

На правах рукописи

**ЛОБОВА ТАТЬЯНА ПЕТРОВНА**



**Усовершенствование лабораторной диагностики  
аденовирусной инфекции крупного рогатого скота**

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

**А в т о р е ф е р а т**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2006

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина» (ФГОУ ВПО МГАВМиБ)

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор,  
Заслуженный работник высшей школы РФ,  
Лауреат премии правительства РФ  
Белоусова Раиса Васильевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук  
Соколова Надежда Львовна;  
доктор биологических наук, профессор  
Грачев Виктор Павлович

Ведущая организация: Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» (ВНИТИБП).

Защита состоится «27» июня 2006 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.04.01 в Федеративном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина» (109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23). Тел. (095) 377-93-83).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО МГАВМиБ.

Автореферат разослан «26» мая 2006 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Т.Н. Грязнева

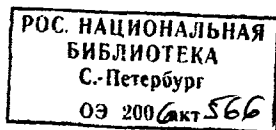
2006А  
14149

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Развитие промышленного животноводства, требующее создания производственных комплексов, обострило проблему респираторно-кишечной патологии крупного рогатого скота (КРС) в хозяйствах РФ. Наиболее актуальными являются заболевания, вызываемые вирусами парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и др. К их числу относятся и аденовирусы.

По данным МЭБ аденовирусную инфекцию (АВИ) более 40 лет регистрируют во многих странах мира (Англии, США, Венгрии, Болгарии, Голландии, Канаде, Австрии и др.). Первые сообщения о неблагополучии хозяйств в отношении АВИ в СССР появились в конце 60-х годов (Алиева Н.А., 1967; Гуненков В.В. и др., 1969). Но до сегодняшнего дня в нашей стране роль аденовирусов в респираторно-кишечной патологии у КРС и вопросы циркуляции различных серотипов возбудителя изучены недостаточно. Аденовирусную инфекцию диагностируют преимущественно у молодняка КРС, она характеризуется острым течением, поражением органов дыхания, пищеварения, конъюнктивитом. У взрослых животных инфекция протекает бессимптомно. Установлено, что аденовирусы являются иммунодепрессантами и способствуют развитию вторичной инфекции. Клинико-эпизоотологическая диагностика АВИ КРС затруднена из-за сходства с другими заболеваниями, поэтому главная роль отводится лабораторной диагностике. Она основана на: - выделении аденовирусов из патологического материала в первичных культурах клеток тестикул бычка (ТБ), почки эмбриона коровы (ПЭК), легких эмбриона коровы (ЛЭК). Однако, методика получения первичных культур клеток трудоемкая. В связи с этим подбор универсальной перемываемой культуры клеток является актуальной задачей; - идентификации выделенных изолятов в реакции преципитации (РДП), реакции иммунофлуоресценции (РИФ), реакции связывания комплемента (РСК), электронной микроскопии. Однако эти методы дают ответ на вопрос лишь о принадлежности выделенных изолятов к той или иной антигенной подгруппе, или к семейству аденовирусов. Создание же системы типовой идентификации является перспективным направлением; - ретроспективной диагностике, исследование парных проб сыворотки крови в серологических реакциях РНГА, ИФА, РИ. Два последних метода, из-за их высокой себестоимости, практически не применяются.

Реакция непрямой гемагглютинации используется для диагностики аденовирусной инфекции в России на протяжении более чем 15 лет. Единственным и существенным недостатком РНГА является то, что в



качестве носителя для антигенов используются эритроциты барана, которые трудно поддаются контролю. При этом длительность хранения таких препаратов не превышает шести месяцев. Актуальным является замена биологических носителей на синтетические, полимерные микросферы, которые могут быть охарактеризованы по заряду, химическому строению, диаметру, распределению частиц по размеру и сохраняют стабильные свойства от партии к партии. Они используются для создания латексных диагностикумов.

**Цель и задачи исследований.** Целью исследований являлось изучение распространения аденовирусной инфекции крупного рогатого скота в некоторых регионах России и усовершенствование её лабораторной диагностики.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить распространение аденовирусной инфекции крупного рогатого скота в некоторых регионах России.

2. Провести скрининг культур клеток, чувствительных к аденовирусам двух подгрупп и определить эффективный способ культивирования для крупномасштабного получения вирусосодержащего материала.

3. Повысить инфекционную активность эталонных штаммов аденовирусов крупного рогатого скота для создания коллекции референс-штаммов.

4. Получить гипериммунные сыворотки к гексону аденовируса на основе оптимизированной схемы иммунизации животных.

5. Разработать условия проведения реакции латекс - агглютинации на основе полученных реагентов.

6. Определить диагностическую ценность и апробировать тест-систему реакции латекс - агглютинации для выявления антител к аденовирусам крупного рогатого скота в пробах сывороток крови, полученных от спонтанно инфицированных и вакцинированных животных.

**Научная новизна.** Изучено распространение аденовирусной инфекции в некоторых регионах России, в том числе и Московской области за период 1998-2003 г. Полученная коллекция эталонных штаммов аденовирусов крупного рогатого скота с высоким инфекционным титром  $6,5-9,5 \text{ ТЦД}_{50} / \text{мл}$  позволяет идентифицировать антитела к аденовирусам в сыворотке крови КРС в РН, РЗГА.

Получена коллекция эталонных штаммов аденовирусов крупного рогатого скота (с первого по десятый серотип) с высокими инфекционными титрами.

Разработан крупномасштабный способ получения аденовируса на культуре клеток Т-1, выращенной на микроносителях (А.с. № 1540070 СССР). Впервые рекомендована единая перевиваемая линия клеток Т-1 для культивирования аденовирусов КРС как I, так и II антигенных подгрупп.

Отработан способ суспензионного культивирования на перевиваемой линии MDBK аденовирусов I подгруппы. Отработан метод постановки реакции нейтрализации для серодиагностики аденовирусной инфекции КРС микрометодом (рационализаторское предложение № 150 от 05.06.89г). Разработан способ получения латексного диагностикума для постановки реакции латекс - агглютинации (патент РФ №2004121606/15 (023348) от 15.07.2004г).

