

УДК 619:[578.832.91+579.842.11]:636.2

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ИНАКТИВАНТОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ РОТАВИРУСОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И АДГЕЗИВНЫХ АНТИГЕНОВ БАКТЕРИЙ E. COLI

*Красочко П.А., д. вет. н., профессор;
**Максимович В.В., д. вет. н., профессор;
*Ломако Ю.В., к. вет. н.;
*Яромчик Я. П., аспирант

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского»
Республика Беларусь, г. Минск;

**УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины»,
Республика Беларусь, г. Витебск

Аннотация. Исследовано влияние некоторых инактивантов на жизнеспособность ротавирусов крупного рогатого скота и адгезивных антигенов бактерий *e. coli*. Показано, что для инактивации эшерихий в дальнейшей работе целесообразно использовать солянокислый гидроксилламин и теотропин, а для ротавирусов – теотропин.

Ключевые слова: ротавирусы, крупный рогатый скот.

Актуальность проблемы. В современных условиях ведения животноводства среди инфекционных болезней молодняка крупного рогатого скота особые места занимают ротавирусная инфекция и эшерихиоз. Важная роль при борьбе с данными заболеваниями отводится специфической профилактики.

В подборе вакцин предпочтение следует отдавать инактивированным вакцинам, так как живые вакцины обладают рядом негативных свойств. Во-первых, вакцинные живые штаммы длительное время персистируют в организме животных и усложняют диагностику болезни. Во-вторых, живые вакцинные штаммы передаются от вакцинированных животных не вакцинированным. В-третьих, применение живых вакцин может провоцировать возникновение соответствующей болезни, а живые вакцинные штаммы могут реверсировать в исходное вирулентное состояние. В-четвертых, живые вакцинные штаммы могут включаться в ассоциации с микрофлорой, циркулирующей в организме, и формировать вирусно-бактериальные ассоциации. Инактивированные вакцины свободны от этих недостатков, однако они имеют более низкую иммуногенность за счет действия инактиванта, повреждающего антигенные структуры возбудителей болезни, а также зачастую обладают высокой реактогенностью в связи с остаточным действием инактиванта [4].

Конструирование вакцины, ее максимальная эффективность связана с подбором оптимальных инактивирующих средств. Сохранение наиболее лабильных антигенных фракций, клеточной структуры бактерий, быстрота, стабильность и линейность инактивации, при наименьшем количестве инактиванта, высокая иммуногенность и низкая реактогенность являются одними из предъявляемых требований к качеству изготавливаемых современных вакцин. От того, какие вещества применялись для инактивации компонентов, зависит качественная характеристика вакцины.

Главным недостатком при производстве инактивированных вакцин является разработанный ещё в 60-е годы общепринятый метод инактивации, при котором используют избыточное количество инактиванта, чаще – формалина, вводимого в бактериальные культуры, и неоправданно длительный срок инактивации (до 15 суток и более). Обычно применяемый для инактивации вирусов и бактерий формалин

обладает такими отрицательными свойствами, как повышенная токсичность, реактогенность и иммунодепрессия. Для преодоления этого необходима его инактивация, что удорожает стоимость и в то же время осложняет технологический процесс изготовления вакцины. [1,2,3]

В настоящее время представляют интерес такие инактиваны, как теотропин и прополис. Теотропин – препарат нового поколения, используемый как дезинфекции животноводческих помещений, а также для инактивации вирусов и бактерий и представляет собой

Теотропин 1,8,3,6-диэндометилен-1,3,6,8- тетраазациклодекан, представляет собой порошок белого или желтовато-белого цвета, кисловатого вкуса, без запаха, хорошо растворим в воде, спирте, хлороформе, не растворим в эфире, не летуч. Может храниться в сухом виде в течение 10 лет. Водные растворы стойкие, при комнатной температуре (18-20°C) сохраняют свое действие в течение 4-х месяцев.

