

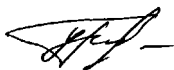
На правах рукописи

УРЮМЦЕВА
Татьяна Игоревна

**РАЗРАБОТКА И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭКСПРЕСС-
МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ИНФЕКЦИОННОГО ГЕПАТИТА СОБАК**

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

Автореферат диссертации
на соискание учёной степени
кандидата ветеринарных наук



Новосибирск - 2004

Работа выполнена в Учреждении «Павлодарский университет»

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
Никитин Евгений Борисович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук,
старший научный сотрудник
Г лотов Александр Гаврилович,

кандидат ветеринарных на>к
Аксенов Василий Иванович

Ведущая организация: Омский государственный аграрный университет

Защита состоится «6» мая 2004 г. в «10» часов на заседании диссертационного совета Д.006.045.01 в Государственном научном учреждении Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН по адресу: 630501, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, п. Краснообск, СО РАСХН, ИЭВСиДВ.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХБ СО РАСХН

Автореферат разослан «15» мая 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



СИ. Логинов

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. К 2000 году в России и Казахстане использовалось около 700 тыс. собак служебных, охотничьих, пастушьих, приносящих 100 млн. рублей дохода. В настоящее время интенсивно развивается домашнее собаководство. При этом численность высокопородных собак, наиболее подверженных инфекционным заболеваниям, возросла по скромным оценкам до 1 млн. Это обстоятельство выдвинуло перед ветеринарной наукой и практикой ряд задач по разработке эффективных средств и методов диагностики и профилактики инфекционных заболеваний. Современная эпизоотическая ситуация остается сложной. Такие инфекционные заболевания собак, как чума плотоядных, парвовирусный энтерит и аденовирусные инфекции представляют серьезную угрозу и способны нанести ощутимый экономический ущерб звероводству (Т. Власова, 1996, В. Гаврина, 2001, С.Снигирёв, И.Гуслинский, 2001).

В связи с тем, что по клиническим и патологоанатомическим признакам инфекционный гепатит собак во многом сходен с чумой и парвовирусным энтеритом, а также в связи с отсутствием в продаже коммерческих диагностических препаратов при ИГС, ветеринарные специалисты испытывают значительные затруднения в отношении диагностики этого заболевания. В результате диагноз может быть поставлен неверный и, как следствие, меры борьбы с заболеванием оказываются неэффективными (Е.Данилов, А. Майоров, В. Чижов, 1984, Ж.-П. Самэй, 1999).

Диагностика аденовирусных инфекций плотоядных затруднена из-за изменчивых и малохарактерных признаков заболеваний. В практических условиях предварительный диагноз на инфекционный гепатит ставят на основании эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных. Окончательный диагноз ставят при получении положительного заражения собак, песцов или серебристо-черных лисиц вирусосодержащим материалом от павших зверей с признаками гепатита.

Предложенные в настоящее время такие методы лабораторной диагностики инфекционного гепатита собак, как РСК, ИФА и РИГА требуют относительно длительного времени, а также особых условий постановки (Ж. Котард, 1999, А. Монаенков, 2000).

Практически единственным методом диагностики инфекционного гепатита собак, применимым в условиях ветеринарных лабораторий, является гистологический метод обнаружения специфических телец-включений в клетках печени. Однако, с внедрением в практику живых вирусвакцин против этого заболевания было установлено, что вакцинный вирус также вызывает образование аналогичных телец-включений. Дифференцировать поствакцинальные тельца-включения от постинфекционных стало практически



невозможным. Кроме того, этот метод применим только для посмертной диагностики заболевания.

В связи с этим, разработка и совершенствование специфических средств и методов лабораторной диагностики инфекционного гепатита собак, применимых в ветеринарной практике, является весьма актуальной проблемой.

Цель и задачи исследования. Исходя из вышеизложенного, целью наших исследований разработка и внедрение простых, обладающих высокой специфичностью и чувствительностью методов диагностики инфекционного гепатита собак.

Для достижения намеченной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Усовершенствовать методы приготовления диагностических препаратов (антигенов и иммуноглобулинов) при ИГС.

2. Разработать способы изготовления антительных и антигенных диагностикумов, пригодных для обнаружения вирусного антигена в пробах патологического материала и специфических антител сыворотках крови больных и переболевших животных и отработать на их основе схемы постановки серологических реакций.

3. Определить диагностическую ценность разработанных средств и методов диагностики инфекционного гепатита собак.

Научная новизна. В сравнительном аспекте изучена чувствительность различных перевиваемых культур клеток к вирусу инфекционного гепатита собак. Установлено, что перевиваемая культура клеток MDCK является оптимальной при получении диагностического антигена вируса. Определены технологические аспекты приготовления культурального антигена вируса ИГС. На основе полученного антигена отработана схема приготовления диагностической сыворотки при инфекционном гепатите плотоядных и выделения из неё иммуноглобулиновой фракции.

На основе полученных диагностических препаратов разработаны реакция агглютинации латекса для прижизненной и посмертной диагностики ИГС путём обнаружения антигена вируса в пробах патологического материала и для ретроспективной диагностики

Новизна исследований подтверждена положительным решением о выдаче предварительного патента на изобретение «Способ экспресс-диагностики инфекционного гепатита плотоядных животных».

Практическая значимость работы. Разработаны схемы приготовления диагностического культурального антигена вируса инфекционного гепатита собак и диагностической сыворотки при этом заболевании.

Для прижизненной и посмертной диагностики инфекционного гепатита собак предложены экспрессные методы обнаружения антигена вируса в пробах патологического материала и антител в сыворотках крови больных и переболевших животных, которые прошли апробацию с положительным результатом в ветеринарных клиниках гг. Семипалатинска и Павлодара.

Результаты проведённых исследовательских работ представляют теоретическую и практическую ценность, так как являются частью исследований, направленных на создание высокоэффективных диагностических препаратов, и в дальнейшем могут быть использованы в области биотехнологии.

