелкову (1966) с учетом рекомендаций ПФ.Рокицкого (1961). Эксперименты проводили с числом повторностей (>3), обеспечивающим получение достоверного результата. Определяли средние значения, а также 95%-й доверительный интервал.

2.3. Результаты исследований

2.3.1. Эпизоотический мониторинг респираторных и желудочно-кишечных болезней телят в хозяйствах Смоленской области

Проведенный нами анализ эпизоотологической ситуации в животноводческих хозяйствах Смоленской области свидетельствует, что основная масса болезней крупного рогатого скота приходится на пневмоэнтериты телят, маститы и эндометриты коров.

Так, в 1999 году респираторными болезнями переболело 62 процента животных, в т.ч. молодняка - 34,1%, болезнями желудочно-кишечного тракта переболело - 83,2 %, в т.ч. молодняка — 45,7%. Важно отметить, что наибольшее количество павших животных приходится на молодняк, так, в 1994 году отход составил 78 процентов, в 1995-1996 годах составил 79,0 и 82,7 процентов, а соответственно к концу 1999 года падеж составил 76 процентов (от количества всего павших КРС).

За исследуемый промежуток времени с 1994 по 1999 годы вынужденный убой всего крупного рогатого скота составил в среднем 3,18 % от общего поголовья и 11,9 % от числа народившихся, в т.ч. вынужденный убой молодняка составил 62,24 процента от всего количества вынужденно убитого КРС.

Заболеваемость коров маститом составила 10% от всего количества коров. С 1994 по 1999 годы наблюдается тенденция увеличения заболеваемости коров эндометритом от 10,5 % до 15,9%.

Анализ результатов диагностических лабораторных исследований показал, что при серологическом исследовании антитела к вирусу диареи выявлялись у 75-82% переболевших энтеритами телят и у 85-100% - переболевших эндометритом коров из хозяйств, в которых отмечались массовые заболевания телят энтеритами. У телят, больных энтеритами, установлено наличие антигенов вируса диареи - в 65-80% случаев, ротавирусов - в 46-53%, коронавирусов - в 62-71% случаев. Патогенная кишечная палочка выделена у 26-32%, псевдомоназы - у 12-17%, стафилококки - у 35-41%, стрептококки - у 9-13% обследованных телят.

2.3.2. Получение гипериммунной сыворотки против вируса ВДКРС

При проведении диагностических мероприятий — постановке серологических реакций (РИГА, ИФА, РИД), идентификации вируса после выделения на культуре клеток одним из основных компонентов является специфическая сыворотка.

В этой связи нами была отработаны схемы для получения высокоактивной гипериммунной сыворотки против вирусной диареи для идентификации возбудителя ВД КРС.

Вирус диареи репродуцировали в перевиваемой культуре клеток МДВК и после их накопления инфекционный титр был $10^{6,5}$ ТПД₅₀/мл.

Для отработки оптимальной схемы гипериммунизации нами использовано двадцать четыре теленка в возрасте от 12 до 18 месяцев, которых разделили на 6 групп по 4 головы в группе.

Телят опытной группы № 1 гипериммунизировали путем четырех последовательных внутримышечных инъекций антигена вируса диареи (штамм вируса диареи ВК-1 № 28) с адьювантом Фрейнда.

Телят опытной группы № 2 гипериммунизировали путем четырех последовательных внутримышечных инъекций антигена вируса диареи (штамм вируса диареи «Oregon C 24V») с адьювантом Фрейнда.

Адьювант готовили по прописи: 50 мг вакцины БЦЖ, 15 г вазелинового масла, 5 г ланолина. Ампулы с вакциной БЦЖ кипятили в водяной бане в течение часа, затем содержимое растирали в фарфоровой ступке, добавляя небольшими порциями подогретые в водяной бане вазелиновое масло и ланолин. Готовый адьювант разливали во флаконы и автоклавировали при 1 атмосфере в течение 30 минут, хранили готовый адьювант в при 4°C. Адьювант с вирусосодержащим материалом смешивали непосредственно перед иммунизацией (в отдельном флаконе для каждого животного). Адьювант для телят брали в количестве 2 мл.

Телят третьей опытной группы гипериммунизировали путем четырех последовательных внутримышечных инъекций антигена вируса диареи (штамм вируса диареи ВК-1 № 28) без адьюванта Фрейнда.

