

УДК 319:116.981·3+576.858:615.37

UDC 319:116.981·3+576.858:615.37

06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

06.02.02 Veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology

**ПОЛУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ НАБОРОВ ДЛЯ СЕРОДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННОГО ГЕПАТИТА ПЛОТОЯДНЫХ**

**OBTAINING DIAGNOSTIC KITS FOR SERODIAGNOSIS OF CARNIVOR INFECTIOUS HEPATITIS**

Урюмцева Татьяна Игоревна  
канд. вет. наук, доцент  
SPIN-код: 6945-9459, Author ID: 457992  
e-mail: vbh2@mail.ru  
*ТОО «Инновационный Евразийский университет», г. Павлодар, Казахстан*

Uryumtseva Tatyana Igorevna  
Cand.Vet.Sci., Associate Professor  
RSCI SPIN-code: 6945-9459, Author ID: 457992  
e-mail: vbh2@mail.ru  
*LLP «Innovative University of Eurasia», Pavlodar, Republic of Kazakhstan*

Статья посвящена актуальной на сегодняшний день проблеме дифференциальной диагностики заболеваний вирусной этиологии у мелких домашних животных. Вирусные заболевания собак и кошек широко распространены среди как среди высокопородных, так и беспородных животных. Распространению заболеваний способствует увеличение численности мелких домашних животных, популяризация содержания питомцев, трансграничные операции, связанные с перемещением животных. Рассматривается значимость экспресс-методов при проведении лабораторной диагностики инфекционных заболеваний. Сокращение сроков диагностики способствует повышению эффективности осуществляемых лечебных и противоэпизоотических мероприятий. Дан анализ места инфекционного гепатита плотоядных в структуре заболеваемости собак. В статье описывается изыскания при определении оптимальных систем для культивирования и последующего выделения вируса инфекционного гепатита собак в высоких титрах. При необходимости наращивания вирусной биомассы первостепенное значение имеет выбор системы культивирования для максимального сбора урожая. Авторами предложен метод получения и очистки вирусных антигенов для использования при получении диагностических наборов. Важное значение при получении антигенных препаратов имеет освобождение выделенной фракции от балластных веществ, что обеспечивает быстрое реагирование и прочное связывание со специфическими иммуноглобулинами. Важно получать антигены с высокой степенью очистки для получения достоверных результатов при постановке серологических реакций

The article is devoted to the current problem of differential diagnosis of diseases of viral etiology in small pets. Viral diseases of dogs and cats are widely distributed among both pedigree and non-pedigree animals. The spread of diseases is facilitated by the increase in the number of small pets, the popularization of pet maintenance, cross-border operations associated with the movement of animals. The importance of express methods in laboratory diagnostics of infectious diseases is considered. Reducing the time of diagnosis contributes to the effectiveness of therapeutic and anti-epizootic measures. The place of infectious hepatitis of carnivores in the structure of morbidity of dogs is analyzed. The article describes the research in determining the optimal systems for the cultivation and subsequent isolation of the infectious canine hepatitis virus in high titers. If viral biomass needs to be increased, the choice of a cultivation system for maximum harvest is of paramount importance. The authors propose a method of obtaining and purification of viral antigens to use them for preparation of diagnostic kits. The release of the isolated fraction of ballast substances, which provides rapid response and strong binding to specific immunoglobulins is essential for the preparation of antigenic drugs. It is important to obtain antigens with a high degree of purification to get reliable results in the formulation of serological reactions

Ключевые слова: АНТИГЕН, ВИРУСЫ, ИНФЕКЦИОННЫЙ ГЕПАТИТ СОБАК, ДИАГНОСТИКА, СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Keywords: ANTIGEN, VIRUSES, INFECTIOUS CANINE HEPATITIS, DIAGNOSTICS, SEROLOGICAL REACTIONS

DOI: <http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-154-024>

**Введение.** Мероприятия по борьбе с инфекционными заболеваниями животных по сей день является одной из актуальных задач ветеринарии. Болезни бактериальной и вирусной этиологии способны нанести огромный экономический ущерб не только промышленному животноводству, но и деятельности по разведению мелких домашних животных.

Расширению нозоареалов ряда вирусных болезней способствует возрастание объемов экспортно-импортных операций.