Впервые в качестве антигенов в методе РЛА для выявления специфических антител в крови крупного рогатого скота использован структурный белок гексон аденовируса Bovine - 10. Оптимизирована схема получения гипериммунных сывороток к гексону аденовируса Bovine – 10 на кроликах, для использования в качестве референс-сывороток. Разработана технология производства РЛА-диагностикума для обнаружения антител против аденовирусов КРС.

**Практическая значимость.** Усовершенствован метод серодиагностики аденовирусной инфекции КРС в РНГА (А.с «Способ получения эритроцитарного антигенного диагностикума» № 1774540 от 8 июля 1992 г). Предложена единая перевиваемая культура клеток Т-1 для выделения и культивирования аденовирусов КРС.

Разработан «Способ постановки реакции нейтрализации для серодиагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота микрометодом», рационализаторское предложение № 150 от 05.06.89 г. Разработан «Способ очистки аденовирусов крупного рогатого скота», рационализаторское предложение № 159 от 18.09.1989 г. Разработан и утверждён в установленном порядке Главным управлением ветеринарии МСХ РФ 21 января 2004 г. «Набор эритроцитарных диагностикумов для серодиагностики инфекционного ринотрахеита (ИРТ), парагриппа-3 (ПГ-3), вирусной диареи (ВД), аденовирусной (АДЕНО), респираторно-синцитиальной (РС) инфекций и хламидиоза крупного рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)», который удостоен золотой медали ВДНХ в 2005 году. Разработан способ получения латексного диагностикума для выявления антител к аденовирусам КРС (патент №2004121606/15 (023348) от 15.07.2004г). Разработано «Временное наставление по применению набора РЛА–диагностикума для серодиагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота». Разработаны

«Технические условия набора РЛА - диагностикума для серодиагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота».

**Апробация результатов диссертации.** Результаты работы доложены и обсуждены на научно-производственной конференции молодых ученых ФГОУ ВПО МГАВМиБ (Москва, 2002), III Международной Российско-Иранской конференции «Сельское хозяйство и природные ресурсы» (Москва, 2003), научно-производственной конференции, посвященной 100-летию профессора Н.Г. Кондюрина «Актуальные вопросы микробиологии и инфекционной патологии» (Омск, 2004), научно-производственной международной конференции молодых ученых «Научные основы производства ветеринарных, биологических препаратов» (Щелково, 2004), на межкафедральном совещании профессорско - преподавательского состава ФГОУ ВПО МГАВМиБ (Москва, 2006).

**Основные положения и результаты, выносимые на защиту:**

1. Широта распространения аденовирусной инфекции крупного рогатого скота в некоторых регионах России.

2. Создание коллекции референс - штаммов аденовирусов КРС с высоким инфекционным титром.

3. Скрининг культур клеток, чувствительных к аденовирусам двух подгрупп и способов крупномасштабного получения вирусосодержащего материала.

4. Получение гипериммунных сывороток крови к гексону аденовирусов на основе оптимизированной схемы иммунизации животных.

5. Технология разработки РЛА для выявления антител к аденовирусам крупного рогатого скота на основе получения высокоактивных вирусосодержащих клеточных суспензий, специфических антигенов-гексонов и гипериммунных сывороток.

6. Оптимизация условий проведения РЛА по выявлению антител к аденовирусам крупного рогатого скота.

7. Результаты апробации разработанной тест-системы РЛА в экспериментальных и производственных условиях.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 19 научных работ, получено 3 авторских свидетельства, 1 патент и 2 рационализаторских предложения.

**Объём и структура диссертации.** Материалы диссертации изложены на 130 страницах машинописного текста и включают введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, выводы, практические предложения, список использованной литературы (158 источников,

из которых 76 отечественных и 82 иностранных). Работа содержит 16 таблиц, 16 рисунков и 6 страниц приложений.

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Материалы и методы исследований

Работа выполнена в период с 1989 по 2006 годы на кафедре ветеринарной вирусологии ФГОУ ВПО МГАВМиБ и ФГУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория».

При изучении эпизоотической ситуации по некоторым вирусным заболеваниям использовали данные отчетов государственных ветеринарных служб РФ и результаты собственных исследований, проведенных в неблагополучных хозяйствах Московской области от животных с респираторно-кишечным синдромом, исследовали парные пробы сывороток.

В работе использовали штаммы аденовирусов Bovine-10 серотип 1, Bovine-19 серотип 2, WBR-1 серотип 3 (первая антигенная подгруппа), ТНТ-62 серотип 4, В/ 65 серотип 5, 671/130 серотип 6, Fusuroi серотип 7, Misk/67 серотип 8, Sofia 4/67 серотип 9, Stendhal серотип 10 (вторая антигенная подгруппа), КЛБ серотип 1, Русь 18/81 серотип 7- два полевых изолята, депонированные в коллекции ВГНКИ и имеющие регистрационные номера как вакцинные штаммы № 30 и № 31 от 04.12.85 г. и 06.06.86 г. При изучении культуральных свойств штаммов аденовирусов крупного рогатого скота использовали первичные и перевиваемые культуры клеток: ТБ, ПЭК, МДБК, ЛЕК, ППЭК Taurus-1 (Т-1), Taurus-2 (Т-2), Taurus - 4 (Т-4).

В качестве ростовых сред для первичных и перевиваемых культур клеток использовали общепринятые в вирусологии питательные среды в соотношениях, оптимальных для каждой из культур клеток.

Применяли три метода культивирования – стационарный, суспензионный и метод выращивания культуры клеток на микроносителях Цитолар – 3 (НПО «Биолар», г. Рига).

Инфекционную активность полученных вирусов определяли путём титрования в чувствительных культурах клеток, выражая титр вируса в  $Lg$  ТЦД<sub>50/см<sup>3</sup>, по общепринятой методике Reed и Mench (1938).</sub>

Клонирование аденовирусов проводили по методу бляшек.