Апробация полученных результатов. Основные положения диссертации доложены и получили положительную оценку на заседаниях научно-технического совета НИИ прикладной биотехнологии Павлодарского университета 2002-2003 годы, Первом Международном ветеринарном конгрессе, Алматы, 2002 г., Международной научно-практической конференции «Животноводство и ветеринария в XXI веке: Действительность и перспективы развития», посвященной 50-летию образования Семипалатинского зооветинститута, Семипалатинск, 2002, III Международной Научно-практической конференции "Социальные и экономические аспекты развития региона: потенциал, проблемы и перспективы", Павлодар, 2003.

Публикация результатов исследований. По материалам исследований опубликовано 5 научных работ, в том числе один предварительный патент на изобретение.

Внедрение результатов исследования. По результатам проведённых исследований в Патентном ведомстве Республики Казахстан получен Предварительный патент на «Способ экспресс-диагностики инфекционного гепатита собак» (заявка № 2003/0871.1 4397/2).

Разработанные методы диагностики прошли апробацию с положительным результатом в ветеринарных клиниках гг. Семипалатинска («Лидия» от 04 ноября 2003 г., «Аида» от 22 декабря 2003 г.) и Павлодара («Сталкер» от 10 марта 2004 г.). Результаты, полученные в ходе выполнения работы используются в учебном процессе Павлодарского университета (акт №6 от 10 марта 2004 г.)

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 104 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических предложений, списка источников и приложения. Список использованных источников включает 101 наименование, в том числе 29 зарубежных авторов.

Экспериментальные данные иллюстрированы 4 рисунками и 13 таблицами.

К диссертационной работе приложены копия предварительного патента на изобретение и акты использования разработанных методов диагностики в ветеринарных клиниках Павлодара и Семипалатинска.

Основные положения, выносимые на защиту:

- чувствительность перевиваемых культур клеток к вирусу инфекционного гепатита собак;
- способы изготовления диагностических препаратов для РАЛ при инфекционном гепатите собак;

эффективность применения РАЛ для прижизненной и посмертной диагностики инфекционного гепатита собак.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Исследования по разработке средств и методов диагностики инфекционного гепатита плотоядных проводили со следующими штаммами и изолятами вируса:

- музейный эпизоотический штамм в виде органотканевой суспензии, активность 3,0-3,5 lg LD 50/мл
- вакцинный штамм в виде культуральной суспензии, активность 3,0-3,5 lg ТЦД 50/мл
- вируссодержащий органотканевой материал от больных инфекционным гепатитом плотоядных щенков собак, экспериментально заражённых эпизоотическим штаммом вируса инфекционного гепатита плотоядных;
- вируссодержащий органотканевой материал от больных инфекционным гепатитом собак и лисиц из очагов заболевания в зверохозяйствах Восточно-Казахстанской области Казахстана, больных инфекционным гепатитом собак, принадлежащих жителям городов Семипалатинска и Павлодара.

С целью определения возможности постановки диагноза на инфекционный гепатит плотоядных средствами диагностики аденовирусной инфекции КРС использовали коммерческие диагностические наборы при данной инфекции.

В качестве контрольных нормальных антигенов использовали суспензии органов и тканей, полученных от здоровых животных и культуральные антигены, приготовленные из незаражённых культур клеток.

Вирусные штаммы были любезно предоставлены лабораторией диагностики вирусных инфекций НИСХИ (зав.лабораторией Л.Н.Пасечников), а также получены нами при выездах в очаги эпизоотии и в процессе экспертных исследований.

Для экспериментального заражения, получения иммунных и гипериммунных сывороток в опытах использовали клинически здоровых животных следующих видов:

- кроликов породы белый и серый великан в возрасте 3-4 мес. массой 2-3 кг;
- щенков беспородных собак в возрасте 2-3 мес.

Опыты проводили на первичных и субкультурах клеток фибробластов куриных эмбрионов, перевиваемых линиях клеток почки эмбриона свиньи, почки телёнка, почки собаки, почки сирийского хомячка, почки африканской зелёной мартишки, выращенных в пробирках, однолитровых матрасах или в круговых сосудах ёмкостью 3000 мл.

Иммунные сыворотки против вируса инфекционного гепатита плотоядных получали из крови вакцинированных, переболевших и гипериммунизированных собак и кроликов.

Сыворотки крови от вакцинированных и переболевших животных исследовали на 14-21 сутки после вакцинации или переболевания, от гипериммунизированных - на 7-14 сутки после введения антигена.

Для получения гипериммунных сывороток при инфекционном гепатите плотоядных использовали в качестве объектов иммунизации щенков беспородных собак 2-3 месячного возраста и кроликов 3-4 мес. возраста. За 3 недели до начала цикла гипериммунизации животных иммунизировали вакциной против инфекционного гепатита плотоядных. Для гипериммунизации продуцентов использовали следующие вирусосодержащие материалы:

- 20% суспензию органов и тканей животных (собак и лисиц), павших от инфекционного гепатита плотоядных.
- концентрированный культуральный материал вакцинного штамма вируса инфекционного гепатита плотоядных.

Вирусосодержащие материалы вводили подкожно через 21 сутки после вакцинации животных трёхкратно в нарастающей дозе соответственно в 1,0; 2,0 и 4,0 мл на I кг живой массы с интервалом между инъекциями в 7 суток.

Для исследования в серологических реакциях по обнаружению антигена вируса инфекционного гепатита плотоядных использовали следующие материалы:

- селезёнку, лёгкие, печень, полученные от убитых больных и павших животных;
- пробы фекалий, истечений из носа и смывы с ротовой полости, полученные от больных животных;
- инфицированную культуру клеток.

При исследовании проб органотканевого материала и фекалий готовили 20% суспензии на физиологическом растворе, которые однократно замораживали и оттаивали, центрифугировали при 4000-5000 об/мин в течение 30 минут и надосадок использовали для исследования.