Солянокислый гидроксилламин – (NH₂OH x HCL) биологически активное вещество, представляющее собой продукт замещения одного атома водорода в молекуле аммиака на гидроксил. Молекулярная масса 69,49. Срок хранения 2 года. Используется в промышленности в качестве инактиванта для изготовления вакцин.

Димер этиленмина - бесцветная легкоподвижная жидкость с запахом аммиака, плотность 0,837 г/см³, хорошо растворим в воде и большинстве органических растворителей. Получают димер этиленмина из этаноламина и серной кислоты с последующей обработкой образовавшегося сернокислого эфира щёлочью, а также действием щёлочи на 3-бромэтиламин, сильно ядовит. Используется в промышленности в качестве инактиванта для изготовления вакцин [1,3,5].

Цель работы: Оработать методы инактивации адгезивных штаммов *E. coli* и ротавирусов крупного рогатого скота с использованием инактивантов нового поколения.

Материалы и методы исследований: Для отработки методов инактивации вакцинных штаммов - компонентов поливалентной вакцины использовали ряд инактивантов – теотропин, формалин, гидраксиламин, этилендиамин.

Для отработки режимов инактивации вирусов использовали различные разведения препаратов (от 0,1 до 0,5%) путем добавления в заранее оттитрованную вирусодержащую жидкость. После контакта в течение 24, 48, 72, 96 и 120 часов проверяли полноту инактивации вирусов на культуре клеток.

Для определения инактивирующих свойств солянокислого гидроксилламина использовали эпизоотические штамм кишечной палочки K99 и K88, выделенные от телят, больных эшерихиозом. Инактивации были подвергнуты 24-часовые бульонные культуры *E.coli* с концентрацией микробной взвеси 6,5- 7,5×10⁹ м.к. в 1 мл. Гидроксилламин добавляли в культуру в чистом виде, затем путем шаговых разведений готовили различные его концентрации. Инактивацию проводили при температуре 37°C в течение 72 часов. Выживаемость бактерий определяли сразу после титрации препарата и через 24, 48, 72 часа путем отбора проб и контрольных высевов на МПБ. Опыты проводили в трех повторностях.

При отработке параметров инактивации бактерий и вирусов димером этиленмина использовали его в 0,01, 0,02 и 0,03%-ной концентрациях. Препарат добавляли к бактериям и ротавирусу до конечных, выше указанных концентраций и выдерживали в термостате при температуре 37°C при периодическом перемешивании. Через 12, 24 и 36 часов отбирали пробы материала и тестировали на степень инактивации. О степени инактивации ротавируса судили по отсутствию вируса в культурах клеток, а *E.coli* путем посева на МПА и МПБ.

Результаты исследований: В табл. 1 представлены результаты отработки инактивации ротавирусов телят различными инактивантами.

Таблиця 1. – Результати изучения действия различных инактивантов на ротавирусы телят

№/п	Концентрация инактиванта	Время контакта инактивантом	Ротавирус	
			Время проявления ЦПД	Результат
Формалин				
1.	0,1%	24 часа	24 часа	++++
2.	0,1%	48 часов	24 часа	++++
3.	0,2%	24 часа	24 часа	++
4.	0,2%	48 часов	Отсутствие ЦПД	-
5.	0,3%	24 часа	Отсутствие ЦПД	-
6.	0,3%	48 часов	Отсутствие ЦПД	-
7.	0,4%	24 часа	12 часов (дегенерация клеток)	-
8.	0,4%	48 часов	12 часов (дегенерация клеток)	-
9.	0,5%	24 часа	12 часов (дегенерация клеток)	-
10.	0,5%	48 часов	12 часов (дегенерация клеток)	-
11.	Контроль формалина 0,1%	-	-	-
12.	Контроль формалина 0,2%	-	24 часа (дегенерация клеток)	+
13.	Контроль формалина 0,3%	-	24 часа (дегенерация клеток)	+++
14.	Контроль формалина 0,4%	-	12 часов (дегенерация клеток)	++++
15.	Контроль формалина 0,5%	-	12 часов (дегенерация клеток)	++++
Теотропин				
16.	0,1%	24 часа	Отсутствие ЦПД	-
17.	0,1%	48 часов	Отсутствие ЦПД	-
18.	0,2%	24 часа	Отсутствие ЦПД	-
19.	0,2%	48 часов	Отсутствие ЦПД	-
20.	0,3%	24 часа	Отсутствие ЦПД	-
21.	0,3%	48 часов	Отсутствие ЦПД	-
22.	0,4%	24 часа	24 часа (дегенерация клеток)	-