Выделение и очистку аденовирусных белков-гексонов из культуральной вируссодержащей суспензии проводили методом двухэтапной хроматографии (гидрофобной и анионообменной) в модификации Хилько С.Н. с соавтор. (1986). Чистоту препаратов гексонов оценивали методом электрофореза в ПААГ в буферной системе Леммли (1970).

Для получения специфических сывороток использовали культуральную вирусосодержащую жидкость с активностью  $9,0 \pm 0,5 \text{ Lg TЦД}_{50/\text{см}^3}$  и гексон того же вируса в концентрации 0,2 мг/мл и 0,5 мг/мл. Активность полученных сывороток крови определяли в РН, РНГА и РЛА.

Использовали полимерные микросферы для получения конъюгатов для РЛА – сополимерную суспензию стирола и стиролсульфоната натрия (ПСТ-ССН) с диаметром частиц 1,15 мкм, с величиной потенциала - 44,4 мВ и стирол – акролеиновую (ПСТ-АК) с диаметром частиц, равным 1,7 мкм, с величиной потенциала -52,4 мВ.

Серологические реакции проводили: РН - по стандартной методике микрометодом с постоянной дозой вируса ( $100 \text{ TЦД}_{50/\text{см}^3}$ ) и двукратными разведениями сывороток; РНГА - микрометодом по стандартной методике с набором эритроцитарных диагностикумов для серодиагностики инфекционного ринотрахеита (ИРТ), парагриппа-3 (ПГ-3), вирусной диареи (ВД), аденовирусной (Адено), респираторно-синцитиальной (РС) инфекций и хламидиоза КРС (ТУ 93886100049295404); РДП - согласно общепринятой методике. В качестве испытуемых проб биологического материала (n=1807) использовали сыворотки крови КРС, полученных из хозяйств Московской области.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием программы Excel для Windows. Значение критерия достоверности оценивали по таблице вероятности Стьюдента-Фишера в зависимости от объёма анализируемого материала. В качестве достоверного интервала был выбран уровень вероятности  $P=0,95$  (уровень значимости  $p<0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Изучение распространения аденовирусной инфекции крупного рогатого скота в некоторых регионах России

Для определения этиологической роли некоторых вирусов в респираторно-кишечной патологии КРС в хозяйствах РФ нами была проанализирована официальная отчетность за 1998 - 2003 гг ветеринарных служб административных единиц РФ по форме 4-Вет.

За анализируемый период исследовано 13360 животных на аденовирусную инфекцию, в 826 (6,0 %) случаях установлен положительный диагноз. Количество заболевших телят аденовирусной инфекцией на протяжении пяти лет возросло с 3,0% в 1998 г до 12,4% в 2002 г. Этот факт говорит о важной роли данной инфекции в структуре респираторно-кишечной патологии крупного рогатого скота в хозяйствах РФ.



## **Изучение роли аденовируса крупного рогатого скота в хозяйствах Московской области за период 1998-2003 гг.**

Роль аденовируса в респираторно-кишечной патологии телят в хозяйствах Московской области изучали в период 1998-2003 годы. Для этого исследовали парные и одиночные пробы сывороток крови. Проводили дифференциальную диагностику с помощью набора для серодиагностики инфекционного ринотрахеита (ИРТ), парагриппа-3 (ПГ-3), вирусной диареи (ВД), аденовирусной (Адено), респираторно-синцитиальной (РС) инфекций методом РНГА. На аденовирусную инфекцию было исследовано 783 животных, выявлено серопозитивных 143 (14%).

Заболевание аденовирусной инфекцией, как правило, регистрировали в ассоциации с вирусом ВД, реже с ПГ-3, РС. Самый высокий уровень заболеваемости аденовирусной инфекцией в хозяйствах Московской области по нашим исследованиям отмечали в 2002 г (15 %), который колебался в пределах от 6,8 % до 15,0%. Из 108 обследованных хозяйств во всех случаях установлена циркуляция вирусов ПГ-3 в 100% , ИРТ 63,8 %, вируса ВД 38,8 %, аденовируса - 36,2 %, вируса РС - 4,6% хозяйств.

Таким образом, при изучении этиологической структуры респираторно-кишечной патологии в хозяйствах РФ и Московской области нами раскрыта существенная роль вирусов ПГ-3, ИРТ. Вспышки аденовирусной инфекции ежегодно регистрируются в тех регионах, где проводится лабораторная диагностика данного заболевания. Учитывая отсутствие специфической профилактики аденовирусной инфекции, мы прогнозируем осложнение эпизоотической ситуации в дальнейшем.

### **Скрининг клеточных культур, чувствительных к аденовирусам крупного рогатого скота**

В диагностике аденовирусной инфекции основную роль играет лабораторная диагностика. Единственной чувствительной системой для репродукции аденовирусов является культура клеток. Ветеринарные лаборатории РФ используют для диагностики АВИ крупного рогатого скота дорогостоящие первичную культуру клеток и в низком диапазоне чувствительности перевиваемые культуры клеток, что в современных условиях не экономично и малоэффективно.

В нашу задачу входило подобрать единую, высокочувствительную, надежную перевиваемую культуру клеток, как для первой, так и для второй подгруппы аденовирусов КРС и предложить ее ветеринарной

практике. Для этого использовали штаммы аденовирусов Bovine -10 серотип 1, Bovine-19 серотип 2, WBR-1 серотип 3 (первая антигенная подгруппа), ТНТ-62 –серотип 4, В/65 серотип 5, 671/130 серотип 6, Fusuroi серотип 7, Misk/67 серотип 8, Sofia 4/67 серотип 9, Stendhal серотип 10 (вторая антигенная подгруппа) и культивировали их в первичных ТБ (тестикулы бычка), ЛЭК (лёгкое эмбриона коровы), ПЭК (почка эмбриона коровы) и в перевиваемых культурах клосток почки теленка Таурус-1 (фибробластоподобный клон), в двух эпителиоподобных клонах Т-2, Т-4, ППЭК (почка эмбриона коровы), ТР (трахея коровы), ПТ- 80 (почка теленка), MDBK (почка эмбриона теленка).

