

УДК 619:616.98:578.828.11:636.2

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГИПЕРИММУННОЙ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ BLV И ОЦЕНКА ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

П. Н. Смирнов, доктор ветеринарных наук, профессор
Новосибирский государственный аграрный университет
E-mail: ngaufiziologi@mail.ru

Ключевые слова: инфекция BLV, энзоотический лейкоз, гипериммунная сыворотка, козы-доноры, экспериментальная проверка эффективности ГИС

Реферат. Многочисленными экспериментами и клиническими исследованиями, проведёнными в 80–90-е годы прошлого столетия в нашей стране и за рубежом, установлено, что инфекция вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV-инфекция) является обязательным, но не единственным фактором развития лейкозного процесса. Вторым, не менее существенным, фактором является генетическая предрасположенность к данному заболеванию. На третье место ставят иммунодефициты как первичной, так и вторичной природы (приобретённые). Наиболее критическим (состояние наибольшего риска) периодом возможного заражения животных BLV является ранний постнатальный период (до 30-дневного возраста) в силу особенностей формирования у них иммунологической резистентности в этот период. В этой связи обосновано преимущество применения пассивной иммунопрофилактики инфекции BLV, приведена методика приготовления козьей гипериммунной сыворотки (ГИС) против вируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV). Показано целевое применение ГИС для профилактики лейкозной инфекции телят в ранний постнатальный период в неблагополучных по данной инфекции стадах. Применение ГИС однократное. Профилактическая эффективность ГИС проверена на 18 новорожденных ягнятах, экспериментально инфицированных BLV-содержащим биоматериалом по фону разовой дозы ГИС, введенной животным *per os*. Получен 100 %-й профилактический эффект. В контрольной группе телят (без применения ГИС) инфицированность составила 50 %.

Современные системы интенсивного животноводства при всей своей производственной эффективности создают, однако, дополнительные условия для распространения лейкоза крупного рогатого скота в неблагополучных по этой нозологии стадах – значительная концентрация животных на ограниченной территории, наличие технологических стрессвызывающих факторов, нередко отсутствие пастеризаторов для обработки сборного молока, выпаиваемого телятам-молочникам.

В таких условиях все большую актуальность приобретает проблема разработки эффективных средств профилактики и борьбы с энзоотическим лейкозом крупного рогатого скота, особенно у телят в ранний постнатальный период (до момента формирования у них собственной зрелой иммунокомпетентной системы).

Многочисленными исследованиями показано, что инфекция BLV является обязательным, хотя и не единственным, условием развития лейкозного процесса [1–12]. Поэтому при наличии определен-

ных условий, в частности первичных и вторичных иммунологических дефектов, инфицированные BLV животные могут заболеть лейкозом.

Следовательно, профилируя инфекцию BLV у животных, мы тем самым исключаем риск заболевания их лейкозом.

Наиболее опасным периодом инфицирования BLV у крупного рогатого скота является ранний постнатальный период (до 30 дней) в силу особенностей формирования у них иммунологической резистентности в этом возрасте.

В экспериментальных исследованиях на опухлях вирусной природы было показано, что своевременное проведение иммунопрофилактики уменьшает онкогенные потенции вирусов и предупреждает возникновение опухолей у животных.

В настоящее время у нас в стране и за рубежом не прекращаются работы как по созданию эффективных вакцин против BLV, так и в направлении поиска средств пассивной иммунной защиты. Исходя из биологических особенностей вирусного агента (в первую очередь, интегративный

тип взаимодействия с клетками макроорганизма и особенно в ранний постнатальный период его развития) последний путь представляется наиболее перспективным.

В неблагополучном по инфекции BLV стаде телята, родившиеся от матерей-вирусоносителей, получают, как известно, необходимую специфическую защиту через молозиво. Таким образом, эта категория животных находится на определенном этапе в более или менее «безопасном» положении.