Телят четвертой опытной группы гипериммунизировали путем четырех последовательных внутримышечных инъекций антигена вируса диареи (штамм вируса диареи «Oregon C 24V») без адьюванта Фрейнда.

Вирус вводили в возрастающих дозах: 5, 10, 15 и 20 мл по схеме, рекомендованной проф. П.И.Притулиным. Интервал между первым и вторым введениями составлял 14 дней, между последующими — 4 дня.

Телят пятой опытной группы иммунизировали путем четырехкратного введения вируса диареи (штамм ВК 1 № 28 при титре вируса $10^{6.5}$ ЦД₅₀/мл) в возрастающих дозах с использованием в качестве адьюванта эмульсигена (производство США). В работе использована схема, предложенная Е.В.Андреевым (1976). Первая инъекция вируса с адьювантом была в количестве 5 мл, вторая -

через 7 дней - 10 мл, третья - через 7 дней - 15 мл, четвертая через 7 дней - 20 мл.

Телят шестой опытной группы подвергали гипериммунизации по выше-описанной схеме (телята группы № 5), но антиген вируса вводился без адьюванта.

У животных через 21-30 дней после последнего введения антигена из яремной вены брали кровь для определения титра антител. Полученную сыворотку крови фильтровали через пластинки СФ и исследовали в реакции нейтрализации методом предельных разведений с использованием 100 ПЦД₅₀ вируса штамма ВК-1 № 28.

В таблице 1 представлены результаты изучения уровня специфических антител в гипериммунных сыворотках в реакции нейтрализации.

Как свидетельствуют данные, представленные в таблице 1, сыворотка крови подопытных телят, гипериммунизированных вирусом диареи ВК-1 № 28 с адьювантом Фрейнда, нейтрализовала 100 ПЦД₅₀ вируса диареи в разведении в среднем 1:1280 (10,25 log₂). Но при иммунизации телят вирусом диареи (штамм «Oregon C 24V») титр аптител был в среднем 1:640 (9,25 log₂). Низкий уровень аптител в сыворотке крови телят после иммунизации штаммом вируса диареи «Oregon C 24V» можно объяснить, по-видимому, более низкой антигенной активностью этого штамма, хотя инфекционный его титр был выше. Использование схемы гипериммунизации, предложенной П.И.Притулиным, но без использования адьюванта Фрейнда, позволило получить гипериммунные сыворотки, но их активность на 1,95-2,95 log₂ была ниже сывороток, полученных с использованием адьювантов.

Испытанная нами схема, предложенная Е.В.Андреевым, также показала невысокую активность гипериммунных сывороток. Использование эмульсигена в качестве адьюванта позволило получить сыворотку с титром антител 8,3 log₂, а без адьюванта - 6,9 log₂.

Титр специфических вируснейтрализующих антител к вирусу диареи крупного рогатого скота в сыворотках крови гипериммунизированных телят

Группы животных	Штамм вируса диареи	Количество животных в группе	Наличие адьюванта	Титр антител	
				1/n	log ₂
Опытная группа № 1	«BK-1 № 28»	4	Адьювант Фрейнда	1:1280	10,25
Опытная группа № 2	«Oregon C24V»	4	Адьювант Фрейнда	1:640	9,25
Опытная группа № 3	«BK-1 № 28»	4	-	1:160	7,3
Опытная группа № 4	«Oregon C 24V»	4	-	1:160	7,3
Опытная группа № 5	«BK-1 № 28»	4	Эмульсиген	1:320	8,3
Опытная группа № 6	«BK-1 № 28»	4	-	1:120	6,9

Таким образом, в результате отработки схемы гипериммунизации телят с использованием различных штаммов вируса диареи (штаммы BK-1 № 28 и «Oregon C 24V») и адьювантов (полный адьювант Фрейнда и эмульсиген) получены сыворотки крови с высокой вируснейтрализующей активностью, которые нами в дальнейшем использовались при выявлении вирусных антигенов и идентификации выделенных вирусов в реакциях нейтрализации, иммунодиффузии, непрямой гемагглютинации, иммуноферментном анализе, а также в качестве положительного контроля при выявлении антител в различных иммунологических реакциях.

2.3.3. Отработка параметров постановки ТФ ИФА для обнаружения антител к вирусу ВДКРС

При изготовлении тест-систем для постановки иммуноферментного анализа с целью выявления антител (Ig G и Ig M), специфических к вирусу диареи, нами была разработана следующая схема.