В результате проведённых исследований установлено, что все эталонные штаммы аденовирусов (с 1 по 10 серотип) репродуцировались в перевиваемой культуре клеток Таурус-1. Перевиваемые культуры клеток Т-2, Т-4 оказались чувствительны лишь к аденовирусам первой антигенной подгруппы. Полученные данные характеризуют перевиваемую культуру клеток Таурус-1 как единую, чувствительную систему, позволяющую использовать её в диагностике АВИ крупного рогатого скота в ветеринарных лабораториях РФ, и рекомендовать её в качестве субстрата для изготовления вирусных препаратов.

### **Клонирование аденовирусов крупного рогатого скота**

На следующем этапе работы решалась задача повышения инфекционной активности аденовирусов КРС. Коллекция эталонных штаммов аденовирусов КРС с 1-10 серотип была получена от доктора Barta А. из Венгрии. Аденовирусы крупного рогатого скота культивировались в известных культурах клеток в очень низких инфекционных титрах от 1,5-3,5 Lg ТЦД<sub>50/мл</sub>. С целью повышения инфекционного титра мы использовали метод клонирования вируса в культуре клеток Т-1 под агаровым покрытием (метод блюшек).

В результате были получены вирусы с инфекционным титром от 6,5 lg ТЦД<sub>50/ мл</sub> до 9,5 lg ТЦД<sub>50/ мл</sub>. Высокий инфекционный титр позволял получить “урожай” вирусов уже через 48 часов после заражения, что сокращало сроки культивирования на 10 суток .

В итоге проведенной работы была получена коллекция аденовирусов с высоким инфекционным титром.

## **Культивирование аденовируса в культуре клеток Т-1, выращенной на микроносителях «Цитолар»**

Последующие исследования были направлены на выбор способов культивирования перевиваемых культур клеток для репродукции аденовирусов, при которых в короткие сроки можно получить накопление вируса с высокой инфекционной активностью, в больших объёмах, при одновременной экономии питательных сред, сывороток, сокращении сроков эксплуатации оборудования. Используя мировой опыт в области выращивания клеток на микроносителях и в суспензии, мы применили данные способы культивирования для крупномасштабного накопления аденовирусов. Нами разработан способ выращивания перевиваемой культуры Т-1 на микроносителях (МН) «Цитолар-3». Были проведены эксперименты на пригодность МН по важным характеристикам: токсичность, равномерность распределения клеток на МН при посеве, равномерность распределения по объёму культиватора в процессе выращивания клеток, возможность проведения визуального контроля условий культивирования и роста клеток. Оптимизирована посевная концентрация клеток на заданную площадь микроносителя 10 мл (1 мл МН составляет около  $150 \text{ см}^2$ ), для формирования монослоя через 72 часа.

Оптимальная посевная концентрация клеток на 1 мл микроносителя составила  $0,4 \cdot 10^6$ . При этом полный монослой на МН формировался на третьи сутки с высокой концентрацией клеток в 1 мл-  $1,6 \cdot 10^7$  и коэффициентом прироста 4,0. При накоплении аденовируса в перевиваемой культуре клеток Т-1, выращенной на МН, время максимальной репродукции вируса сокращалась в два раза, а инфекционная активность увеличивалась и составляла 8,5-9,5 Lg ТЦД<sub>50/мл</sub>. При стационарном способе культивирования максимальный инфекционный титр вируса регистрировали через 96 часов после начала культивирования, он составлял 4,8 Lg ТЦД<sub>50/мл</sub>.

Таким образом, предлагаемый способ получения аденовируса с использованием культуры клеток Т-1, выращенной на микроносителях, позволяет получить аденовирус в нужных объёмах и с высоким инфекционным титром.

### **Культивирование аденовируса первого типа в суспензионной культуре клеток MDBK**

Ещё один способ культивирования вирусов для производства диагностикумов и вакцин основан на культивировании вирусов в суспензионной культуре клеток.

Мы поставили задачу выяснить возможность использования перевиваемой линии клеток MDBK для суспензионного культивирования с целью репродукции в ней аденовируса крупного рогатого скота – Bovine – 10. Культура клеток Т-1 оказалась строго субстрат-зависимой. В предварительных опытах, после адаптации культуры клеток MDBK к суспензионному росту, логарифмическая фаза роста наступала через 14 дней после начала культивирования. Данную популяцию клеток брали в качестве расплодки с концентрацией клеток 400000 клеток в 1,0 мл в количестве 250 мл и помещали в колбу “Bellco”(США), объёмом 1,0 л.

Вирус культивировали при 37°C при постоянном перемешивании 16-20 об/мин. Для определения сроков оптимального накопления вируса была изучена кривая репродукции в суспензионной культуре клеток. Были отобраны пробы вируса для титрования через 24,48,60,96 часов. Установлено, что максимальную продукцию вируса наблюдали через 60 часов. К этому сроку инфекционный титр вируса достигал 8,5-9,5 Lg ТЦД<sub>50/мл</sub>. Данный способ предлагается для культивирования аденовирусов крупного рогатого скота с целью получения вирусосодержащей суспензии в больших объемах.

### **Получение реагентов набора РЛА**

В задачу разработки иммунохимических реагентов набора РЛА входило изучение и получение:

- очищенных антигенов аденовируса первого типа Bovine – 10;
- положительной сыворотки крови;
- отрицательной сыворотки крови;
- латексных микросфер, с заданными характеристиками.

**Получение аденовирусных антигенов.** По данным литературы наличие в составе гексона аденовирусов первой антигенной подгруппы перекрёстно реагирующих антигенных детерминант самой широкой специфичности явилось основанием для создания универсального диагностикума.

