

УДК 629:578.245

Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор**Прокулевич В.А.**, доктор биологических наук, профессор***Усеня М.М.**, кандидат ветеринарных наук**Потапович М.И.**, заведующий лабораторией***Патиевская Е.Е.**, ветеринарный врач

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск

* ООО «Научно-производственный центр ПроБиоТех», г. Минск

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ И АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА «ФАННИФЕРОН» В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Резюме

Проведено изучение антипролиферативной и антивирусной активности интерферона в системе *in vitro* с использованием перевиваемой культуры клеток MDCK и вирусов чумы плотоядных и инфекционного гепатита собак. Установлено, что интерферон собачий рекомбинантный обладает антипролиферативной активностью на культуре клеток MDCK в разведениях от 1:2 до 1:10, которая сопровождается дегенерацией монослоя клеток. Установлено, что собачий рекомбинантный интерферон обладает антивирусной активностью, которая проявлялась в условиях эксперимента на культуре клеток MDCK после внесения вирусов чумы плотоядных и инфекционного гепатита собак.

Summary

Study of antiproliferative and antiviral activities of interferon *in vitro* using MDCK cell culture and canine distemper virus and canine hepatitis virus was conducted. It was determined that canine recombinant interferon demonstrates the antiproliferative activity on MDCK cell culture in dilutions from 1:2 to 1:10 accompanied by degeneration of the cell monolayer. It was established that canine recombinant interferon demonstrates the antiviral activity on MDCK cells after inoculation of canine distemper virus and canine hepatitis virus.

Поступила в редакцию 07.10.2013 г.

ВВЕДЕНИЕ

Чума и инфекционный гепатит – это заболевания плотоядных, которые занимают одно из ведущих мест в их инфекционной патологии. В этиологической структуре возбудителей инфекционных заболеваний, вызывающих поражения органов дыхания и пищеварения у щенков, ведущая роль принадлежит вирусам, в частности, вирусу чумы плотоядных, вирусу инфекционного гепатита, вирусу парвовирусного энтерита, которые являются иммунодепрессантами и вызывают у животных состояние вторичного иммунодефицита.

Литературные данные и наши наблюдения показывают, что в собаководческих питомниках чаще всего регистрируются ассоциированные вирусные и вирусно-бактериальные инфекции, основным клиническим признаком которых является респираторный и диарейный синдромы.

Анализ результатов серологических исследований по вирусным заболеваниям собак, в частности, у щенков в отъемный и послеотъемный периоды, свидетельствует о персистенции вирусов у обследуемых животных, не привитых против названных инфекций. На персистенцию вируса чумы, адено- и парвовируса у щенков указывает наличие в их сыворотке крови специфических антител к названным вирусам в диагностических титрах. У таких животных не всегда наблюдаются клинические признаки, свойственные той или иной инфекции, за исключением отдельных животных, у которых отмечают заболевания органов дыхания и желудочно-кишечного тракта. Предрасполагающими факторами клинического проявления заболеваний органов дыхания у щенков являются стрессовые состояния, связанные чаще всего с различными нарушениями технологии содержания и кормления, использование неполноценных кормовых рационов, приво-

дящих к угнетению иммунитета и ослаблению устойчивости организма к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды. На этом фоне активизируется условно-патогенная микрофлора, которая приводит к возникновению т.н. вторичных инфекций и состоянию вторичного иммунодефицита.

В такой ситуации возникает необходимость в стимулировании иммунной системы у животных. Для этой цели разработаны и применяются в ветеринарной практике иммуностимулирующие (иммуномодулирующие) препараты.

В литературе имеются сообщения о применении интерферона, индукторов интерферона, обладающих антивирусными свойствами (1,2,3,4). Их действие заключается в подавлении развития РНК- и ДНК-содержащих вирусов в клетке, стимуляции Т-хелперов и Т-киллеров. В результате их воздействия повышается иммунореактивность организма животных, способствующая снижению заболеваемости и повышению сохранности щенков.

Медицинская промышленность выпускает интерферон в различных формах и для различных целей – человеческий лейкоцитарный интерферон, препараты рекомбинантных интерферонов (α -, γ -, β -), «Реаферон», «Кинорон». Последний рекомендуется для профилактики и лечения вирусных заболеваний собак, но главным недостатком его является то, что в качестве основного действующего вещества выступает смесь человеческих рекомбинантных α -интерферонов, которые не гомологичны собачьему. Применение человеческого интерферона в такого рода препаратах требует высокой концентрации белкового компонента и может привести к развитию анафилактического шока.

