

*Рябинникова А.И., Матраимов М.Б., Шалгынбаев Э.К.,
Рыстаева Р.А., Орынбаев М.Б.*

ОЧИСТКА И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ВИРУСА РИНОПНЕВМОНИИ ЛОШАДЕЙ

*Рябинникова А.И., Матраимов М.Б., Шалгынбаев Э.К.,
Рыстаева Р.А., Орынбаев М.Б.*

ЖЫЛКЫЛАРДЫН РИНОПНЕВМАНИЯСЫНЫН ВИРУСУН ТАЗАЛОО ЖАНА КОНЦЕНТРАЦИЯЛОО

*A.I. Ryabinnikova, M.B. Matraimov, E.K. Shalgynbaev,
R.A. Rystaeva, M.B. Orynbaev*

PURIFICATION AND CONCENTRATION OF EQUINE RHINOPNEUMONIA VIRUS

УДК: 619:616.9-636.1

В работе представлены данные по очистке и концентрированию вируса ринопневмонии лошадей (РПЛ) с применением различных методов. Установлено, что концентрирование вируса РПЛ с использованием ПЭГ-6000 и добавлением 0,5 М хлорида натрия, с последующей очисткой методом диализа, позволяет получить концентрат с высокой инфекционной и антигенной активностью. Показано, что метод адсорбции в присутствии ПЭГ позволяет получать препараты вируса, которые можно будет использовать для приготовления инактивированной вакцины против ринопневмонии лошадей.

Ключевые слова: ринопневмония, лошади, очистка, концентрирование.

Жылкылардын ринопневмониясынын вирусун (ЖРП) ар кандай ыкмаларды колдонуу менен тазалоо жана концентрациялоо боюнча маалыматтар келтирилди. ЖРП вирусун ПЭГ-6000 колдонуу жана 0,5 М натрийдин хлоридин кошуп, концентрациялап, андан ары диализ ыкмасы менен тазалоо жогорку жугуштуу жана антигендик активдүүлүктөгү концентратты алууга болоору далилденди. Жылкылардын ринопневмониясына каршы инактивдештирилген вакцинаны даярдоодо адсорбция ыкмасын ПЭГ де колдонуу вирусун препараттарын алууга мүмкүнчүлүк берери аныкталды.

Негизги сөздөр: ринопневмония, жылкылар, тазалоо, концентрациялоо (коюлантуу).

The paper presents the data on the purification and concentration of the equine rhinopneumonia virus (ERV) using different methods. It is found that the concentration of ERV using PEG-6000 in presence of 0.5 M sodium chloride, followed by purification by dialysis, allows to obtain a concentrate with high infectivity and antigenic activity. It is shown that the adsorption method in the presence of PEG allows the virus to obtain preparations that can be used to prepare an inactivated vaccine against equine rhinopneumonia.

Key words: rhinopneumonia, horses, purification, concentration.

Введение

Ринопневмония лошадей (РПЛ) (вирусный аборт кобыл, ринотрахеит лошадей, Rhinopneumoniae equorum) – остро протекающая контагиозная вирусная болезнь, характеризующаяся у жеребят кратковременной лихорадкой, конъюнктивитом, катаральным воспалением слизистых оболочек верхних

дыхательных путей, а у кобыл – абортами во второй половине жеребости. Болезнь впервые описали в США в 1933 г. В естественных условиях болеют лошади, ослы и мулы всех возрастов и пород независимо от пола. Заражение происходит через верхние дыхательные пути и при случке. В благополучном хозяйстве болезнь обычно проявляется массовым заболеванием лошадей, где 60% жеребых кобыл абортует [2,6]. РПЛ наносит значительный экономический ущерб коневодству, состоящие из потери воспроизводительной способности конематок, выбраковка ценных племенных животных, затрат на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий [4]. Значительный ущерб наносит РПЛ хозяйствам и в Казахстане [5].

В системе мер борьбы с РПЛ особое значение имеет вакцинопрофилактика болезни. В настоящее время для специфической профилактики ринопневмонии лошадей применяют различные вакцины, среди которых наиболее широкое применение нашли инактивированные вакцины [1].

Одним из наиболее существенных моментов приготовления вакцины является получение очищенной концентрированной суспензии вируса.

Целью нашего исследования был подбор оптимальных методов и условий очистки и концентрирования вируса РПЛ для приготовления инактивированной вакцины.

Материалы и методы

В работе использовали изолят «Кордай» вируса РПЛ 4-го серотипа, адаптированный к культуре клеток РК-13, выделенный от больной лошади на территории Жамбылской области Республики Казахстан.