В качестве антигена нами был выбран аденовирус Bovine – 10. Так как при репродукции данного вируса помимо получения высокого инфекционного титра 9,5 Lg ТЦД<sub>50/мл</sub> образуется большое количество гексона (в среднем 5,0 мг гексона с 5,0 литров культурального вируса). Это свойство сохранялось и после клонирования данного вируса. В результате использования данной методики нами получен гексон аденовируса Bovine – 10 95 %-ной очисткой. Иммунохимическую активность и специфичность полученного антигена проверяли после иммунизации кро-

ликов для получения гипериммунных сывороток и иммобилизации гексона на латексные микросферы.

**Получение гипериммунных сывороток к гексону аденовируса первого серотипа Bovine-10.** Основными задачами в нашей работе были - совершенствование известной схемы иммунизации на основе использования в качестве иммуногена очищенного препарата - гексона аденовируса Bovine -10 и сочетание последовательных внутрикожных и внутривенных введений с интервалом в две- три недели. Продолжительность всего цикла составила 160 дней. В качестве продуцентов сыворотки крови мы использовали кроликов породы шиншилла массой 2,5 – 3 кг. В качестве иммуногенов служили: штамм аденовируса Bovine-10, накопленный в культуре клеток Т-1, с активностью 9,5 Lg ТЦД<sub>50</sub>/мл и гексон того же вируса. Для отработки оптимальной дозы для иммунизации брали две концентрации гексона (0,2 и 0,5 мг/ мл). Полученные сыворотки исследовали в РН, РНГА, РЛА.

Наиболее высокие титры антител в реакциях РН, РНГА, РЛА ( $8,5 \pm 0,16$ ;  $10,5 \pm 0,25$  и  $11,2 \pm 0,3 \log_2$  соответственно) получены у животных второй группы, где в качестве иммуногена использовали гексон в концентрации 0,2 мг/мл, что позволяло получать активные, специфичные сыворотки с длительным сроком хранения.

**Получение конъюгатов для постановки РЛА.** На первых этапах работы нами был проведён скрининг ПМ (более 10 вариантов) с разными химическими характеристиками и свойствами. Из всего многообразия в качестве носителей биолигандов (антигенов) были выбраны два вида полимерных микросфер, которые отвечали требованиям, предъявляемым к полимерным носителям биолигандов, используемым в РЛА:

1. Узкое распределение по размерам, что делает возможным определить площадь поверхности носителя.

2. Содержание на ПМ функциональных групп для ковалентного связывания с биолигандом.

3. Индивидуальность частиц в водной и буферных фазах (контроль на спонтанную агглютинацию в данных системах).

**Результаты подбора условий получения диагностикума для РЛА.** Иммобилизацию проводили, используя:

- полимерные микросферы (ПСТ-ССН), (ПСТ-АК);
- биолиганды (аденовирус Bovine -10 с инфекционным титром 9,5 Lg ТЦД<sub>50</sub>/мл);
- гексон аденовирус Bovine -10 в концентрации 0, 2 и 0,5 мг/мл;

- в водной (бидистиллированная вода) и буферной (ФБР) фазе при рН 6,0-6,4; 7,2-7,4 8,2-8,4;

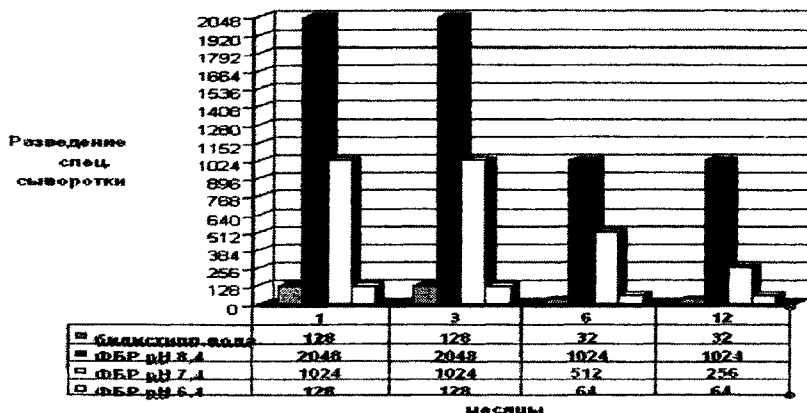
- температурный режим сенсibilизации + 18-20°C ; +4-8°C ; +37°C ;

- режим инкубации 5, 12 и 24 часа.

Установлено, что при иммобилизации ПМ - ПСТ-АК на фосфатно-буферном буфере (рН 8,4) при +4°C в течение 12 часов лучшие результаты по активности и специфичности через двенадцать месяцев (срок наблюдения) показывал конъюгат «ПСТ-АК – гексон 0,5 мг/мл» (рис. 1).

**Подбор условий постановки РЛА.** Для повышения демонстрационности реакции нами были использованы различные разбавители, с которыми испытывали конъюгат «ПСТ-АК – гексон 0,5 мг/мл», гипериммунные сыворотки к вирусам ПГ- 3, ВД, РС, аденовирусам. Одновременно сыворотки крови исследовали в РНГА. В реакции использовали различные варианты разбавителей.

Установлено, что разбавитель, приготовленный на ФБР 7,2-7,4+твин-20 в разведении 1:40000 +1% сыворотки кролика, значительно повышает демонстрационность реакции. Отмечалась четкая агглютинация в положительных случаях (++++) с гомологичными, при четких отрицательных результатах (-) с гетерологичными сыворотками крови, что является показателем, как специфичности, так и активности предлагаемой тест-системы.