Однако телята, родившиеся в этом же стаде от здоровых (нескомпрометированных в отношении BLV) коров, и не имевшие, следовательно, возможности получить с молозивом специфические противовирусные (BLV) антитела, составляют группу повышенного риска к инфицированию.

Опасность инфицирования BLV возрастает, если таким телятам выпаивают необезвреженное (непастеризованное) сборное молоко от коров BLV-носителей этого же стада (фермы).

Итак, в связи с изложенным, встает задача обеспечения пассивной защиты новорожденных телят от инфекции BLV в неблагополучных по лейкозу стадах.

Следует заметить, что использование с профилактической целью сывороток крови животных-антителоносителей, естественно инфицированных BLV, сопряжено как с риском инфицирования телят вирусом лейкоза, так и с возможностью получения телятами иммуносупрессивных факторов сыворотки от животных в начальной стадии лейкозного процесса.

Перечисленных недостатков можно избежать, если для пассивной иммунологической защиты использовать сыворотку гетерологичных животных, гипериммунизированных антигенами BLV.

В этом случае выработка антител оказывается не связанной с BLV-инфекцией, тем более со стадиями лейкозной трансформации лимфоидной ткани животных-доноров.

Использование для гипериммунизации гетерологичных животных обеспечивает значительно более высокий титр в получаемой ГИС.

При выборе способа введения ГИС телятам мы основывались на достоинствах и недостатках каждого, исходя из задачи достижения наиболее быстрого и эффективного профилактического действия. При этом преимущество мы отдаем пероральному способу.

Введение ГИС новорожденному в первые часы жизни, одновременно с первыми порциями молозива, обеспечивает неселективную иммуно-

абсорбцию противовирусных антител (из ГИС) через слизистую кишечника. При этом животное гарантировано от излишнего антигенного стресса, связанного с сенсibilизацией организма чужеродными белками, входящими в состав ГИС.

Следует обратить внимание на то, что повторное введение препарата в более поздние сроки нецелесообразно, так как при этом возможно нарастание титра антител к гетерологичным гамма-глобулинам и быстрая элиминация последних.

Для перорального способа пассивной иммунизации телят важным является то, что защитное действие специфических гуморальных антител начинается сразу после поступления их в кровяное русло.

Таким образом, теленок оказывается защищенным от BLV именно в тот период, когда активная иммунизация (даже при наличии достаточно эффективной вакцины против BLV) была бы неприемлема ввиду иммунологической незрелости молодого организма, а также иммуносупрессивного влияния колостральных антител, в частности у телят, родившихся от коров – BLV-носителей.

Очевидно, только на пути оптимального, т.е. последовательного сочетания, учитывающего возраст животного и исключающего возможную негативную конкуренцию специфических антител, применением пассивной иммунизации можно приблизиться к профилактике BLV-инфекции, а следовательно, и лейкоза крупного рогатого скота в раннем возрасте.

Цель исследований – разработка методики приготовления гипериммунной сыворотки против инфекции BLV и испытание ее эффективности в контролируемом длительном опыте.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для приготовления антигенного препарата BLV использовали культуральную жидкость перевиваемой клеточной культуры, хронически продуцирующей BLV (ПЭО – почки эмбриона овцы).

Клетки выращивали в питательной среде, содержащей среду Игла (90%), телячью сыворотку (10%) и пенициллин в конечной концентрации 500 ЕД/мл.

После 7–8-суточного культивирования культуральную жидкость сливали и концентрировали полиэтиленгликолем (молекулярная масса 40 тыс. Д) через целлофан в 50–60 раз, после чего обра-

батывали неионным детергентом (третон X-100 в конечной концентрации 1%).

Полученный таким образом антигенный препарат проверяли на специфичность, титруя в РИД (реакции иммунодиффузии) с позитивными к гликопротеиду BLV сыворотками. Определяли содержание белка.

Полноту инактивации вируса в каждой серии препарата проверяли постановкой биопроб на взрослых овцах.

Все исследования по данной проблеме были проведены в условиях экспериментальной базы ИЭВСиДВ Россельхозакадемии (с. Верх-Тула).