Для очистки и концентрирования вируса РПЛ нами были выбраны следующие методы: осаждение вируса полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000) с последующей очисткой методом диализа, осаждение вируса ультрацентрифугированием.

Для концентрирования использовали ПЭГ-6000 в виде 50% стерильного раствора с добавлением хлорида натрия. Очистку вирусосодержащей суспензии для освобождения от чужеродных белков проводили с использованием диализных мешков [3].

Осаждение вируса РПЛ полиэтиленгликолем с добавлением хлорида натрия и очистка с помощью диализных мешков.

Исходную вирусосодержащую суспензию осветляли низкоскоростным центрифугированием при 2000 об/мин с использованием центрифуги Allegra 25R Centrifuge фирмы Beckman Coulter (ротор на 500 мл) в течение 30 минут. Надосады отбирали, а осадок ресуспендировали в буфере PBS до конечного объема суспензии, равного 1 % объема исходного вирусосодержащего материала. Затем к осветленной суспензии добавляли ПЭГ с молекулярной массой 6000 и хлористый натрий, находящийся непосредственно в пробирках для центрифугирования, до конечных концентраций 5 - 7,5 % и 0,5 М соответственно. Смесь тщательно перемешивали до растворения ПЭГ, а затем выдерживали в течение 18 - 20 ч при 4°C. Образовавшуюся суспензию центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 минут. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в буферном растворе в 50 раз меньше объема. О потерях вируса при концентрировании судили по разнице в титрах исходной вирусосодержащей суспензии и надосадовой жидкости.

Диализ против фосфатно-буферного раствора. Для этого вирусную жидкость в стерильных условиях помещали в диализный мешок и погружали в сосуд с фосфатно-буферным раствором. Соотношение объемов вирусосодержащей суспензии (ВСС) и фосфатно-буферного раствора составляло 1:50. Диализ осуществляли в течение 10 часов при + 4° С с использованием магнитной мешалки.

В исходных пробах ВСС и в пробах, полученных на каждом этапе очистки, определяли количество белка по методу Лоури и биологическую активность титрованием на культуре клеток RK-13.

Осаждение вируса РПЛ ультрацентрифугированием.

Исходную вирусосодержащую суспензию осаждали центрифугированием при 10000 об/мин с использованием центрифуги Allegra 25R Centrifuge фирмы Beckman Coulter (ротор на 500 мл) в течение 2 ч. Осадок ресуспендировали в 1/100 исходного объема в PBS-буфере. Определенной степени очистки достигали, наслаивая содержащую вирус жидкость на небольшой объем буферного раствора, содержащего 20% сахарозы и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 1,5 ч. Осадок вируса суспендировали в PBS-буфере; для этого раствор приливали к осадку и оставляли на 12 ч при 4° С.

Присутствие культурального вируса РПЛ подтверждали в ИФА и ПЦР. Инфекционную активность полученных препаратов определяли путем их титрования в культуре клеток RK-13, а антигенную активность – с помощью коммерческого набора для иммуноферментного анализа Equine Herpesvirus type 1 and 4 Discriminating Test, производства фирмы Svanova (Швеция).

Результаты и обсуждение

При производстве вакцин, большое значение имеет этапы концентрирования и очистки вирусного компонента. Очисткой исходного вирусного сырья от посторонних антигенных раздражителей достигается одна из основных качеств инактивированной вакцины – ее ареактогенность. Концентрирование вирионов также обеспечивает эффективность инактивированной вакцины. Для концентрирования вирусов используют различные методы. В последние годы концентрирование с помощью полиэтиленгликоля является одним из эффективных и наиболее широко используемых методов при изготовлении высокоиммуногенных противовирусных вакцин [3].

В нашей работе для получения, концентрированного и очищенного вирусосодержащего материала использовали осаждение вируса ПЭГом и ультрацентрифугирование.