Для иммобилизации на твердой фазе полистироловых панелей с плоским дном были использованы белки ВД КРС (получаемые путем лизиса инфицированных клеток за 12-24 часа до образования ЦПД в концентрации 20-40 мкг/мл в натрий-карбонатном буфере pH 9.6).

Иммобилизация проводилась в течение 1 часа при температуре +37°C и 18-20 часов при +2+4°C. Отмывание несвязавшегося антигена осуществляли 5 раз буферным калий-фосфатным раствором с 0,05% детергента (твина-20).

Активные центры панелей, с которыми не связался вирусный антиген, блокировали раствором бычьего сывороточного альбумина на калий-фосфатном буфере (рН 7,2-7,4) в концентрации 0,5% в течение 1 часа при температуре +37°C. Отмывали пятикратно калий-фосфатным буфером с твин-20.

Исследуемые положительные и отрицательные сыворотки разводили от 1:50 до 1:150, контакт их с иммобилизованными антигенами производился в течение 1-2 часов при температуре +37°C. Отмывали пятикратно калий-фосфатным буфером с детергентом- твином-20.

Комплекс антиген-антитело выявляли конъюгатами пероксидазы хрена с моноклональными антителами против Ig M рогатого скота в разведении 1:400-1:500 и моноспецифическими антисыворотками против Ig G крупного рогатого скота в разведении 1:5-1:10 в течение 60 минут при температуре +37°C. После контакта проводилось пятикратное отмывание калий - фосфатным буфером с детергентом— твином-20.

Комплекс антиген-антитело-конъюгат выявляли субстратной смесью, состоящей из ортофенилендиамина перекиси водорода. Для этого субстратную смесь вносили в лунку панели и осуществляли контакт в течение 30-60 минут при температуре +20°C в темном месте.

Реакцию остановили добавлением 10%-ного раствора серной кислоты.

Учет результатов производили спектрофотометрически с использованием «Титертек-Мультискан МСС/340» при длине волны 492 нм. При этом положительной считалась реакция, в которой показатель оптической плотности исследуемой сыворотки превышал аналогичный показатель контрольной отрицательной сыворотки в 2 и более раза. Разработанный метод позволяет выявлять антитела в сыворотках крови больных, переболевших и вакцинированных против вирусной диареи животных.

2.3.4. Определение специфичности метода ТФ ИФЛ для обнаружения антител к вирусу ВДКРС в сыворотках крови КРС

Специфичность методов выявления антител, специфических к возбудителям инфекционных болезней, является важнейшим критерием их диагностической

эффективности. Для определения специфичности разработанного нами метода ингибирования ТФ ИФА для обнаружения антител, специфических к вирусу диареи КРС, испытан ряд специфических антисывороток к вирусам - возбудителям пневмоэнтеритов телят, а также антибактериальных сывороток против основных бактерий, выявляемых при этих болезнях.

Таблица 2

Результаты изучения специфичности метода ингибирования ТФ ИФА для выявления антител к вирусу диареи крупного рогатого скота

№№ п/п	Антисыворотки к возбудителям:	Оптическая плотность при постановке с сыворотками:		Δ E
		Отрицательной	Положительной	
1	Вирусу диареи	0,379	0,974	2,57
2	Вирусу инфекционного ринотрахеита	0,379	0,462	1,22
3	Вирусу парагриппа-3	0,379	0,436	1,15
4	Ротавирусу	0,379	0,413	1,09
5	Коронавирусу	0,379	0,504	1,33
6	Аденовирусам 1 подгруппы	0,379	0,474	1,25
7	Аденовирусам 2 подгруппы	0,379	0,497	1,31
8	Респираторно-синцитиальному вирусу	0,379	0,443	1,17
9	Кипечной палочке	0,379	0,485	1,28
10	Пастереллам	0,379	0,546	1,44
11	Сальмонеллам	0,379	0,523	1,38
12	Псевдомонам	0,379	0,497	1,31

В табл. 2 представлены результаты изучения специфичности метода ингибирования ТФ ИФА для выявления антител к вирусу диареи крупного рогатого скота. Представленные данные свидетельствуют о высокой специфичности разработанного нами метода ингибирования ТФ ИФА для выявления противодиарейных антител.