Оригинальность получения гипериммунной сыворотки состояла в том, что ее получали путем гипериммунизации клинически здоровых взрослых коз антигенным препаратом BLV, который вводили животным подкожно в области шеи по схеме: первая инъекция – 60 мг (по белку) антигенного препарата в полном адьюванте Фрейнда, а последующие инъекции – без адьюванта, с интервалами 5 дней в нарастающих дозах – 80, 100, 120, 140 и 160 мг белка одному животному – донору.

Синтез специфических (к gp51 антигену BLV) антител контролировали исследованием сывороток крови гипериммунизированных коз в тест-системе «РИД с gp51 BLV в геле агара Дифко». Первое исследование проводили через 15 дней после введения последней иммунизирующей дозы. При этом было установлено, что активный синтез специфических антител, улавливаемый в РИД, наступает через 2 недели после первой иммунизации, в то время как наиболее высокий титр специфических антител выявляли через 7 дней после последней иммунизации. Именно в этот срок и производили забор донорской крови. Отбор крови производили стерильно, используя для этого стандартную систему, применяемую в медицинской практике для гемотрансфузий (ПР 11-01, ОСТ 64-2-168-75). Далее кровь проходит несколько технологических этапов, принятых в биологической промышленности: свертывание, отделение сыворотки, осветление (центрифугированием), консервирование (фенолом до 0,5%-й концентрации), стерилизующая фильтрация (с помощью фильтров Зейтца или Сальникова), расфасовка, контроль качества, испытание на стерильность (посев на МПА, МПБ, среду Китт-Тароци), безвредность (на белых мышах), маркировка и хранение (в условиях морозильной камеры бытового холодильника).

Требования ко всем перечисленным манипуляциям традиционны, регламентированы ветеринарным законодательством, поэтому автор считал возможным не останавливаться на их подробном изложении.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Гипериммунную сыворотку испытали в эксперименте на новорожденных телятах и ягнятах. В качестве инфицирующего материала использовали в одном случае (на ягнятах) – очищенный и сконцентрированный BLV, а во втором (на телятах) – культуральную жидкость перевиваемой вируспродуцирующей культуры клеток почки эмбриона овцы (ПЭО).

Вирусосодержащий материал вводили подопытным животным (опытные группы) внутрибрюшинно трехкратно, с интервалом между введениями 3 дня, в разовой дозе 100 мг белка.

За одни сутки до введения первой инфицирующей дозы животным контрольных групп выпаивали (в первые часы их жизни) ГИС в дозе 20 мл однократно. Животным опытных групп ГИС не вводили.

Состояние инфицированности животных BLV контролировали по появлению в сыворотках крови животных специфических противовирусных антител, выявляемых с помощью РИД с gp51 и p24 антигенами BLV. Срок наблюдения за ягнятами – 1,5 года, а за телятами – 6 месяцев. В целом состояние инфицированности, т.е. развитие BLV-инфекции, контролировали постановкой биопроб на овцах. Всего в опыте находилось 18 ягнят и 18 телят.

Результаты исследований показали, что в группе ягнят, инфицированных BLV без применения ГИС, удалось воспроизвести в 50% случаях BLV-инфекцию и лейкоз (диагноз подтвержден кандидатом ветеринарных наук, старшим научным сотрудником В.В. Смирновой гистологически). В группе ягнят, инфицированных по фону применения ГИС, ни в одном случае инфекция не развивалась.

В группе подопытных телят (без применения ГИС) у 7 животных удалось воспроизвести BLV-инфекцию, в контрольной группе (по фону применения ГИС) – только у одного в сыворотке крови в возрасте 2 и 3 месяца выявляли специфические антитела к BLV, однако в последующие 3 месяца наблюдения РИД была отрицательной. Биопробой на овце BLV-инфекция не подтверждена.