При исследовании смывов с ротовой полости использовали физиологический раствор, в который были погружены тампоны после взятия смыва. Для этого заранее заготавливали пробирки со стерильным физиологическим раствором в количестве 2-3 мл, в котором в последующем прополаскивали стерильный ватный тампон, которым протирали ротовую полость собаки.

Инфицированную культуру клеток при развитии ЦПД вируса (при поражении монослоя не менее, чем на 60-70%) снимали с сосудов, концентрировали центрифугированием в 100 раз, замораживали и оттаивали и использовали в качестве испытуемого антигена. Контрольные нормальные культуральные антигены готовили аналогично из незаражённых клеточных культур.

Серологические реакции РСК, РДП, РН применяли для определения специфической активности сывороток крови животных и выделенных из них гамма-глобулиновых фракций, а также для выявления и количественного определения специфических антигенов вируса инфекционного гепатита плотоядных в органах и тканях заражённых животных и инфицированных клеточных культур.

Все опыты повторяли от 5 до 7 раз для получения требуемой точности результатов.

Статистическую обработку полученных данных проводили разностным методом Стьюдента, описанном М.А.Чистяковым.

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Изучение возможности применения средств и методов диагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота при инфекционном гепатите собак

Известно антигенное иммунологическое родство между другими представителями семейства Adenoviridae. В него входит и возбудитель аденовирусной инфекции крупного рогатого скота, наборы для диагностики которой выпускаются биологической промышленностью и поступают в вирусологические отделы ветеринарных лабораторий.

С учетом вышеизложенного одной из целей наших исследований была разработка метода серологической диагностики ИГС с использованием препаратов для диагностики аденовирусной инфекции КРС.

В наших исследованиях применяли наборы диагностикумов для РСК и РДП при аденовирусной инфекции КРС производства Приволжской биофабрики.

Испытуемый материал отбирали от собак, больных и павших от различных заболеваний. Для посмертной диагностики отбирали пробы органов и тканей — печени, легких, селезенки, из которых готовили 20% органотканевую суспензию на физиологическом растворе, которую исследовали в РДП в разведениях от цельного до 1:16. Для прижизненной диагностики от больных животных отбирали пробы сывороток крови в различных стадиях инфекционного процесса (начальный период, выраженные признаки заболевания, атональный период).

Для контроля специфичности метода использовали материал, полученный от здоровых невакцинированных и вакцинированных собак, а также собак, больных и переболевших чумой и парвовирусным энтеритом.

Испытуемый материал исследовали в РДП по методу Оухтерлони с использованием 1% агара Дифко при выдерживании реакции при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 час.

В результате исследований было установлено, что при использовании специфической сыворотки к аденовирусу КРС II серотипа были обнаружены

антигены аденовируса в пробах печени и селезенки больных ИГС в титрах от цельного до 1:4. В пробах легких антиген обнаружен не был. Специфическая сыворотка к аденовирусу КРС I серотипа не дала положительной реакции с этими же пробами, из чего можно сделать вывод о близкородственности вируса ИГС и аденовируса КРС II серотипа. Исследование с целью контроля специфичности органов собак, павших от чумы и парвовирусного энтерита, а также от убитых здоровых бродячих собак, показало отрицательный результат реакции, что свидетельствовало о специфичности метода.

Более актуальным является вопрос прижизненной диагностики ИГС. С этой целью для обнаружения вирусспецифических антител в сыворотках крови больных животных была осуществлена постановка реакции с использованием диагностических антигенов аденовируса КРС I и II серотипа.

Было установлено, что вирус-специфические антитела, родственные антигену аденовируса II серотипа, были обнаружены в сыворотках крови больных собак в различные периоды заболевания (в начальный период, характеризующийся только повышением температуры тела и снижением аппетита, в период выраженных клинических признаков и в заключительный атональный период).

Сыворотки крови от животных с другими заболеваниями, и от здоровых собак показали отрицательную реакцию, что свидетельствовало о специфичности метода. Поствакцинальные антитела в РДП также не обнаруживали.

Таким образом, в результате проведенных исследований была установлена возможность постановки серологических реакций для диагностики инфекционного гепатита собак с использованием средств диагностики аденовирусной инфекции КРС.

Данный метод в настоящее время используется для ориентировочной и дифференциальной диагностики ИГС от чумы плотоядных и парвовирусного энтерита в частных ветеринарных лечебницах городов Семипалатинска и Павлодара.

2.2.2 Получение иммунных сывороток к вирусу инфекционного гепатита собак, определение их серологической активности и выделение иммуноглобулиновой фракции

По литературным данным известно, что для гипериммунизации применяют органотканевые или культуральные антигены вирусов.

Учитывая это, нами были проведены поисковые исследования с целью получения высокоактивных иммунных сывороток против вируса инфекционного гепатита собак. Объектами иммунизации служили щенки беспородных собак 2-3 месячного возраста и кролики 3-месячного возраста, которых использовали в опыте после проверки проб сывороток крови от них на

отсутствие вируснейтрализующих антител против вирусов чумы и парвовирусного энтерита. За 3 недели до начала цикла гипериммунизации животных вакцинировали против инфекционного гепатита.

Для анализа динамики накопления специфических антител от продуцентов на 7, 14, 21, 28 и 35 суток с момента начала гипериммунизации брали кровь для получения сыворотки, которую исследовали на комплементфиксирующую и преципитирующую активность.

Было установлено, что средние значения титров антител у гипериммунизированных щенков собак превосходят аналогичные показатели у кроликов. В связи с этим дальнейшие исследования проводили с сыворотками крови, полученными путём гипериммунизации щенков собак.

Титры КС- и преципитирующих антител против вируса инфекционного гепатита собак постепенно нарастают после первой иммунизации. При последующих введениях вирусосодержащего материала титры антител повышаются и достигают максимума на 8-12 сутки после последней инъекции антигена. В последующем титры антител имеют тенденцию к снижению.