1. Чувствительность РЛА ПМ (ПСТ- АК) библиганд гексон аденовируса Bovine – 10 в концентрации 0,5 мг/мл

### Апробация набора реагентов РЛА

Задачей следующего этапа нашей работы было испытание набора реагентов РЛА с использованием различных образцов сывороток на специфичность, чувствительность, воспроизводимость результатов. Для этого набор реагентов РЛА испытывали с гомологичными и гетерологичными сыворотками крови, полученными от разных видов животных, в двух повторах:

- пробы сывороток крови КРС полевые, содержащие антитела к вирусам ИРТ и ПГ- 3 (2 сыворотки). Сыворотки были исследованы в РН. Титр вируснейтрализующих антител к вирусам ИРТ – 1:32, ПГ-3 -64;

- проба сыворотки специфической, содержащей антитела к хламидиям, полученной из набора флуоресцирующих иммуноглобулинов (серия 3, госконтроль 3, дата изготовления 2005 г., ВНИВИ, г. Казань, ТУ – 10.19.2788), титр в РСК 1:10;

- проба сыворотки крови КРС (полевая), содержащая антитела к вирусу ВД. Титр вируснейтрализующих антител 1:32;

- сыворотки крови, полученные от 10 крыс, иммунизированных вакциной против аденовирусной инфекции КРС. Титр вируснейтрализующих антител составлял от 1:32 до 1:256;

- сыворотки крови от 10 телят, не принимавших молозиво и не содержащих антител к вирусам ИРТ, ПГ-3, ВД, РС. Сыворотки проверены в РН;

- пробы сывороток крови кролика, содержащие антитела к аденовирусам первого и седьмого серотипа, полученные из музея кафедры вирусологии ФГОУ ВПО МГАВМиБ. Титр вируснейтрализующих антител 1:32 и 1:32 соответственно;

- сыворотки крови от КРС (полевые) в количестве 379 проб, в том числе парные от 10 телят, полученных из 28 хозяйств Московской области. Сыворотки крови были исследованы в РЛА, РНГА, РН.

Как видно из табл. 1, полученный конъюгат с гетерологичными сыворотками давал отрицательные результаты. Титры антител с гомологичными сыворотками соответствовали  $11,0 \log_2$  к первому и  $9,0 \log_2$  к седьмому серотипу аденовирусов.

В дальнейшем исследовали пробы сыворотки крови от вакцинированных крыс. Конъюгат для реакции латекс- агглютинации выявлял антитела в титрах от 1:16 до 1:256 у вакцинированных животных, причем эти данные коррелировали с результатами в РНГА и в РН и превышали последние в среднем в четыре раза.

### 1. Результаты исследования конъюгат для РЛА на специфичность и чувствительность.

Наименованием сывороток		Титр антител в $\log_2$
Гетерологические	против вируса ПГ-3	0
	против вируса ИРТ	0
	против вируса ВД	0
	против Хламидий	0
	против вируса РС	0
	не содержат антител против вирусов ИРТ, ПГ-3, ВД, РС	0
Гомологические	против аденовируса первого серотипа 1-ая антигенная подгруппа	11,0 $\log_2$
	против аденовируса седьмого серотипа 2-ая антигенная подгруппа	9,0 $\log_2$

При исследовании парных проб сыворотки от телят было установлено, что конъюгат для РЛА выявлял сероконверсию к аденовирусам с кратностью прироста в четыре и более раз, что коррелировало с результатами РНГА и РН.

На следующем этапе провели сравнение результатов исследований сывороток крови КРС в РЛА и РНГА (табл. 2).

### 2. Сравнительные результаты РЛА и РНГА, полученные при исследовании полевых проб сыворотки крови крупного рогатого скота

Наименование реакции	Всего исследовано проб	Результаты исследования		
		положительные	отрицательные	сомнительные
РНГА	379	97	282	0
РЛА	379	96	280	3

При исследовании полевых проб сыворотки установлено, что диагностическая чувствительность РЛА по отношению к РНГА составила 98,9%, специфичность и совпадаемость - 99,2%. При этом коэффициент корреляции при исследовании положительных и отрицательных проб составил 0,9.

РЛА: 96 проб положительных, 280 проб отрицательных.

РНГА: 97 проб положительных, 282 пробы отрицательные.

Чувствительность –  $(96 : 97) \times 100 = 98,9\%$

Специфичность –  $(280 : 282) \times 100 = 99,2\%$

Совпадаемость –  $(96 + 280) : 379 \times 100 = 99,2\%$



Таким образом, в результате проведенных исследований получена тест – система РЛА по выявлению антител к аденовирусам крупного рогатого скота, обладающая высокой чувствительностью и специфичностью.

### ВЫВОДЫ

1. Изучено распространение и установлена этиологическая роль аденовирусов крупного рогатого скота в некоторых регионах России, процент больных животных колебался в пределах от 3,0 % до 12,4 %. В хозяйствах Московской области от 6,8 % до 15,0%.

2. Проведен скрининг клеточных культур клеток и способов культивирования аденовирусов КРС. Показано, что перевиваемая линия клеток почки теленка Т-1 является единой чувствительной культурой клеток для аденовирусов I и II серологических подгрупп. Установлено, что при крупномасштабном получении аденовирусов методами суспензионного культивирования и в клетках, выращенных на микроносителях, их инфекционная активность достигает 7,5- 9,5 lg ТЦД<sub>50/мл</sub>

3. Получена коллекция эталонных штаммов аденовирусов десяти серотипов (1-10) с высоким инфекционным титром 6,5 – 9,5 lg ТЦД<sub>50 /мл</sub>, что позволит идентифицировать антитела к аденовирусам в сыворотках крови КРС в РН, РЗГА.

4. Оптимизирована схема получения гипериммунных сывороток крови на кроликах к гексону аденовируса Bovine-10 для РЛА тест- системы с титром антител 11,8 log<sub>2</sub>.

5. Разработаны условия проведения реакции латекс – агглютинации. Впервые в качестве специфических антигенов в тест-системе РЛА по выявлению антител к аденовирусам крупного рогатого скота использованы структурные белки аденовируса – гексоны, которые при иммобилизации на полимерные микросферы образуют ковалентную связь с высокой специфичностью и активностью, что позволяет выявлять антитела к аденовирусам крупного рогатого скота.