ВЫВОДЫ

1. Разработана оригинальная методика приготовления гипериммунной козьей сыворотки для профилактики инфекции BLV у телят в ранний постнатальный период их развития.

2. Результаты экспериментального заражения BLV новорожденных телят и ягнят по фону применения гипериммунной сыворотки против бычьего лейкозного вируса выявили высокую эффективность пассивной защиты (срок наблюдений 1,5 года).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Van Der Maaten M.J., Miller J.M., Bothe A.J.* Replicating type – C virus particles in monolayer cell cultures of tissues from cattle with Lymphosarcoma // *J. Nat. Cancer Inst.* – 1974. – Vol.52, N2. – P. 491–497.
2. *Miller J.M., Olson C.* Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine Lymphosarcoma // *J. Nat. Cancer Inst.* – 1972. – Vol. 49, N5. – P. 1459–1462.
3. *Miller J.M., Van Der Maaten M.J.* Serologic detection of bovine Leukemia virus infection // *Vet. Mikrobiol.* – 1976. – Vol. 1, N 2/3. – P. 195–202.
4. *Miller J.M., Van Der Maaten M.J.* Infectivity tests of secretions and excretions from cattle infected with bovine Leukemia virus // *J. Nat. Cancer Inst.* – 1979. – Vol. 62, N 2. – P. 425–428.
5. *Вирус лейкоза крупного рогатого скота / Р.А. Кукайн, Л.И. Нагаева, В.П. Ложа и др.* – Рига: Зинатне, 1982. – 175 с.
6. *Крикун В.А., Рожнова Н.В.* Оценка функциональной активности иммунокомпетентных клеток у инфицированного ретровирусом и больного лейкозом крупного рогатого скота с помощью реакции ингибции прилипания лейкоцитов // *Роль иммунной системы в патогенезе лимфопролиферативных заболеваний: тез. докл. Всесоюз. конф.* – Новосибирск, 1984. – С. 141–142.
7. *Бутенко З.И., Пащенко С.А., Карлова Н.П.* Выявление экспрессии генома вируса лейкоза крупного рогатого скота // *Ультраструктура и гистохимия нормальных и опухолевых клеток.* – Киев: Наук. думка, 1982. – № 7. – С. 62–64.
8. *Валихов А.Ф.* Морфология, антигенные свойства вируса и серологическая диагностика онкорнавирусной инфекции крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – М., 1978. – 15 с.
9. *Валихов А.Ф., Шишков В.П., Бурба Л.Г.* Лейкоз крупного рогатого скота (вирусологические аспекты). – М.: ВНИИТЭИСХ, 1980. – 80 с.
10. *Левашев А.Т., Смирнов П.Н.* Хронобиологический подход к изучению онкорнавирусной инфекции и лейкоза крупного рогатого скота: сообщ. 1 // *Этиология, патогенез и вопросы эпизоотологии лейкоза крупного рогатого скота: сб. науч. тр. /ВАСХНИЛ. Сиб. отд-ние.* – Новосибирск, 1986. – С. 38–49.
11. *Левашев А.Т., Смирнов П.Н.* Хронобиологический подход к изучению онкорнавирусной инфекции и лейкоза крупного рогатого скота: сообщ. 2: Терминальная стадия лейкоза // *Сб. науч. тр. / ВАСХНИЛ. Сиб. отд-ние.* – Новосибирск, 1987. – С. 60–70.
12. *Смирнов П.Н.* Болезнь века – лейкоз крупного рогатого скота. – Новосибирск, 2007. – 301 с.