В процессе исследований было установлено, что серологическая активность полученных сывороток в значительной степени зависит от вида использованного для гипериммунизации вирусосодержащего материала. Максимальные титры антител выявлены в сыворотках крови собак, для гипериммунизации которых использовали органотканевый материал, значения которых оказались выше титров антител в сыворотках крови животных, иммунизированных культуральным антигеном, в РДП в 4-5 раз, в РСК - в 8-9 раз.

Для проверки полученных гипериммунных сывороток крови на специфичность осуществляли постановку РСК и РДП с набором нормальных, гомо- и гетерологичных культуральных и органотканевых антигенов с отрицательным результатом.

Исходя из соображений специфичности и меньшей серологической активности сывороток крови, полученных путём гипериммунизации собак культуральным антигеном, дальнейшие исследования проводились с сыворотками крови, полученными от животных путём введения им органотканевого материала,

В связи с тем, что чувствительность и специфичность твёрдофазовых методов исследования зависят от чистоты сенситина, для приготовления антителных иммуносорбентов используют гамма-глобулины, выделенные из иммунных сывороток или иммунных асцитных жидкостей и моноклональных антител различными методами. При использовании с этой целью глобулиновых фракций достигается концентрация активных белков в единице объёма, что ведёт к повышению чувствительности диагностикума, а удаление альбумина и микроглобулинов способствует повышению его специфичности.

Для выделения гамма-глобулиновой фракции из полученных гипериммунных сывороток нами был использован метод ступенчатого

многократного осаждения альбумина и иммунных глобулинов различными концентрациями охлаждённого этилового спирта.

Результаты электрофоретического анализа показали, что при спиртовом методе осаждения гамма-глобулинов в полученных препаратах содержится чистая иммуноглобулиновая фракция с незначительной примесью посторонних белков. При осаждении гамма-глобулинов сульфатом аммония и полиэтиленгликолем, кроме иммуноглобулиновой фракции в препаратах содержатся примеси альбуминов и бета-глобулинов.

2.2.3 Обработка условий приготовления антительного иммуносорбента и его использования при обнаружении антигена вируса инфекционного гепатита собак

В результате проведённых первоначальных исследований оказалось, что максимальной способностью связывать иммуноглобулин против вируса ИГС (90-93,7 процента) обладает резорцин-формальдегидная микродисперсия с размером частиц 3 мкм. Преимуществом данного полимера является также и то, что он имеет красно-коричневый цвет и при положительной реакции агглютинаты его частиц хорошо видны невооружённым глазом.

Таким образом, в качестве наиболее подходящего сорбента при изготовлении антительного диагностикума для реакции был отобран резорцинформальдегидный полимер (микродисперсия) с размерами частиц 3 мкм.

Для определения оптимального количества белка при приготовлении иммуносорбента были испытаны различные концентрации (5,10, 20,30,40 и 50 мг/мл) раствора иммуноглобулина, приготовленного на 0,1 М карбонатном буфере pH 9,2-9,4,

Для приготовления иммуносорбента в 0,5 мл 1% суспензии микродисперсии, приготовленной также на 0,1 М карбонатном буфере pH 9,2-9,4 вносили по 0,2 мл раствора иммуноглобулина соответствующей концентрации. Смесь инкубировали при температуре $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 16-18 часов при постоянном перемешивании. По истечении этого срока частицы полимера осаждали в течение 10-15 минут, а надосадочную жидкость исследовали спектрофотометрически на наличие несвязавшегося белка.

При концентрации иммуноглобулина от 5 до 20 мг/мл в надосадочной жидкости белок не определялся, т.е. процент связывания составлял 100%. При концентрации иммуноглобулина 30, 40 и 50 мг/мл в надосадочной жидкости определяли несвязавшийся белок в I, 7 и 10% соответственно. На основании этих данных была определена необходимая концентрация иммуноглобулина от 30 до 40 мг/мл, обеспечивающая более полную и экономичную иммобилизацию лиганда на носителе.

Дальнейшими исследованиями было установлено, что хранение полученного иммуносорбента при температуре $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ в растворе избытка гаммаглобулина не снижает его специфической активности в течение 6 месяцев и предохраняет его от самоагрегации.

Хранение диагностикума при температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ обеспечивало сохранение его активности в течение 3 суток, а при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ - в течение 1 суток.

Перед использованием избыток гамма-глобулина во избежание возможных неспецифических реакций удаляли однократным отмыванием в равном объёме 0,1 М карбонатного буфера pH 9,2-9,4, после чего иммуносорбент ресуспендировали в этом же буфере до исходного объёма. Всего было приготовлено 9 серий иммуносорбента с использованием 3 серий иммуноглобулина, выделенного из сыворотки крови щенков собак.

В процессе исследований было проведено определение оптимальных условий постановки реакции агглютинации микродисперсии и изучение её специфичности, а также опробованы различные соотношения диагностикума и испытуемых проб материала.

В результате сравнительных исследований оптимальными условиями постановки реакции определены следующие: соотношение пробы и иммуносорбента 8:1 (40 мкл испытуемого материала и 5 мкл диагностикума) и лёгкое покачивание предметных стёкол с реакционной смесью в течение 5-6 минут при комнатной температуре. Такие условия постановки реакции в пробе, содержащей антиген вируса инфекционного гепатита собак, позволяют наблюдать выраженную, учитываемую визуально, агглютинацию частиц сорбента при отсутствии агглютинации в пробах с нормальным антигеном и карбонатным буфером.

Максимальное разведение нормальных и гетерологичных органотканевых материалов, при котором наблюдалась неспецифическая агглютинация иммуносорбента, равняется 1:40, смывов из ротовой и носовой полостей - 1:4, проб фекалий - 1:8. Поэтому с целью полного устранения возможности проявления ложноположительных результатов реакции было определено исходное разведение для исследования органотканевого материала, равное 1:100, фекалий - 1:50, смывов из носовой и ротовой полостей - 1:8.