Результаты определения эффективности концентрирования герпесвируса лошадей различными методами представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Очистка и концентрирование вируса РПЛ полиэтиленгликолем ($X \pm m, n=3$)

Выбранный метод очистки и концентрирования	Титр вируса в исходной вирусосодержащей суспензии (lg ЛД ₅₀ /см ³)	Титр инфекционности вируса в надосадовой жидкости (lg ЛД ₅₀ /см ³)	Кратность концентрирования по объему (раз)	Процент очистки (%)	Титр вируса после очистки и концентрирования, (lg ЛД ₅₀ /см ³)
ПЭГ-6000 +0,5 М NaCl	5 %	2,00±0,23	100	82,1±0,31	6,3 ± 0,21
	7,5 %	1,75±0,15		94,5±0,26	6,5 ± 0,17
Ультрацентрифугирование + сахароза	7,0±0,25	2,50±0,26		85,2±0,21	4,5 ± 0,22

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что при концентрировании вирусосодержащего материала ПЭГ концентрацией 5 % в присутствии 0,5 М NaCl не адсорбировалось около 18 % вируса. Повышение концентрации ПЭГ в суспензии вируса до 7,5% обуславливало снижение потерь вируса. При очистке методом ультрацентрифугирования не адсорбировалось около 15 % вируса. Следовательно, для наиболее полного осаждения вируса из вирусосодержащей суспензии необходимо использовать 7,5% концентрацию ПЭГ.

В результате проведенных исследований установлено, что наибольший титр вируса на к/к RK-13 и в ИФА был отмечен в концентрате ПЭГ-6000 (7,5 %) (6,50 lg).

Как видно из таблицы, осаждение вируса ультрацентрифугированием через сахарозу привело к значительной потере активности вирусного материала. Титры инфекционности и антигенной активности вируса после очистки этим способом уменьшились с $7,0 \lg$ до $4,50 \lg$.

При изучении методом электронной микроскопии очищенной вирусной суспензии в препаратах наблюдались только целые вирионы диаметром 200-210 нм, имеющие четкую структуру (рис.1).

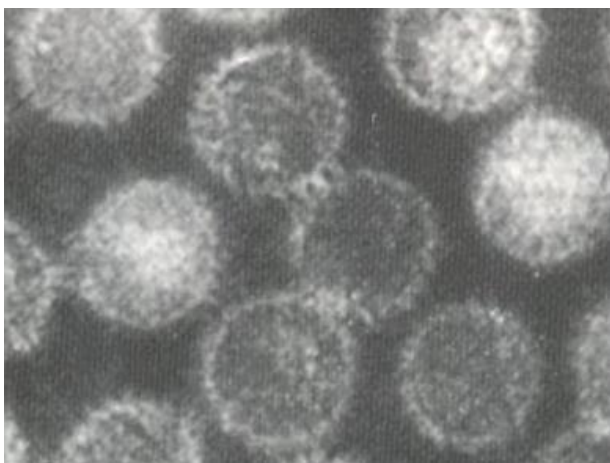


Рис. 1. Электронная микроскопия очищенных препаратов вируса РПЛ. Негативное контрастирование 2% ФВК. Ув. 120 000

В связи с тем, что метод адсорбции в присутствии ПЭГ позволяет получать высококонцентрированные препараты вируса, отличающиеся высокой иммуногенностью, данный метод мы использовали при приготовлении экспериментальных серий инактивированной концентрированной вакцины против ринопневмонии лошадей.

Выводы

Таким образом, проведенные исследования показали, что концентрирование вируса РПЛ с использованием ПЭГ-6000 концентрацией 7,5% с добавлением 0,5 М хлорида натрия, с последующей очисткой с помощью диализных мешков, позволяет получать концентрат с высокой инфекционной и антигенной активностью. Полученный концентрат может быть использован для изготовления вакцины против РПЛ.

Литература:

1. Bryans J. T. Serologic responses of pregnant Thoroughbred mares to vaccination with an inactivated equine herpesvirus vaccine // *Am. J. Vet. Res.* – 1980. – 41. – P. 1743-1746.
2. Зьентара С. Ринопневмония лошадей (молекулярная биология, диагностика и профилактика). // *Ветеринар*, 2001; N 6, С. 4-8.
3. Коржов В.В., Кузнецов Д.П., Кочиш И.И. // Концентрирование и очистка вируса ринопневмонии лошадей. // *Материалы международного симпозиума 28-30 ноября «Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний»* Казань, 2005. Том 2, с. 198-202.
4. Patel J.R., Heldens J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review // *Vet J.* – 2005. – Vol. 170, – 1. – P. 14-23.
5. Шалгынбаев Э.К., Коспанова М. Н., Рябинникова А.И., Омарова З.Д., Орынбаев М.Б. Мониторинг, выделение, идентификация и культивирование герпесвируса лошадей на территории РК // *Ізденістер, нәтижелер - Исследования и результаты Казахского национального аграрного университета № 4, 2014 с.87-92.*
6. Юров К.П. *Инфекционные болезни лошадей* // Изд-во «Грааль». - 2000. - С.19 -36.

Рецензент: к.биол.н., профессор Ахматов М.К.