2.3.5. Обработка параметров постановки ТФ ИФА для обнаружения антигенов вируса диареи в биологическом материале

За основу при выявлении вирусных антигенов в биологическом материале был использован конкурентный способ постановки ИФА. Оценку метода осуществляли по снижению оптической плотности реакционной смеси, образуемой после нейтрализации противовирусных антител вирусным антигеном, и

выявляли остаток антител, которые не были нейтрализованы вирусным антигеном.

Постановку ИФА осуществляли в два этапа:

на **первом этапе** производили соединение заранее положительной сыворотки в двойном титре (в разведении 1:75) с исследуемым или положительным вирусосодержащим материалом в соотношении 1:1 в течение 60 минут;

на **втором этапе** производили постановку ИФА по методу, разработанному для выявления специфических антител. Параллельно в обязательном порядке в качестве положительного контроля использовалась положительная сыворотка в стандартном разведении (1:150). После спектрофотометрического учета ИФА производили сравнение показателей оптической плотности заранее положительной сыворотки и этой же сыворотки после взаимодействия с исследуемым вирусным антигеном.

Положительной считалась проба, в которой разница в показателях была не менее, чем 0,300 единиц оптической плотности. С помощью отработанного метода с высокой степенью достоверности производится идентификация выделяемого на культуре клеток вируса диареи, концентрация вирусов в вакцинах или диагностических антигенах. Кроме того, антигены вируса диареи выявлялись в вытяжках из пораженных органов (соответственно 75% и 50% положительных проб) и в сыворотках крови, из которых удалены иммуноглобулины (у 80% - 100%) больных и переболевших респираторными заболеваниями телят, фекалиях от больных энтеритами телят (20 и 70%).

2.3.6 Определение специфичности конкурентного метода ТФ ИФА для обнаружения антигена вируса диареи КРС в биологическом материале

Специфичность является важным показателем диагностической ценности методов выявления антигенов вируса в патологическом материале или культуральной жидкости. При определении специфичности разработанного нами конкурентного метода ТФ ИФА для выявления антигенов вируса ВД КРС проводили его постановку с рядом известных гетерологичных возбудителей инфекционных болезней КРС. В качестве гетерологичных антигенов использованы

культуральные жидкости инфицированных этими возбудителями культур клеток.

В табл. 3 представлены результаты изучения специфичности конкурентного метода ТФ ИФА для выявления антигенов вируса диареи крупного рогатого скота.

Таблица 3

Результаты изучения специфичности метода выявления антигена вируса диареи крупного рогатого скота в ИФА

№ п/п	Культуральные антигены вирусов + антисыворотка к вирусу диареи:	Оптическая плотность	Δ E
1	Вирус диареи + антисыворотка	0.479	1,26
2	Вирус инфекционного ринготрахеита + антисыворотка	0.874	2,30
3	Вирус парагриппа-3 + антисыворотка	0.784	2,06
4	Ротавирус + антисыворотка	0.805	2,12
5	Коронавирус + антисыворотка	0.785	2,07
6	Аденовирусам 1 подгруппы + антисыворотка	0.724	1,91
7	Аденовирусам 2 подгруппы + антисыворотка	0.822	2,17
8	Респираторно-синцитиальному вирус + антисыворотка к ВД	0.799	2,11
9	Антисыворотка к ВД	0.974	2,57
10	Отрицательная сыворотка	0.379	1

Данные, представленные в таблице 3, свидетельствуют, что только вирус диареи существенно снижает титр антител в антисыворотке после их взаимодействия, что свидетельствует о высокой специфичности разработанного метода ТФ ИФА для выявления антигенов вируса диареи КРС.

Таким образом, разработанный нами конкурентный метод ТФ ИФА для обнаружения антигенов возбудителя ВД КРС в биологическом материале от больных острыми респираторными заболеваниями и острыми гастроэнтеритами телят, позволяет поставить диагноз на эту болезнь в течение 3 часов.

2.3.7. Отработка параметров постановки ИФА для обнаружения специфических к вирусу диареи антител в сборном молоке коров

Выявление противовирусных антител в молоке коров позволяет ускорить постановку диагноза и установить циркуляцию возбудителей в стадах крупного рогатого скота. При отработке параметров выявления антител к вирусу диареи в сборном молоке было установлено, что удаление казеина следует осуществ-

лять с помощью 2-4%-ного раствора молочной кислоты с последующим удалением его центрифугированием и нейтрализацией двууглекислым натрием. Концентрацию молочных иммуноглобулинов лучше производить с помощью раствора полиэтиленгликоля ММ 6000 в 15%-ном насыщении.