23.	0,4%	48 часов	12 часов (дегенерация клеток)	-
24.	0,5%	24 часа	12 часов (дегенерация клеток)	-
25.	0,5%	48 часов	12 часов (дегенерация клеток)	-
26.	Контроль теотропина 0,1%	-	-	-
27.	Контроль теотропина 0,2%	-	-	-
28.	Контроль теотропина 0,3%	-	-	-
29.	Контроль теотропина 0,4%	-	24 часа (дегенерация клеток)	-
30.	Контроль теотропина 0,54%	-	12 часов (дегенерация клеток)	-
Димер этиленimina				
31.	0,1%	24 часа	Отсутствие ЦПД	-
32.	0,1%	48 часов	Отсутствие ЦПД	-
33.	0,2%	24 часа	24 часа (дегенерация клеток)	-
34.	0,2%	48 часов	24 часа (дегенерация клеток)	-
35.	0,3%	24 часа	18 часов (дегенерация клеток)	-
36.	0,3%	48 часов	24 часа (дегенерация клеток)	-
37.	0,4%	24 часа	24 часа (дегенерация клеток)	-
38.	0,4%	48 часов	12 часов (дегенерация клеток)	-
39.	0,5%	24 часа	12 часов (дегенерация клеток)	-
40.	0,5%	48 часов	12 часов (дегенерация клеток)	-
41.	Контроль димера этиленамина 0,1%	-	-	-
42.	Контроль димера этиленамина 0,2%	-	24 часа (дегенерация клеток)	-
43.	Контроль димера этиленамина 0,3%	-	24 часа (дегенерация клеток)	-
44.	Контроль димера этиленамина 0,4%	-	12 часов (дегенерация клеток)	-
45.	Контроль димера этиленамина 0,54%	-	12 часов (дегенерация клеток)	-

При изучении влияния инактиваторов на культуры клеток СПЭВ установлено, что добавление на монослой формалина в концентрации свыше 0,2% вызывало дегенерацию монослоя. При добавлении теотропина в различных концентрациях

установлено, що концентрація препарату свйше 0,3% также веде к дегенерації монослоя культури кліток. При додаванні димера етиленіміна концентрації свйше 0,1% также происходит разрушение кліточного монослоя.

При інактивації ротавіруса с использованием формаліна оптимальної оказалась его 0,3% концентрація в течение 24 часов, при использовании теотропіна – 0,1% концентрація в теченні 24 часов; димера етиленіміна - 0,1% в течение 48 часов.

В табл. 2 представлені результати обробки інактивації штамів бактерій *E.coli* с адгезивними антигенами різними інактивантами.