Таким образом, в результате экспериментальных исследований была отработана окончательная схема постановка РАІ для обнаружения специфического антигена вируса инфекционного гепатита собак, заключающаяся в следующем:

На предметных стёклах готовят серию двойных разведений испытуемых материалов (органотканевых от 1:100 до 1:51200, культуральных от 1:10 до 1:5120, проб фекалий от 1:50 до 1:6400, смывов из носовой и ротовой полостей от 1:8 до 1:512) на 0,1 М карбонатном буфере pH 9,2-9,4, по 40 мкл. В каждое разведение пробы вносят по 5 мкл предварительно отмывого от избытка гаммаглобулина иммуносорбента. В качестве контролен используют суспензию нормального антигена в начальном разведении на 0,1 М карбонатном буфере

pH 9,2-9,4; и растворитель (0,1 М карбонатный буфер pH 9,2-9,4). Смесь слегка перемешивают и покачивают вращательным движением стекла в течение 5-6 минут, после чего визуально проводят учёт реакции на белом фоне. За положительную реакцию принимают наличие агглютинатов частиц полимера в испытуемых пробах при отсутствии агглютинации в контрольных нормальных пробах. За титр антигена в РАІ принимают максимальное разведение испытуемого материала, при котором визуально наблюдается агглютинация частиц иммуносорбента.

Разработанный метод агглютинации микродисперсии является экспрессным, достаточно эффективным и позволяет обнаруживать вирусспецифический антиген через 6-8 минут с момента постановки реакции или через 30-40 минут с момента поступления пробы на исследование.

2.2.4 Выбор системы культивирования вируса инфекционного гепатита собак с целью получения диагностического антигена

В опытах использовали вакцинный штамм вируса ИГС, полученный в НИСХИ, который культивировали в культурах клеток КФ, СПЭВ, МДВК, МДСК, ВНК-21, Vero, выращенных в стационарном варианте в пробирках. Штаммом вируса в разведениях от 10^{-3} до 10^{-8} заражали по 4 пробирки с культурой клеток в 5 повторностях. За заражёнными пробирками вели наблюдение в течение 7-12 суток на наличие цитопатического действия. Питательную среду меняли через каждые 2-3 суток. После культивирования определяли титр вируса для каждой системы культивирования по методу Рида и Менча.

Наиболее высокие титры вируса были получены при культивировании его в первичной и субкультуре клеток КФ и перевиваемых линиях клеток МДСК и ВНК-21.

В связи с нетехнологичностью использования клеток линии КФ, упор в дальнейших исследованиях был сделан на адаптацию вакцинного штамма ЗПМ, вируса к перевиваемым линиям клеток, для чего клетки ВНК-21 и МДСК, выращенные во вращающихся сосудах, заражали вакцинным штаммом вируса инфекционного гепатита собак в дозе 0,1 ТЦД/клетку. Было проведено 3 последовательных пассажа культивирования вирусов в указанных клеточных системах. Урожай вируса собирали при развитии ЦПД на не менее, чем 70% монослоя клеток. После каждого пассажа вирусный материал раститровывали в гомологичной клеточной системе.

В культурах клеток ВНК-21 вирус культивировался в низких титрах в течение только 2 пассажей. В линиях клеток МДСК с ростом пассажного уровня активность культивируемого штамма вируса постепенно возрастала при сохранении сроков культивирования. Отмечена стабильность высоких титров

вирусного материала в культуре клеток МДСК вне зависимости от пассажного уровня и сроков наступления деструкции монослоя.

Таким образом, в результате проведённых исследований были определены оптимальные технологические системы для накопления вакцинного штамма вируса инфекционного гепатита собак в высоких титрах. Ими являются культура клеток МДСК - вакцинный штамм вируса ИГС. С целью обеспечения высокой технологичности процесса получения вирусосодержащего сырья необходимым условием культивирования является выращивание клеток МДСК во вращающихся сосудах (роллерная система).

Исследования по отработке условий приготовления диагностического антигена вируса инфекционного гепатита собак были начаты с изыскания метода концентрирования вируса, обеспечивающего высокую активность и специфичность препарата.

С этой целью заражённые вирусом ИГС клетки МДСК, выращенные при роллерной системе культивирования, после достижения степени деструкции монослоя в 70-80%, снимали раствором версена или механически (шпателем с резиновым наконечником), вирус концентрировали растворами ПЭГ-6000, сульфата аммония или центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин. Очистку антигена от балластных белков клеточного детрита проводили двукратным термоллизом клеток с последующим центрифугированием.

Наиболее активный диагностический антиген вируса инфекционного гепатита собак (титры в РДП от 1:4 до 1:8, в РСК от 1:20 до 1:40) был получен при центрифугировании механически снятых клеток поражённого монослоя с последующим ресуспендированием осадка после центрифугирования в 1/10 части исходного объёма суспензии, двукратным термоллизом и осаждением клеточного детрита.

Полученный антиген в последующих опытах был исследован для определения его пригодности при постановке и других серологических реакций - РАП положительными результатами.

Таким образом, в результате проведённых исследований впервые разработан метод приготовления комплексного культурального антигена вируса инфекционного гепатита собак для серологических реакций, который состоит из следующих этапов:

- заражение вакцинным штаммом вируса инфекционного гепатита собак культуры клеток МДСК, выращенной во вращающихся сосудах, в дозе 0,1 ТЦД на клетку;
- инкубирование заражённой культуры клеток до достижения степени деструкции монослоя 70-80 % ;
- снятие поражённого монослоя стерильным шпателем с резиновым наконечником;
- центрифугирование вирусосодержащей суспензии при 3000 об/мин в течение 30 минут;

- ресуспендирование осадка в стерильном физиологическом растворе до 1/100 части исходного объёма материала;
- двукратное замораживание при температуре минус $(30 \pm 10)^{\circ}\text{C}$ и оттаивание при комнатной температуре;
- центрифугирование в течение 30 минут при 4000-5000 об/мин;
- добавление в надосадочную жидкость в качестве стабилизатора раствора желатины, расфасовка в ампулы и лиофилизация.