Целью наших исследований было изучить антипролиферативную и антивирусную активность собачьего рекомбинантного интерферона в системе *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальные исследования проведены на базе отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и на предприятии ООО «Научно-производственный центр

ПроБиоТех».

Препарат собачьего рекомбинантного интерферона, который представляет собой смесь α - и γ -интерферона собачьего рекомбинантного в соотношении 7 мг/л и 3 мг/л, был изготовлен на базе ООО «Научно-производственный центр ПроБиоТех».

Рекомбинантные интерфероны получены из клеток сконструированных штаммов-продуцентов *E. coli*, наследующих плазмиды, с генами собачьего α - и γ -интерферона. Бактерии культивировали в LB-бульоне с 20 мкг/мл канамицина при температуре 37 °С до оптической плотности $OP_{600} = 0,6 - 0,8$, после чего в среду добавляли индуктор изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 ммоль/л, культивировали еще 4 ч; клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 7000g. Клеточный осадок промывали в буфере следующего состава: 15 ммоль Na-фосфат, 1 ммоль ЭДТА, pH 7,5 и ресуспендировали в том же буфере. Клетки разрушали при 150 атм. на проточном дезинтеграторе типа «френч-пресс». Полученную суспензию центрифугировали 20 мин при 10000g и +4°C, супернатант сливали. Осадок телец включения отмывали в том же буфере и растворяли в буфере следующего состава: 7М гуанидингидрохлорид, 20 ммоль Na-фосфат, 1 ммоль ЭДТА, pH 7,5. Инкубировали 2 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Добавляли сульфит натрия до 30 г/л, раствор инкубировали 12 часов при комнатной температуре при интенсивном перемешивании.

Белки обессоливали хроматографией на колонке с Sephadex G25 Medium в буфере состава: 50 ммоль Na-фосфат, 1 ммоль ЭДТА, 100 ммоль NaCl, pH 7,5. Далее белок очищали с помощью ионообменной хроматографии на Toyopearl SP-550. Концентрацию белка измеряли по Лоури, чистоту оценивали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза по Laemmli.

Антипролиферативную активность интерферона изучали в системе *in vitro* с использованием перевиваемой культуры клеток MDCK и вирусов чумы плотоядных и инфекционного гепатита плотоядных.

Для этой цели препарат интерферона разводили средой 199 от 1:2 до 1:2000, добавляли по 100 мкл к культуре клеток MDCK (возраст культуры 2–6 дней) в пробирках или

лунках плоскодонного иммунологического 96-луночного планшета, предварительно удалив ростовую среду, заменяя ее на поддерживающую. Инкубировали в термостате при температуре $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 24–144 часов. Результаты исследования оценивали по отсутствию или проявлению дегенерации клеток в монослое через 24, 48, 72 и 144 часа после его внесения. Эффект интерферона принимался за положительный в случае проявления изменения монослоя не менее, чем в 50% пробирок или лунок.

Антивирусную активность интерферона определяли по устойчивости культуры клеток MDCK к воздействию вируса ЧП и ВГС, т.е. по подавлению или проявлению цитопатического действия (ЦПД) вируса на клетках.

Для этой цели интерферон собачий рекомбинантный разводили средой 199 от 1:2 до 1:2000 и вносили по 100 мкл на пробирку или в лунку планшета и инкубировали в термостате при 37°C в течение 144 часов. Через 24 часа после внесения интерферона в лунки с культурой клеток вносили вирус в дозе 100 ТЦД на лунку. Результаты учитывали по проявлению или отсутствию ЦПД вируса на культуре клеток, сравнивая полученные результаты исследований с контролями – контроль культуры клеток и контроль вируса.

Разведение интерферона, задерживающее цитопатогенное действие вируса ЧП и ВГС у обработанных клеток считали максимальным при проявлении изменения монослоя не менее чем в 50% пробирок или лунок.

Таблица 1 – Антипролиферативная активность интерферона в системе *in vitro*

Разведение интерферона	Количество пробирок (лунок)	Интерферон рекомбинантный
1:2	4	4/4
1:10	4	4/4
1:100	4	4/1
1:500	4	4/0
1:1000	4	4/0
1:2000	4	4/0

Примечание – 4/1 – в числителе – количество пробирок (лунок) с культурой клеток в опыте, в знаменателе – количество пробирок (лунок) с культурой клеток, в которых отмечена деградация клеток

Из таблицы 1 видно, что интерферон проявляет антипролиферативную активность на перевиваемой культуре клеток MDCK в разведениях от 1:2 до 1:10. В дальнейших разведениях антипролиферативная активность интерферона не проявлялась.