После предварительной подготовки проб постановка ИФА осуществляется по вышеописанному методу. В результате проведенных исследований сборных проб молока из 84 хозяйств противовирусные антитела к вирусу диареи выявлены у 61,9% животных, что указывает на циркуляцию данного возбудителя среди крупного рогатого скота.

2.3.8. Сравнительная эффективность различных методов обнаружения специфических к вирусу диареи антител в сыворотке крови КРС

Наличие специфических противовирусных антител в сыворотке крови крупного рогатого скота свидетельствует о контакте животных с вирусными агентами и формировании постинфекционного иммунитета, а после вакцинации — о напряженности поствакцинального иммунитета у привитых животных. Из иммунологических методов наиболее доступным, эффективным и простым в постановке являются РНГА и ИФА.

В этой связи нами проведена сравнительная оценка эффективности обнаружения как поствакцинальных, так и постинфекционных антител у животных с помощью РНГА и ИФА.

Наличие поствакцинальных антител определяли у привитых телят моновалентной вирус-вакциной против вирусной диареи крупного рогатого скота. В иммуноферментном анализе выявлялись антитела, относящиеся к иммуноглобулинам М и G-классов, а в РНГА — без дифференциации иммуноглобулинов. Телят иммунизировали вакциной против ВД по 1 иммунизирующей дозе - 2 мл при титре вируса 4,5-5,0 Ig ТЦД 50/мл двукратно с трехнедельным интервалом. Кровь для исследования брали из яремной вены до иммунизации и через 4, 10, 21, 28 и 45 дней после вакцинации. Результаты динамики поствакцинальных антител в РНГА и ИФА представлены в таблицы 4 .

Результаты сравнительного изучения поствакцинальных антител к вирусу диареи в РНГА и ИФА

№ п/п	Дни после вакцинации	Титр антител в реакциях:					
		РНГА (\log_2)		ИФА (ΔE)			
		Опытная группа	Контрольная группа	Ig G		Ig M	
Опытная группа	Контрольная группа			Опытная группа	Контрольная группа		
1	До вакцинации	1.0±0.4	1.0±0.4	1.35±0.04	1.46±0.03	1.54±0.11	1.6±0.14
2	Через 4	3.0±0.4	2.0±0.4	1.56±0.08	1.53±0.12	2.09±0.17	1.62±0.13
3	Через 10	3.2±0.4	2.0±0.4	1.78±0.15	1.54±0.08	2.30±0.06	1.58±0.15
4	Через 21	4.8±0.21	2.8±0.4	1.75±0.04	1.37±0.07	2.14±0.09	1.58±0.15
5	Через 28	4.6±0.21	2.0±0.2	1.81±0.14	1.45±0.16	2.02±0.14	1.73±0.09
6	Через 45	5.2±0.41	1.8±0.4	1.82±0.12	1.65±0.05	2.32±0.07	1.7±0.06

Из данных таблицы 4 следует, что после вакцинации у телят происходит биосинтез антител, относящихся к иммуноглобулинам М и G-классов, которые выявляли в иммуноферментном анализе. У вакцинированных животных заметно разграничение первичного и вторичного иммунного ответа. Так, на 4-й день после первичного введения вакцины у телят на 27-35% увеличился титр антител, относящихся к иммуноглобулинам класса М. Такой высокий уровень IgM у телят продолжал сохраняться до конца срока наблюдения. Антитела класса G начинали синтезироваться у всех подопытных телят только после второй прививки. В основном гуморальный иммунный ответ у телят обусловлен биосинтезом иммуноглобулинов класса М.

Сравнение результатов выявления поствакцинальных антител к вирусу диареи в иммуноферментном анализе и реакции непрямой гемагглютинации показало, что в данных реакциях можно регистрировать наличие поствакцинальных антител. Антитела в РНГА к вирусу диареи выявляли в диагностических титрах уже на 10-й день после вакцинации и они достигали высокого уровня через 21-28 дни 4,8-5,2 \log_2 , что свидетельствует о напряженности иммунитета.

2.3.9. Схема лабораторной диагностики ВДКРС

На основе разработанных методов ТФ ИФА нами предложена новая схема лабораторной диагностики вирусной диареи КРС. Отличительной ее особенностью является применение конкурентного метода ТФ ИФА для обнаружения антигенов возбудителя в пробах патологического материала и непрямого метода ТФ ИФА для обнаружения специфических антител в сыворотке крови животных, молозиве и молоке коров (рис. 1).