Такой метод позволяет изготавливать специфические диагностические антигены вируса инфекционного гепатита собак, пригодные для использования во всех серологических реакциях с активностью в РДП 1:4-1:8 и в РСК 1:20-1:40.

Полученный антиген был использован для приготовления антигенного латексного диагностикума для ретроспективной диагностики инфекционного гепатита собак.

2.2.5 Отработка условий приготовления антигенного иммуносорбента и его использования при обнаружении, специфических антител

По данным литературы известно, что для сенсибилизации антигенами можно использовать естественные и искусственные латексы с размером частиц от 0,2 до 1,2 мкм. В связи с тем, что некоторые типы латексов обладают способностью самоагглютинировать при добавлении их к цельной сыворотке крови, предлагается перед использованием для освобождения от детергентов суспензии латексов диализовать против дистиллированной воды в течение 10 суток.

На первом этапе выбор типа латекса, пригодного для изготовления антигенного иммуносорбента, проводился путём отбора сорбентов, не способных самоагглютинировать при внесении их в цельную сыворотку крови. Для этого в 60 мкл цельной сыворотки крови, полученной от здоровой собаки, вносили по 10 мкл 1% суспензии латексов, смесь перемешивали в течение 10 минут и просматривали на наличие самоагглютинации. На этом этапе были отобраны как условно пригодные для изготовления сорбента латексы фирмы "Дифко" с размером частиц 0,61 мкм и фирмы "Серва" с размером частиц 0,399 мкм, которые не самоагглютинировали в присутствии цельной сыворотки крови. Оставшиеся 10 типов латексов подвергли диализу против дистиллированной воды в течение 10 суток, после чего вновь исследовали на самоагглютинирующую способность. В этом опыте не проявил способность самоагглютинировать полистироловый латекс с размером частиц 0,5 мкм производства Санкт-Петербургского НИИ особо чистых биоматериалов.

В дальнейшем была проверена способность отобранных трёх типов латексов иммобилизовывать на себя антигены.

По данным литературы известно, что наиболее активными получаются диагностикумы при конъюгации латексов с антигенами в среднекислой среде (рН 4,5-5,5). Поэтому для определения иммобилизующей способности к 0,5 мл 1% суспензии латексов, приготовленной на 0,001 М растворе глицин-солянокислого буфера рН 4,3-4,5 добавляли равное количество раствора специфического антигена вируса инфекционного гепатита собак. После инкубирования препаратов в течение 3 часов при температуре $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ при постоянном перемешивании определяли активность полученного диагностикума. Для этого в 50 мкл серии двойных разведений гипериммунной сыворотки щенка от 1:4 до 1:256 вносили по 50 мкл испытуемого сорбента. Смесь слегка перемешивали и покачивали 8-10 минут при комнатной температуре, после чего производили учёт реакции. Каждый тип латекса исследовали в 5 сериях опытов.

В результате проведённых исследований было установлено, что наиболее полная иммобилизация антигена на латексе происходит при использовании бактолатекса фирмы " Difco ".

Таким образом, в качестве наиболее подходящего сорбента для изготовления антигенного диагностикума для РАЛ при инфекционном гепатите собак из 12 испытанных типов полимеров был отобран бакто-латекс фирмы "Дифко" с размером частиц 0,81 мкм.

В процессе отработки методики получения антигенного диагностикума были испытаны различные концентрации раствора антигена, используемого для приготовления иммуносорбента, с активностью в РДП от 1:2 до 1:8.

Для приготовления диагностикума в 0,5 мл 1% суспензии латекса вносили равное количество раствора антигена соответствующей активности, приготовленного на 0,001 М растворе глицин-солянокислого буфера рН 4,3-4,5. Смесь инкубировали при температуре $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение 3 часов при постоянном перемешивании. По окончании инкубирования полученный сорбент проверяли на серологическую активность с гипериммунной сывороткой против вируса инфекционного гепатита собак.

В результате исследований было установлено, что наивысшие титры антител при исследовании в РАЛ сыворотки, иммунной против вируса инфекционного гепатита собак, были получены при использовании диагностикумов, приготовленных инкубированием полимера с вируспецифическим антигеном, обладающим преципитирующей активностью не ниже 1:4.

Следующим этапом наших исследований было определение влияния избытка несвязавшегося антигена в суспензии сорбента на активность и специфичность препарата. Для этого в реакции параллельно исследовали нативный диагностикум и иммуносорбент, однократно отмытый от несвязавшегося антигена равным объёмом 0,001 М раствора глицин-солянокислого буфера рН 4,3-4,5. В результате было установлено, что при

отмывке препарата активность его снижается на 1-2 разведения испытуемой сыворотки, в то время как специфичность (при исследовании нормальной сыворотки крови собаки) остаётся одинаковой. Поэтому для постановки реакции в следующих опытах использовали нативные, не отмываемые от избытка антигена, суспензии латексных диагностикумов.

Дальнейшими исследованиями было установлено, что хранение полученного сорбента при температуре $(4\pm 1)^{\circ}\text{C}$ в растворе несвязавшегося антигена не снижает его специфической активности в течение 6 месяцев и предохраняет его от самоагрегации.

Хранение диагностикума при температуре $(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$ обеспечивало сохранение его активности в течение 3 суток, а при $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ - в течение 12 часов.

Следующим этапом наших исследований было определение оптимальных условий постановки РАЛ для ретроспективной диагностики инфекционного гепатита собак и оценка её специфичности.