Вирусные инфекции занимают значительное место в патологии мелких домашних животных, имеют разную форму клинического течения, включая развитие осложнений. Изучение вопроса распространенности и частоты встречаемости вирусных инфекций необходимо для проведения мониторинга инфекционных заболеваний у собак, что имеет особую актуальность в условиях популяризации и развития служебного и декоративного собаководства, а также способствует осуществлению верных алгоритмов диагностики с применением эффективных методов терапии. [1, 2]

Инфекционный гепатит собак имеет широкое распространение с отягощенным влиянием на уровень здоровья животных. В городских условиях болезнь поражает собак различных пород и возрастов, наиболее подвержены заболеванию щенки в 2-6 месячном возрасте. [3, 4, 5]

Решающее значение в диагностике придается лабораторным исследованиям, при которых необходимо исключить чуму, лептоспироз, бешенство, сальмонеллез, токсоплазмоз, авитаминоз В<sub>1</sub>, алиментарные интоксикации, а также парвовирусный энтерит собак. [6]

Эффективность методов диагностики во многом зависит от активности и специфичности диагностических препаратов.

Помимо клинического материала широко используется опыт культивирования вакцинных штаммов в клеточных системах с

последующим использованием выделенных вирусов в качестве составляющих диагностических систем.

**Материалы и методы.** При проведении исследований был использован вакцинный штамм вируса инфекционного гепатита собак (ИГС), полученный в Научно-исследовательском сельскохозяйственном институте Национального центра по биотехнологии. Для культивирования использовали культуры клеток фибробластов куриных эмбрионов, перевиваемые культуры клеток почки эмбриона свиньи, почки телёнка, почки собаки (MDCK), почки сирийского хомячка (ВНК-21). Использовали стационарный режим культивирования в матрасах. Культивирование в первичной и субкультуре клеток фибробластов куриных эмбрионов и перевиваемых линиях клеток почки собаки и сирийского хомячка показало наиболее высокие титры. Использование в экспериментах культур клеток фибробластов куриных эмбрионов является нетехнологичным, по этой причине исследования были продолжены с перевиваемой линией клеток почки собаки и перевиваемой линией клеток сирийского хомячка. Для культивирования использовали вращающиеся сосуды заражение производили в дозе 0,1 ТЦД 50/клетку. При получении цитопатогенного действия (ЦПД) более чем в 70 % монослоя клеток собирали урожай вируса.

**Результаты исследований.** Активность культивируемого штамма вируса в линиях клеток MDCK возрастала с ростом пассажного уровня, при неизменных сроках культивирования. Стабильность высоких титров вирусного материала в культуре клеток MDCK не зависела от пассажного уровня и сроков наступления деструкции монослоя.

По результатам данных исследований определили оптимальные системы для наращивания в высоких титрах вакцинного штамма вируса инфекционного гепатита собак. Было определено культивирование

вакцинного штамма вируса ИГС в культуре клеток MDCK в роллерной системе.

При получении диагностических наборов необходимо обеспечить получение высокой активности антигена с сохранением специфичности. При получении вирусного диагностикума важно изыскать оптимальные методы концентрирования и очистки вирусного материала.

С этой целью заражённые вакцинным штаммом ИГС культуру клеток MDCK, выращенную во вращающихся сосудах, при наступлении деструкции монослоя в 75-80 %, снимали двумя способами: шпателем с резиновым наконечником и раствором Версена. Для концентрирования вируса использовали следующие растворы: раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000), раствор сульфата аммония, также применялось центрифугирование при 3000 об/мин в течение 30 мин. Для очистки антигена от балластных белков клеточного слоя осуществляли двукратный термолизис клеток, затем подвергали центрифугированию.

Активность полученных антигенных препаратов проверяли при постановке реакции диффузионной преципитации (РДП) и реакции связывания комплемента (РСК) со специфической сывороткой против ИГС. Специфичность полученных антигенных препаратов проверяли при постановке РСК используя нормальные и гетерологичные сыворотки крови животных.

Результаты проверки специфической активности полученных антигенов вируса ИГС, полученных различными методиками, представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Специфическая активность полученных антигенов возбудителя ИГС

Метод получения вирусного антигена	Сероактивность в:	
	РСК	РДП
Снятие версеном:		
ПЭГ 6000	1:4-1:8	1:2
Сульфатом аммония	1:4-1:8	1:2
Центрифугирование	1:4-1:8	1:2
Механическое снятие:		
ПЭГ 6000	1:10	1:2-1:4
Сульфатом аммония	1:10	1:2-1:4
Центрифугирование	1:20-1:40	1:4-1:8

Как видно из таблицы 1, наиболее активен антиген вируса ИГС полученный путем центрифугирования клеток монослоя, которые поражены на 75 и более процентов, с дальнейшим ресуспендированием осадка с одной сотой части первоначального объёма суспензии, неоднократным термолизисом и осаждением клеточного балласта.

При проверке активности в серологических реакциях в РСК показан титр до 1:40, в РДП до 1:8.