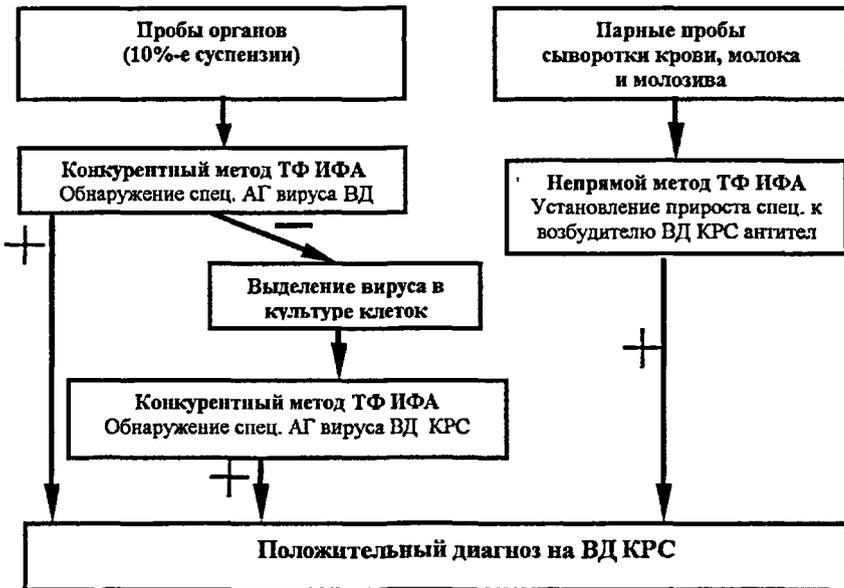


Рисунок 1. Схема лабораторной диагностики ВД КРС.

Предложенная схема лабораторной диагностики вирусной диареи КРС заключается в том, что при обнаружении в пробах органов специфического антигена данного возбудителя конкурентным методом ТФ ИФА ставят положительный диагноз на эту болезнь. Отрицательный диагноз подтверждается отрицательным результатом при выделении вируса на культуре клеток с последующей его идентификацией конкурентным методом ТФ ИФА.

При обнаружении прироста уровня антител, специфических к вирусной диарее КРС, в сыворотках крови животных в течение 10-14 дней в 2 раза и более, а также при обнаружении специфических к вирусной диарее КРС антител в сборных пробах молока невакцинированных коров диагноз также считают положительным.

2.3.10. Результаты серологического мониторинга вирусной диареи КРС в животноводческих хозяйствах Смоленской области с использованием разработанных методов ТФ ИФА

Серологический мониторинг вирусной диареи в хозяйствах Смоленской области с использованием разработанного нами непрямого метода ТФ ИФА свидетельствует, что антитела к вирусу диареи выявляются как у клинически здоровых животных, так и у животных с различной патологией (табл.5).

Таблица 5.

Результаты серологического мониторинга ВД КРС в хозяйствах Смоленской области с использованием непрямого метода ТФ ИФА

№№ п/п	Клиническое состояние животных	Количество проб	Результат ИФА (ΔЕ)	
			Абсолютное количество	Процент
Коровы				
1	Клинически здоровые	38	12	31,6
2	Множественно перегуливающие	41	37	90,2
3	Абортировавшие	29	25	86,2
4	Больные катаральным и серозным маститом	54	43	79,6
5	Больные субклиническим маститом	63	49	77,8
6	Клинически здоровые, вакцинированные против ВД КРС	44	42	95,5
Телята				
7	Клинически здоровые	34	11	32,3
8	Вакцинированные против вирусной диареи	43	39	90,7
9	Переболевшие энтеритами	53	45	84,9
10	Переболевшие респираторными болезнями	64	50	71,8

Для изучения распространения вирусной диареи были получены сыворотки крови от 194 телят и 269 коров из 18 хозяйств Смоленской области. Так,

если среди клинически здоровых коров серопозитивными к возбудителю ВД КРС являются 31,6% животных, то среди многократно перегуливающих - 90,2%, абортировавших - 86,2%, больных катаральным и серозным маститом - 79,6%, больных субклиническим маститом - 77,8%.