DEVELOPING THE TECHNIQUE TO MAKE HYPERIMMUNE SERUM AGAINST BLV AND ESTIMATING PREVENTIVE EFFICIENCY OF THE PREPARATION IN EXPERIMENT

P.N. Smirnov

Key words: BLV infection, enzootic leucosis, hyperimmune serum, donor-goats, experimental test of HIS efficiency

Abstract. Multiple experiments and clinical examinations carried out in our country and abroad in the last century 80–90s identified that the infection of bovine leucosis virus (BLV-infection) is an obligatory, but not sole factor for the leucosis process to progress. A secondary, but not less important factor is genetic predisposition to the disease. A tertiary place is occupied by immune deficiencies of both primary and secondary nature (acquired). The most critical (the highest risk) period, when animals are likely to get BLV infected, is an early postnatal one (up to 30 days of life) due to the characteristics of immunologic resistance formation in this

period. In relation to this, the advantage to take passive immune preventive measures against BLV is justified, the technique to make goat's hyperimmune serum (HIS) against cattle leucosis virus (BLV) is given. HIS targeted application is shown to prevent early postnatal calves in the infection-vulnerable herds from being attacked by this leucosis infection. HIS is applied once. HIS preventive efficiency was tested on 18 newborn lambs that were experimentally infected with BLV-containing material in the background of HIS single dose per os. The effect was 100% preventive. The infection level made up 50% in the control group of calves (no HIS applied)

УДК 619:615.916:636.028

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНОЧНОЙ ФЕРМЕНТЕМИИ В УСЛОВИЯХ КАДМИЕВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ МЫШЕЙ

Е. А. Ткаченко, аспирант

М. А. Дерхо, доктор биологических наук, профессор

О. С. Романкевич, магистрант

Т. И. Середа, кандидат биологических наук, доцент

Л. Ф. Мальцева, кандидат ветеринарных наук, доцент

Уральская государственная академия

ветеринарной медицины

E-mail: tvi_t@mail.ru

Ключевые слова: кадмий, интоксикация, печень, супернатант, ферменты, мыши

Реферат. Изучено изменение активности ферментов (аспартатаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтрансферазы (γ -ГТФ)) в супернатантах печени мышей на фоне кадмиевой интоксикации. Установлено, что на фоне ежедневного введения животным *per os* сульфата кадмия в дозе 40 мг на голову уменьшается масса печени (достоверно с третьих суток интоксикации), развивается ферментемия, максимальная выраженность которой определяется как временем экспозиции токсиканта в организме, так и ролью ферментативных реакций, катализируемых АлАТ, АсАТ, ЩФ, γ -ГТФ, в поддержании метаболических потоков в клетках печени и организма в целом. Так, активность аминотрансфераз в супернатанте печени максимально увеличивается через сутки от начала интоксикации, отражая уровень катаболических процессов; щелочной фосфатазы – на третьи, характеризуя степень энергодифицита; γ -ГТФ – на восьмые, определяя степень заимствования аминокислот в тканях организма. Ферментемия является показателем компенсаторных возможностей печени и динамики развития патологических изменений.

Соли тяжелых металлов, в частности соли кадмия, попадая из окружающей среды в организм животных, вызывают загрязнение эндоэкологического пространства и нарушают тканевый и клеточный гомеостаз. Токсическое действие кадмия обусловлено преимущественно взаимодействием с белками организма, поэтому его часто называют белковым ядом [1].

Центральным метаболическим органом, ответственным за снабжение организма аминокислотами и белками, является печень. В органе синтезируются все альбумины, 90% α_1 -глобулинов, 75% α_2 -макроглобулинов и 50% β -глобулинов, а кроме того, печень участвует в поддержании постоянного аминокислотного состава крови за счёт протекающих в её клетках реакций переаминиро-

вания и дезаминирования с участием соответствующих ферментов. Кроме этого, печень обеспечивает связывание и обезвреживание токсических веществ экзогенного происхождения [2, 3], в том числе и кадмия [4, 5].

В настоящее время многие авторы приходят к заключению, что в основе приспособления организма к действию экзотоксикантов лежит пластичность и динамичность белков [3, 4]. При этом количественные и качественные перестройки макромолекул обязательно сопровождаются реорганизацией ферментных систем клеток органов и тканей [6–8]. Однако экспериментальных работ, посвященных изучению влияния токсикантов на клеточный и субклеточный уровень организма животных, с участием белковых систем, повреж-