6. Разработан метод выявления антител к аденовирусам крупного рогатого скота в сыворотке крови больных, реконвалесцентов и вакцинированных животных. Показана высокая чувствительность и специфичность реагентов РЛА. Диагностическим титром антител при аденовирусной инфекции крупного рогатого скота по результатам исследования сыворотки крови в РЛА следует считать 1: 8 и выше.

7. Установлена чувствительность разработанной тест – системы РЛА по отношению к РНГА, которая составила - 98,9%, специфичность -

99,2% . Результаты РЛА и РНГА совпадали в - 99,2 % случаев, коэффициент корреляции составил 0,9.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

Материалы исследований по разработке технологии РЛА тест- системы для выявления антител к аденовирусам крупного рогатого скота вошли в следующие (нормативные) документы:

- технические условия по изготовлению и контролю набора для серодиагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота методом РЛА. ( Утверждены 12 апреля 2006 года, ректором МГАВМиБ им. К.И. Скрябина;

- методические указания по серодиагностике аденовирусной инфекции крупного рогатого скота методом РЛА (Утверждены 12 апреля 2006 года, ректором ФГОУ ВПО МГАВМ);

- методические рекомендации по использованию метода гибридизации (с помощью молекулярных зондов) для диагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота. (Утверждены ГУВ Госагропрома СССР от 30 марта 1989 г.);

- методические указания по серодиагностике аденовирусной инфекции крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа (ИФА). Утверждены ГУВ Госагропрома СССР 18 мая 1989 г.;

- методические указания по серодиагностике аденовирусной инфекции крупного рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинации (Утверждены ГУВ Госагропрома СССР 10 апреля 1989 г.);

- ТУ и временные методические указания на набор эритроцитарных диагностикумов для серодиагностики инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, аденовирусной, респираторно- синцитиальной инфекций и хламидиоза крупного рогатого скота в реакции непрямой гемагглютинации (Утвержденные ГУВ МСХ РФ 21.01.2004 г).

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Носач Л.Н. Изучение антигенного родства аденовирусов человека и крупного рогатого скота методом флуоресцирующих антител /Л.Н.Носач, Р.В. Белоусова, Н.П. Вацнак, Н.С. Дяченко, В.Н. Сюрин, Т.П. Строкова, Л.М. Коленкова //Микробиологический журнал.- Киев, 1985, С. 67-70.

2. Носач Л.Н. Применение сыворотки к гексону аденовирусов человека для обнаружения аденовирусов крупного рогатого скота методом флуоресцирующих антител /Л.Н.Носач, Р.В. Белоусова, Т.П. Строкова //

Сб. науч. тр. Ин-та молекулярной биологии и генетики АН УССР, Киев, 1986, С. 78-79.

3. Кругляк В.А. Клонирование фрагментов ДНК аденовирусов крупного рогатого скота ВАУ-3 в плазмиде рiC 19 /В.А. Кругляк, Р.В. Белоусова, Т.П. Строкова и др. //Доклады ВАСХНИЛ, 1987.- № 11.- С. 41-43.

4. Белоусова Р.В. Культивирование аденовирусов крупного рогатого скота в культуре клеток, выращенной на микроносителях /Р.В. Белоусова, Т.П. Лобова, М.А. Завальный, И.В. Третьякова // Вопросы ветеринарной биологии: Сб.науч.тр.- М.:МВА, 1988.- С. 85-86.

5. Белоусова Р.В. Культивирование аденовируса первого типа в суспензионной культуре клеток /Р.В. Белоусова, Т.П. Лобова, Т.И. Понамарева и др. //Интенсификация сельскохозяйственного производства в условиях радикальной экономической реформы: Сб. науч. тр.- Сумы, 1989, С. 169-171.

6. Третьякова И.В. Получение гипериммунных сывороток к некоторым гексонам аденовирусов крупного рогатого скота /И.В. Третьякова, Р.В. Белоусова, Т.П. Лобова, и др. //Достижения науки и техники АПК, 1989.- № 1, С. 45-46.

7. Белоусова Р.В. Культивирование ротавируса и вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в культуре клеток на микроносителях /Р.В. Белоусова, В.Н. Муравьев, Т.М. Бабурина, И.В. Третьякова, Т.И. Резова, И.А. Петрова, Т.П. Лобова //Интенсификация сельскохозяйственного производства в условиях радикальной экономической реформы: Сб.науч.тр.- Сумы, 1989, С. 171-172.

8. Белоусова Р.В. Использование иммуноферментного анализа для серодиагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота /Р.В.Белоусова, И.В. Третьякова, Т.П. Лобова и др. //Ветеринария, 1989, № 8, С. 28.

9. Кругляк В.А. Структурный анализ ДНК аденовирусов крупного рогатого скота /В.А. Кругляк, Р.В. Белоусова, Т.П. Лобова и др. //Вестник сельскохозяйственной науки, 1989.- № 12, С. 148.

10. Лобова Т.П. Применение фильтрационно-хроматографического метода для очистки аденовирусов /Т.П. Лобова, Р.В.Белоусова, В.П. Копенкин и др. //Рац. предложение № 159 от 18.09. 1989 г.

11. Лобова Т.П.Способ постановки реакции нейтрализации для серодиагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота микрометодом. /Т.П. Лобова, Р.В. Белоусова. //Рац. предложение № 150 от 05.08. 1989 г.

12. Лобова Т.П. Способ выращивания вирусов – возбудителей респираторных и кишечных заболеваний крупного рогатого скота /Т.П. Ло-

бова, Р.В. Белоусова, В.Н. Сюрин и др. //Авторское свидетельство № 1540070 от 1 октября 1989 г.

13. Белоусова Р.В. Способ получения антигена аденовирусов крупного рогатого скота /Р.В. Белоусова Л.Л. Миронова, Н.К. Преображенская, Л.Н. Носач, Т.П. Лобова //Авторское свидетельство № 1632973 8 ноября 1990 г.