Среди клинически здоровых телят серопозитивными к указанному возбудителю являются 32,3%, в то время как переболевшие энтеритами 84,9%, переболевшие респираторными болезнями 71,8% животных.

Полученные результаты свидетельствуют о более значительной чем считалось ранее роли возбудителя ВД КРС в этиологии респираторных и желудочно-кишечных и болезней репродуктивных органов крупного рогатого скота.

3. Выводы

1. Результаты эпизоотологического мониторинга инфекционных болезней крупного рогатого скота в хозяйствах Смоленской области, свидетельствуют, о том что уровень респираторных и желудочно-кишечных заболеваний телят составляет соответственно, 62,2% и 83,2% от народившихся. Заболеваемость коров маститами и эндометритами имеет тенденцию к росту и составляет, соответственно 10,5% и 15,9% от поголовья коров. Выбытие, убой и падеж телят от желудочно-кишечных и респираторных болезней составляют 16,0% от народившихся животных.

2. Разработана схема гипериммунизации телят, обеспечивающая получение специфических к возбудителю вирусной диареи КРС сывороток крови с активностью в реакции нейтрализации до 1:1280, пригодных для использования в диагностических тестах на основе ТФ ИФА.

3. Разработан способ получения антигена возбудителя вирусной диареи КРС для сенсibilизации твердой фазы пластин при постановке ТФ ИФА, который заключается в получении и использовании вируса через 12-24 часа культивирования на культуре клеток (ПЭК) без проявления ЦПД. Оптимальная концентрация белка в антигене для иммобилизации составляет 30 мкг/мл.

4. На основе созданных для лабораторной диагностики вирусной диареи КРС иммунореагентов, разработаны непрямой и конкурентный методы ТФ ИФА, позволяющие эффективно выявлять противовирусные антитела классов IgM и IgG в сыворотках крови, молозиве и молоке КРС начиная с 4-х суток после заражения и вирусные антигены в биологическом материале.

5. Разработана схема лабораторной диагностики вирусной диареи крупного рогатого скота, включающая идентификацию возбудителя и выявление специфических антител методами ТФ ИФА.

6. При проведении серологического мониторинга в Смоленской области с помощью разработанных тест-систем, установлена персистенция вируса диареи КРС, у животных следующих групп: телят клинически здоровых невакцинированных-32,3%, переболевших энтеритами- 84,9%, респираторными болезнями- 71,8 %, коров клинически здоровых невакцинированных - 31,6%; многократно перегуливающих-90,2%, абортировавших-86,2%, больных катаральным, серозным маститом-79,6% и субклиническим маститом-77,8%.

7. Расчет экономической эффективности применения иммуноферментного анализа при диагностике вирусной диареи показал, что окупаемость составляет 1,78 рублей на затраченный рубль.

4. Практические предложения

На основании проведенных исследований разработаны, утверждены и предложены для практического использования «Методические рекомендации по использованию иммуноферментного анализа для выявления антител класса Ig G к вирусу диареи крупного рогатого скота (утверждены Заместителем Главы администрации Смоленской области - Начальником областного департамента по сельскому хозяйству, продовольствию и переработке 9 декабря 2002 г.).

5. Список научных работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Красочко П.А., Амиров А.Х. Выявление противодиарейных антител в сыворотках крови методом иммуноферментного анализа// Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей: Материалы междунар. науч.-практ. конф.- Покров, 2002.- С.333 -334.

2. Красочко П.А., Амиров А.Х. Выявление противодиарейных антител в сыворотках крови методом иммуноферментного анализа // Досягнення та перспективи розвитку ветеринарної медицини: Материали Міжнародної науково-практичної конференції - Полтава, 2002.- С.47- 49.

3. Красочко П.А., Красочко И.А., Амиров А.Х. Результаты разработки твердофазного ИФА-теста при диагностике вирусной диареи крупного рогатого скота// Ветеринарна медицина. Міжвидомчий тематичний науковий збірник , присвячений 80-річчю Інституту експериментальної і клінічної ветеринарної медицини - Харьков, 2002. - С.341-345.

4. Новиков О.Г., Красочко П.А., Амиров А.Х. К вопросу диагностики вирусной диареи крупного рогатого скота// Внедрение достижений ветеринарной науки в сельскохозяйственное производство: Материалы науч.-производствен. конф.- Смоленск, 2002.-С.23-26.

Отпечатано в типографии ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии г. Покров
Тираж 70 экз.

№ - 9347