При проверке на специфичность вирусного антигена полученного путем центрифугирования клеток снятых механически при поражении монослоя с повторным суспендированием преципитата после центрифугирования в 1/100 части первоначального объёма смеси, термолизисом в двукратной повторности и выделением балласта применяли сыворотки против ИГС, чумы плотоядных, аденовирусной инфекции КРС, парвовирусного энтерита, а также сыворотки от здоровых животных. В РСК было продемонстрировано, что антиген вируса инфекционного гепатита собак обладает высокой степенью специфичности

с нормальными и гетерологичными сыворотками. Были получены положительные результаты с сыворотками крови, которые содержали антитела против вируса ИГС и аденовирусы КРС, что объясняется антигенным родством (табл. 2).

Таблица 2 - Результаты проверки диагностического антигена вируса инфекционного гепатита собак на специфичность

Сыворотки	Количество проб	Результат
Инфекционный гепатит собак	10	1:2-1:4
Аденовирусная инфекция КРС	5	1:2
Парвовирусный энтерит	9	-
Чума плотоядных	10	-
От здоровых собак	10	-

**ПРИМЕЧАНИЕ:**

- - результат отрицательный

**Заключение.** Важно было установить возможность использования полученного вирусного антигена в прочих серологических реакциях, в частности, в реакции агглютинации латекса (РАЛ). Тенденция к использованию в качестве носителей антигенов и антител инертных синтетических материалов продиктовала изучение возможности использования, полученного диагностического вирусного антигена при постановке РАЛ. При сравнении результативности обнаружения специфического антигена вируса инфекционного гепатита собак при постановке серологических реакций (РСК и РАЛ) получили примерно одинаковой результат, титры выявляемых антигенов изменялись в пределах от 1:4 в РСК и до 1:256 в РАЛ. Апробированный метод позволяет производить специфические диагностические антигены вируса

инфекционного гепатита собак, которые можно использовать при постановке серологических реакций с активностью в РДП 1:4-1:8 и в РСК 1:20-1:40. Ценность использования специфического антигена при постановке РАЛ, заключается в возможности прижизненной диагностики ИГС.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьев. Е.П. Парвовирусный энтерит собак// Ветеринария. - 2013. - № 5. - С. 64 -67.
2. Гаврилов К.Е., Середа А.Д. Защита животных против чумы плотоядных и рассмотрение новых подходов к решению данной проблемы// Вопросы микробиологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы: сборник научных работ. - Ульяновск, 1998.-С. 156-163.
3. Китаев Н.С., Петрова О.Г. Эпизоотологические особенности инфекционного гепатита собак в условиях г. Екатеринбурга// Аграрный вестник Урала. - Екатеринбург, 2010. - № 11-2 (77). - С. 25.
4. Уколова М.В. Гепатиты собак в условиях мегаполиса (этиология, патогенез, особенности распространения, терапия): дис. канд. вет. наук. - М., 2005. -148 с.
5. Хожаева И.Г. Чума и парвовирусный энтерит собак в условиях крупного промышленного города: эпизоотология, клиника, иммунология и меры борьбы: автореф. дис. канд. вет. наук. – Алматы, 2001 - 21 с.
6. Белов А.Д., Данилов Е.П., Дукур И.И. и др. Болезни собак. М.: Агропромиздат, 1990. - 368с.

#### REFERENCES

1. Afanas'ev. E.P. Parvovirusnyj enterit sobak// Veterinariya. - 2013. - № 5. - S. 64 - 67.
2. GavrillovK.E., SeredaA.D.Zashchita zhivotnyh protiv chumy plotoyadnyh i rassmotrenie novyh podhodov k resheniyu dannoj problemy// Voprosy mikrobiologii, epizootologii i veterinarno-sanitarnoj ekspertizy: sbornik nauchnyh rabot. - Ul'yanovsk, 1998.-S. 156-163.
3. Kitaev N.S., Petrova O.G. Epizootologicheskie osobennosti infekcionnogo gepatita sobak v usloviyah g. Ekaterinburga// Agrarnyj vestnik Urala. - Ekaterinburg, 2010. - № 11-2 (77). - S. 25.
4. Ukolova M.V. Gepatity sobak v usloviyah megapolisa (etiologiya, patogenez, osobennosti rasprostraneniya, terapiya): dis. kand. vet. nauk. - M., 2005. -148 s.
5. Hozhaeva I.G. CHuma i parvovirusnyj enterit sobak v usloviyah krupnogo promyshlennogo goroda: epizootologiya, klinika, immunologiya i mery bor'by: avtoref. dis. kand. vet. nauk. – Almaty, 2001 - 21 s.
6. Belov A.D., Danilov E.P., Dukur I.I. i dr. Bolezni sobak. M.: Agropromizdat, 1990. - 368s.