Получив в РАЛ низкие титры антител в гипериммунной сыворотке крови, трудно было надеяться на возможность выявления специфических к вирусу инфекционного гепатита собак антител в сыворотках, крови вакцинированных животных. В то же время, согласно литературным данным, известно, что внесение в реагирующую смесь РАЛ полианионов типа декстрансульфата, гепарина и др. в несколько раз повышает чувствительность реакции. В процессе исследований были испытаны варианты постановки РАЛ с использованием исследуемой сыворотки, коммерческого препарата гепарина и диагностикума, которые в различных соотношениях смешивали на предметных стёклах. Также были испытаны и различные условия постановки реакции - встряхивание, медленное покачивание и статическое состояние при температуре $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ в термостате и при комнатной температуре. Проведённые исследования показали, что оптимальным вариантом является постановка реакции в объёме 90 мкл при соотношении исследуемой сыворотки, гепарина и антигенного сорбента 2:6:1, при лёгком покачивании предметных стёкол в течение 8-10 минут при комнатной температуре.

Такие условия постановки реакции с контрольной специфической сывороткой позволили получить чётко выраженную агглютинацию латексных частиц, заметную визуально на тёмном фоне, при отсутствии агглютинации в пробах с нормальной сывороткой и буфером.

Таким образом, на основании результатов экспериментальных исследований была определена оптимальная схема постановки РАЛ для обнаружения специфических антител к вирусу инфекционного гепатита собак, которая заключается в следующем:

На предметных стёклах готовят серию двойных разведений испытуемых сывороток на 0,001 М растворе глицин-солянокислого буфера pH 4,3-4,5. При исследовании сывороток крови от вакцинированных и переболевших животных разведения готовят от цельного до 1:32, гипериммунных - от цельного до 1:128

по 20 мкл каждое. В каждое разведение пробы вносят по 60 мкл коммерческого раствора гепарина и 10 мкл антигенного сорбента. После добавления в пробы сывороток гепарина их разведение увеличивается в 4 раза. Этим достигается начальное разведение сывороток 1:4. В качестве контролен используют сыворотку крови, не содержащую антител к вирусу инфекционного гепатита собак в цельном виде и растворитель (0,001 М раствор глицин-солянокислого буфера pH 4,3-4,5). Смесь слегка перемешивают и покачивают вращательным движением стекла в течение 8-10 минут, после чего визуальную или с помощью лупы проводят учёт реакции на тёмном фоне. За положительный результат принимают наличие агглютинатов частиц латекса в испытуемых пробах при отсутствии агглютинации в контрольных нормальных пробах. За титр антител в РАЛ принимают максимальное разведение испытуемой сыворотки, вызывающее выраженную агглютинацию частиц диагностикума.

Постановка РАЛ по представленной схеме позволяет получать результат исследования в течение 20-30 минут с момента доставки пробы.

Таким образом, проведёнными исследованиями показано, что разработанный метод РАЛ является специфичным и позволяет в течение 20 - 30 минут обнаруживать специфические антитела к вирусу инфекционного гепатита собак в сыворотках крови иммунизированных и переболевших собак.

2.2.6 Изучение диагностической ценности разработанных методов диагностики инфекционного гепатита собак

В дальнейших исследованиях была проверена чувствительность, эффективность и специфичность методов РСК, РДП и РАЛ при диагностике инфекционного гепатита собак.

Оценку чувствительности и эффективности методов проводили путём исследования проб органотканевого материала, фекалий, смывов с носовой и ротовой полостей и сывороток крови, полученных от больных, павших, переболевших и вакцинированных против инфекционного гепатита плотоядных собак и лисиц. Оценку специфичности осуществляли путем постановки реакций с набором гомо- и гетерологичных антигенов и сывороток.

При этом оказалось, что эффективность выявления специфического антигена вируса инфекционного гепатита собак методами РСК и РАЛ является примерно одинаковой, в пределах 70-90%, что достаточно для рекомендации этих реакций к использованию в ветеринарной практике. Титры выявляемых антигенов при этом, в зависимости от характеристики исследуемых проб, колебались от 1:4 (РСК) до 1:256 (РАЛ). Ценным в РАЛ при обнаружении вирусспецифического антигена вируса ИГС является также и то, что с его помощью можно проводить прижизненную постановку диагноза на заболевание путём исследования проб фекалий и смывов с ротовой и носовой полостей. РДП показала низкую эффективность для прижизненной и

посмертной диагностики заболевания. Сходные результаты были получены и при исследовании сывороток крови от переболевших животных. Также было определено, что используемыми методами, в связи с их недостаточной эффективностью, невозможно определять уровень напряжённости иммунитета против инфекционного гепатита собак среди вакцинированного поголовья.

Исследования, проведенные для определения специфичности разработанных методов диагностики чумы плотоядных с набором гетерологичных и нормальных антигенов и сывороток показали, что гетерологичные вирусу чумы плотоядных антигены и антитела в микро-РСК, РДП, РАЛ и РН с использованием разработанных диагностических препаратов не выявляются, то есть предлагаемые методы - являются специфичными.

В целом, проведённые исследования по разработке и совершенствованию методов лабораторной диагностики чумы плотоядных позволяют заключить, что РСК и РАЛ можно использовать для обнаружения антигена вируса инфекционного гепатита собак в пробах органотканевого материала, фекалий и смывов из носовой и ротовой полостей, а также для обнаружения антител против вируса инфекционного гепатита собак в сыворотках крови переболевших животных. Методы РАЛ являются экспрессными методами диагностики, позволяющими получать результат через 10-30 минут после доставки проб материала на исследование. РАЛ может быть использована как для посмертной, так и прижизненной диагностики инфекционного гепатита собак.

Диагностическая ценность разработанных средств и методов лабораторной диагностики инфекционного гепатита собак была испытана при исследовании полевых проб от собак и лис, доставленных из очагов заболевания в шерокохозяйства Семипалатинской, Восточно-Казахстанской и Павлодарской областей Казахстана, а также проб материала от больных и павших от инфекционного гепатита собак, принадлежащих питомникам и частным лицам в этих же регионах республики.

Результаты исследований показали, что специфический антиген вируса инфекционного гепатита собак был выявлен во всех использованных серологических реакциях, хотя и не во всех пробах с одинаковой эффективностью.