Результаты исследований по изучению антивирусной активности собачьего рекомбинантного интерферона с использованием перевиваемой культуры клеток MDCK и вируса ЧП и ВГС приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Антивирусная активность интерферона в системе *in vitro*

Разведения интерферона	Кол-во пробирок (лунок)	Интерферон собачий рекомбинантный
1:100	4	4/0
1:200	4	4/0
1:300	4	4/0
1:400	4	4/0
1:500	4	4/0
1:1000	4	4/0
1:2000	4	4/4
Контроль клеток	4	4/0
Контроль вируса	4	4/4
Титр интерферона	–	3 мг/л – γ ; 7 мг/л – α

Примечание – 4/4 – в числителе – количество пробирок (лунок) с культурой клеток в опыте, в знаменателе – количество пробирок (лунок), где вирус проявил ЦПД

Из таблицы 2 видно, что интерферон обладает антивирусной активностью в эксперименте на модели перевиваемой культуры клеток MDCK к вирусу ЧП и ВГС. Интерферон собачий рекомбинантный в разведении до 1:1000 предохраняет клетки от заражения вирусом ЧП и ВГС.

ВЫВОДЫ

1 Интерферон в эксперименте на перевиваемой культуре клеток MDCK обладает антипролиферативной активностью в разведе-

ниях с 1:2 до 1:10, которая сопровождается дегенерацией клеток. В более высоких разведениях антипролиферативные свойства интерферона на культуре клеток не проявляются.

2 Антивирусное действие интерферона собачьего рекомбинантного на модели культуры клеток MDCK и вируса чумы плотоядных и вируса инфекционного гепатита собак проявляется в разведениях препарата до 1:1000.

ЛИТЕРАТУРА

1 Иммунокоррекция в клинической ветеринарной медицине / П.А Красочко [и др.] // Под ред. П.А. Красочко. – Минск: Техноперспектива, 2008. – 507 с.

2 Прокулевич, В.А. Ветеринарные препараты на основе интерферона/В.А. Прокулевич [и др.]// Вестник БГУ. – Сер. 2.– 2011.– №3.

3 Лаптев, С.В. Общая биология и микробиология. Основы вирусологии. Особенности репро-

дукции вирусов: учебное пособие для модульно-рейтинговой технологии обучения Алтайский государственный технологический университет. – Бийск.– 2003. – 164 с.

4 Бурдейный, В.В. Свиной лейкоцитарный интерферон с инактивированным индуктором при некоторых инфекционных болезнях молодняка животных Труды Костромской государственной сельскохозяйственной академии. – Кострома.– 1999г., в. 57. – С. 40 – 45.

УДК 619:616.98:579.873.21–07:636.22/.28

Румачик И.И., доктор ветеринарных наук, доцент

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского», г. Минск

ПРИНЦИПЫ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПАРААЛЛЕРГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ НА ТУБЕРКУЛИН У СКОТА В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Резюме

Способ ускоренной дифференциации туберкулиновых реакций у скота при плановых аллергических исследованиях на туберкулез путем дополнительного введения реагирующим животным через 72 часа двух туберкулинов и учетом реакции через 48 часов позволяет ветеринарным врачам практически самостоятельно и быстро (в течение 5 дней) проводить дифференциальную диагностику туберкулеза от реакций, связанных с сенсибилизацией организма атипичными микобактериями и большим количеством близкородственных микроорганизмов.

Summary

The method of accelerated differentiation of tuberculin reactions in cattle at scheduled allergic studies tuberculosis by introducing additional reactive animals after 72 hours two tuberculin and in view of reaction after 48 hours allows veterinarians almost independently and quickly (within 5 days) differential diagnosis of tuberculosis-related reactions sensitized organism atypical mycobacteria and many closely related organisms.

Поступила в редакцию 28.10.2013 г.

В последнее время туберкулез крупного рогатого скота в хозяйствах регистрируется спорадически. Протекает он, как правило, без обнаружения видимых патологоанатомических изменений в тушах при проведении диагностического убоя, реагировавших на туберкулин животных и при убое животных

на общих основаниях, или же с поражением отдельных лимфатических узлов. Возбудитель туберкулезной инфекции – бактерии из рода *Mycobacterium*, в который входит по разным данным от 200 до 300 самостоятельных видов [10]. Однако лишь у 30 из них более подробно описаны основные и