14. Белоусова Р.В. Применение фильтрационно -хроматографического метода для очистки аденовирусов //Р.В. Белоусова, Т.П. Лобова, В.П. Копенкин и др. //Ветеринария, 1990, № 11, С. 53.

15. Белоусова Р.В. Экспериментальная аденовирусная инфекция инфекция у телят /Р.В. Белоусова, А.Е. Копенкин, В.И. Корольков, Т.П. Лобова //Использование физических и биологических факторов в ветеринарии и животноводстве: Сб.науч.тр.- Витебск, 1992, С. 102.

16. Белоусова Р.В. Способ получения эритроцитарного антигенного диагностикума /Р.В. Белоусова, Т.П. Лобова, В.С. Фролов, А.Е. Копенкин //Авторское свидетельство № 1774540 от 8 июля 1992 г.

17. Красота А.Ю. Комплексный мониторинг эпизоотической ситуации по респираторно-кишечной патологии крупного рогатого скота в хозяйствах Московской области /А.Ю. Красота, Т.П. Лобова, С.В. Вахрушев и др. // The 3<sup>rd</sup> International LRAN and RASSIA Conference. Agriculture and Natural Resources. Abstracts. /М. МТАА- 2002- С. 137-138.

18. Лобова. Т.П. Использование перевиваемой культуры клеток Таурис – 1 в диагностике аденовирусной инфекции крупного рогатого скота /Т.П. Лобова, И.В. Третьякова, Р.В. Белоусова //Актуальные вопросы микробиологии и инфекционной патологии животных: Сб.науч.тр.- Омск, 2004- С. 395-400.

19. Белоусова. Р.В. Способ получения латексного диагностикума для постановки реакции латекс-агглютинации /Р.В. Белоусова, Т.П. Лобова, И.А. Грицкова и др. /Патент № 2004121606/15 (023348).

1

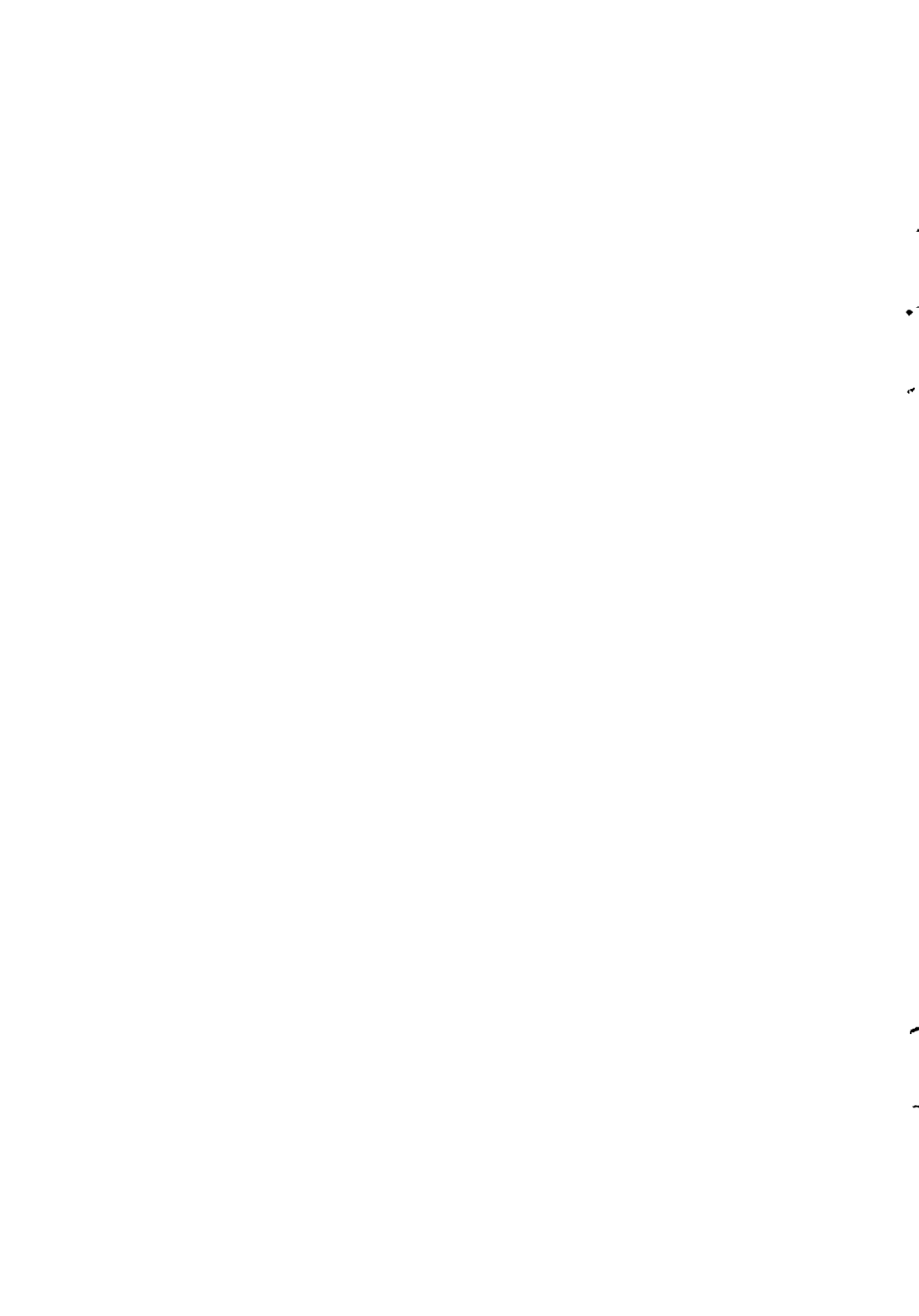
2

3

4

5

6



Принято к исполнению 24/05/2006  
Исполнено 24/05/2006

Заказ № 427  
Тираж 100 экз

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900  
Москва, Варшавское ш , 36  
(495) 975-78-56  
(495) 747-64-70  
[www.autoreferat.ru](http://www.autoreferat.ru)

2006A  
14149

47