В целом, проведённые исследования по разработке и совершенствованию методов диагностики чумы плотоядных позволяют заключить, что предложенные методы являются эффективными и специфичными.

Применение комплекса различных методов диагностики обеспечивает постановку диагноза на инфекционный гепатит при любой форме заболевания и на любой стадии, даже в случае смешанных инфекций, а также дифференцировать его от парвовирусного энтерита, чумы и других сходных с инфекционным гепатитом собак заболеваний.

Разработанные реакции позволяют получать результат исследований в пределах 0,5 (РАМ и РАЛ) - 16-18 (РДСК и РДП) часов и могут быть

использованы в качестве диагностических методов как для посмертной, так и прижизненной диагностики инфекционного гепатита плотоядных.

С учётом разработанных ранее и предлагаемых нами методов диагностики инфекционного гепатита собак ниже предлагается схема лабораторной диагностики заболевания.

При поступлении проб патологического материала его исследуют серологическими методами (РАЛ, РСК, РДП), при получении положительного результата диагноз считают установленным и в хозяйстве проводят противоэпизоотические мероприятия. В случае отрицательного результата (или сомнительного) осуществляют выделение возбудителя в культурах клеток МДСК а, при необходимости, проводят постановку биопробы на животных того же вида, от которого получен патологический материал. Выделенный вирус идентифицируют в серологических реакциях.

Применение такой схемы лабораторной диагностики инфекционного гепатита собак позволяет, в случае типичной формы течения заболевания, поставить диагноз в течение суток с момента поступления проб на исследование и, соответственно, вовремя принять лечебно-профилактические меры.

3. ВЫВОДЫ

1. В реакциях диффузионной преципитации и связывания комплемента с использованием диагностических наборов при аденовирусной инфекции КРС определено антигенное родство между вирусом инфекционного гепатита собак и аденовирусом крупного рогатого скота II серотипа.

2. Средства и методы лабораторной диагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота можно использовать с целью прижизненной и посмертной диагностики инфекционного гепатита собак с эффективностью в РДП 50-60%, в РСК - 70-80 %.

3. Разработанная схема приготовления диагностической сыворотки против инфекционного гепатита собак и выделения из неё иммуноглобулиновой фракции для сенсibilизации носителя для реакции агглютинации латекса позволяет получить антительные препараты с активностью в РДП 1:4 - 1:8, РСК 1:8-1:16.

4. Разработанная схема приготовления культурального диагностического антигена вируса инфекционного гепатита плотоядных путём инкубирования вакцинного штамма вируса в перевиваемой культуре клеток МДСК с последующим концентрированием клеточного детрита позволяет получить антигенный препарат с активностью в РДП 1:4 - 1:8, РСК 1:20 - 1:40.

5. Разработанные реакции агглютинации латекса для обнаружения антигена и антител, специфичных вирусу инфекционного гепатита собак, можно использовать как для прижизненной, так и посмертной диагностики

заболевания с эффективностью в 70-90% и специфичностью, при исследовании гетерологичных неродственных материалов в 100%.

6. Разработанная реакция агглютинации латекса позволяет обнаруживать антигены и антитела к вирусу инфекционного гепатита собак в течение 8-10 минут с момента постановки реакции.

7. С учётом разработанных и усовершенствованных средств и методов лабораторной диагностики инфекционного гепатита собак модифицирована схема лабораторной диагностики этого заболевания, использование которой позволяет установить диагноз в течение 1-3 часов с момента поступления проб материала на исследование.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Разработанный антигельный вариант реакции агглютинации латекса использовать для прижизненной и посмертной диагностики инфекционного гепатита собак путём обнаружения вирусспецифического антигена в пробах органов и тканей, фекалий и смывов из ротовой и носовой полостей больных и павших животных. По данному методу получено положительное решение на выдачу Предварительного патента Республики Казахстан (№ 2003/0871.1).

2. Разработанный антигельный вариант реакции агглютинации латекса использовать для ретроспективной диагностики инфекционного гепатита собак путём обнаружения противовирусных антител в сыворотках крови больных и переболевших животных.

3. Средства и методы диагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота возможно использовать для диагностики инфекционного гепатита собак.

5. СПИСОК РАБОТ, опубликованных по теме диссертации

1. Разработка экспресс-метода лабораторной диагностики инфекционного гепатита собак / Соавт. Никитин Е.Б. // Социальные и экономические аспекты развития региона: потенциал, проблемы и перспективы: Матер. III Междунар. научн.-практ. конф. - Павлодар, 2003. - С.336.

2. Разработка экспресс-методов лабораторной диагностики инфекционного гепатита собак / Соавт. Никитин Е.Б. // Животноводство и ветеринария в XXI веке: действительность и перспективы развития: Матер. Междунар. Научн.-практ. конф., посвящ. 50-летию СЗВИ. - Семипалатинск 2002. - С. 190-192.

3. Совершенствование средств и методов лабораторной диагностики инфекционного гепатита собак / Соавт. Никитин Е.Б. // Вест, науки Костанайского государственного университета им. Байтурсынова. - 2002. - №6. - С. 104-106.

4. Состояние проблемы и разработка новых экспресс-методов лабораторной диагностики инфекционного гепатита собак / Соавт. Никитин Е.Б. // Матер. Первого Междунар. ветеринар, конгресса. - Алматы, 2002. - С. 148-153.
5. Характеристика возбудителя инфекционного гепатита собак (аналитический обзор) / Соавт. Никитин Е.Б. // Животноводство и ветеринария в XXI веке: действительность и перспективы развития: Матер. Междунар. научно-практич. конф., посвящ. 50-летию СЗВИ. - Семипалатинск 2002. - С. 188-190.
6. Положительное решение о выдаче предварительного патента РК Экспресс-метод лабораторной диагностики инфекционного гепатита собак / Соавт. Никитин Е.Б.// Заявка № 2003/0871.1.

Типография Павлодарского университета
Заказ № 163 Тираж 100 экз
г Павлодар, ул Горького 102/4

04 - 14168