Таблиця 2. – Результати вивчення дії різних інактивантів на **ешерихії**

№п	Концентрація інактиванта	Час контакту інактивантом	<i>E.coli</i> . K88		<i>E.coli</i> . K99	
			рост на МПА	результат	рост на МПА	результат
Формалін						
1	0,1%	24 часа	24 часа	±	24 часа	±
2	0,1%	48 часов	-	-	-	-
3	0,2%	24 часа	-	-	-	-
4	0,2%	48 часов	-	-	-	-
5	0,3%	24 часа	-	-	-	-
6	0,3%	48 часов	-	-	-	-
7	0,4%	24 часа	-	-	-	-
8	0,4%	48 часов	-	-	-	-
9	0,5%	24 часа	-	-	-	-
10	0,5%	48 часов	-	-	-	-
Теотропін						
2	0,1%	24 часа	-	-	-	-
3	0,1%	48 часов	-	-	-	-
4	0,2%	24 часа	-	-	-	-
5	0,2%	48 часов	-	-	-	-
6	0,3%	24 часа	-	-	-	-
7	0,3%	48 часов	-	-	-	-
8	0,4%	24 часа	-	-	-	-
9	0,4%	48 часов	-	-	-	-
10	0,5%	24 часа	-	-	-	-
11	0,5%	48 часов	-	-	-	-
Гідроксиламін солянокислий						
12	0,1%	24 часа	24 часа	±	24 часа	±
13	0,1%	48 часов	12 часов	±	12 часов	±
14	0,2%	24 часа	-	-	-	-
15	0,2%	48 часов	-	-	-	-
16	0,3%	24 часа	-	-	-	-
17	0,3%	48 часов	-	-	-	-
18	0,4%	24 часа	-	-	-	-
19	0,4%	48 часов	-	-	-	-
10	0,5%	24 часа	-	-	-	-
11	0,5%	48 часов	-	-	-	-

При использовании формаліна для інактивації ешерихій оптимальної оказалась кінцева концентрація 0,5%, при использовании солянокислого гідроксиламіна оптимальної концентрацією явилась 0,2%, теотропіна – 0,1% в течение 24 часов.

Выводы. Для инактивации эшерихий в дальнейшей работе целесообразно использовать солянокислый гидроксилламин и теотропин, а для ротавирусом – теотропин.

Литература

1. Андросик Н.Н. Влияние некоторых инактиваторов и адьювантов на жизнеспособность и иммуногенность бактерий рода *Proteus* / Н.Н. Андросик, Ю.В. Ломако, О.А. Лукин // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – 2007. - №1. – С. 28-32.
2. Бушуева Н.Б. Инактивация пастерелл и сальмонелл при изготовлении биопрепаратов / Н.Б. Бушуева, М.Я. Ярцев // Ветеринария. – 1997. - №11. – С. 23-25.
3. Зайцев В.В. Оптимизация инактивации бактерий в производстве вакцин / В.В. Зайцев // Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных. Материалы международной научно-практической конференции 5-6 октября 2000 / Научный редактор Н.Н. Андросик. – Минск: Хата, 2000 – С. 265-266.
4. Рекомендации по специфической профилактике наиболее распространенных инфекционных болезней крупного рогатого скота в Республике Беларусь: утв. ГУВ МСХ и П РБ 18 января 2007 г. / В.В. Максимович. – Витебск: УО ВГАВМ, 2007. - 54 с.
5. Тетерев И.М. Прополис в животноводстве и ветеринарии / И.М. Тетерев. - Киров, 1998. - 88с.

ВПЛИВ ДЕЯКИХ ІНАКТИВАНТІВ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ РОТАВІРУСІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ І АДГЕЗИВНИХ АНТИГЕНІВ БАКТЕРІЙ *E. COLI*

*Красочко П.А., д. вет. наук, професор; **Максимовіч В.В., д. вет наук, професор;

*Ломако Ю.В., до. вет. наук; *Яромчик Я. П., аспірант

*РУП «Інститут експериментальної ветеринарії ім. С.Н.Вышелесского»
Республіка Білорусь, м. Мінськ;

**УО «Вітебська державна академія ветеринарної медицини», Республіка
Білорусь, м. Вітебськ

Анотація

*Досліджено вплив деяких інактиваторів на життєздатність ротавірусів великої рогатої худоби і адгезивних антигенів бактерій *e. coli*. Показано, що для інактивації ешерихій в подальшій роботі доцільно використовувати солянокислий гідроксилламін і теотропін, а для ротавірусів – теотропін.*

Ключеві слова: *ротавіруси, велика рогата худоба.*