

Авласко Н.М., магистр ветеринарных наук, аспирант
Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор

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

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ИНАКТИВИРОВАННОГО ШТАММА ПАРВОВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ ИНАКТИВИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

Резюме

В статье дана характеристика некоторым инактивантам и представлены сравнительные результаты влияния их на антигенную активность парвовируса.

Summary

The characteristics of several types of inactivants and their influence on antigenic activity of parvovirus is presented in the article.

(Поступила в редакцию 07.05.2012)

ВВЕДЕНИЕ

В условиях ведения современного животноводства особое место занимают массовые аборт, эндометриты и вагиниты у коров с последующим переболеванием полученного от таких животных молодняка пневмоэнтеритами. Сложность борьбы с комплексом такого рода патологий заключается в определенных трудностях, связанных с диагностикой вследствие полиэтиологичности проблемы: выпойка недоброкачественного молозива и молока неправильное кормление и скармливание испорченных кормов, а также инфицирование вирусами и бактериями. Немаловажную роль в симптомакомплексах такого плана играет парвовирусная инфекция крупного рогатого скота [2, 3].

Возникновение массовых заболеваний новорожденных телят пневмоэнтеритами объясняется незрелостью иммунной системы. Заражение животных происходит с первых минут постнатального существования, так как рожденный ничем незащищенный теленок попадает в среду, активно насыщенную различными агентами, нейтрализацию которых у только что родившихся животных обеспечивают материнские антитела. Для обеспечения колостарального иммунитета необходима активная иммунизация стельных коров определенными вирусными антигенами. Огромное количество способствую-

щих факторов, которые значительно снижают естественную резистентность организма новорожденных телят, усугубляют положение. Постоянную угрозу вспышек эпизоотий обуславливает длительная персистенция вирусов и бактерий в организме, а также высокая численность животных на ограниченных территориях. Таким образом, наиболее эффективным способом борьбы с любым инфекционным заболеванием является их специфическая профилактика [4].

Эффективная борьба с инфекционными заболеваниями значительно снижает экономические убытки, которые складываются в основном из непроизводительных затрат на лечение животных. Кроме того, применение в большом количестве антибактериальных препаратов, приводит к дисбактериозам в организме молодняка, наложению условно-патогенной микрофлоры и к повторным заболеваниям [1].

В настоящее время с целью профилактики вирусных инфекций сельскохозяйственных животных используют живые и инактивированные биологические препараты. Однако с течением времени открываются новые инфекции и их ассоциации, которые до сих пор не имели широкого распространения. Таким образом, несмотря на широкое многообразие, как зарубежных, так и отечественных производителей вакцин, на данном этапе развития науки проблема эпизоотического

благополучия хозяйств была, есть и остается актуальной.

При создании нового вакцинного препарата в первую очередь необходимо взвесить все за и против применения живых и инактивированных вакцин. При использовании живых вакцин мы получаем более продолжительный и напряженный иммунитет. Низкая иммуногенность инактивированных вакцин объясняется применением инактиваторов, при введении которых снижается активность антигенов вследствие агрегации части белков, а также повышается реактогенность препаратов. Однако живые вакцины обладают рядом отрицательных качеств, инактивированные же которых лишены. При введении живых антигенов имеется вероятность того, что они могут приобрести патогенные свойства и вызвать заболевания у иммунизированных животных, живые агенты длительное время персистируют в организме и, таким образом, может происходить перезаражение невакцинированных животных [4].

В настоящее время распространенными химическими веществами, используемыми при инаktivации инфекционных агентов, являются формалин и теотропин. Действующим началом в формалине является формальдегид (альдегид муравьиной кислоты, метаналь) – газообразное бесцветное вещество с очень характерным резким запахом. Формальдегид инаktivирует вирусы благодаря высокой реакционной способности в отношении белков и нуклеиновых кислот. Он вступает в соединение не только с вирусными частицами, но и с многочисленными компонентами среды, в которую его добавляют. Повышение концентрации формальдегида в десять и более раз по сравнению с оптимальной (0,1%-ной) приводит к морфологическим изменениям поверхностного антигена вируса и снижению его активности, а увеличение продолжительности обработки сопровождается значительным повреждением капсида некоторых вирионов. С целью смягчения повреждающего действия формальдегида на антигенную структуру и иммуногенность вирусов применяют стабилизирующие вещества, что

значительно повышает себестоимость такой вакцины. Теотропин – препарат нового поколения, используемый как для дезинфекции животноводческих помещений, а также для инаktivации вирусов и бактерий. Активность теотропина обусловлена его способностью проникать в бактериальные клетки и вирусы, взаимодействовать с аминокетонами пуриновых и пиримидановых оснований нуклеиновых кислот, блокируя их матрично-генетическую функцию [5].

Учитывая некоторые отрицательные свойства инаktivаторов, при их подборе следует обращать внимание на ряд аспектов, например инаktivатор должен быстро и стабильно инаktivировать антигенные фракции при наименьшем его количестве. О качестве производимой вакцины также судят по иммуногенности и реактогенности, которые зависят от выбранного инаktivатора.

Целью настоящих исследований явилось изучение влияния различных инаktivированных веществ на антигенную активность парвовируса крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для отработки метода инаktivации вируса использовали аттенуированный штамм парвовируса КМИЭВ-48 (титр 1:512). Парвовирус культивировали на перевиваемой культуре клеток РК-15. В качестве инаktivаторов применяли формалин и теотропин в различных концентрациях.

Для отработки режимов инаktivации парвовируса использовали различные разведения препаратов формалина и теотропин которые добавляли в заранее оттитрованную вирусосодержащую жидкость (титр антигена в РГА $9 \log_2$) до конечной концентрации от 0,1% до 0,5 % и выдерживали в термостате при температуре 37⁰С при периодическом перемешивании. После контакта в течение 24 и 48 часов проверяли полноту инаktivации вируса. Для этого после инаktivации вирус вносили на растущую культуру клеток РК-15 и после культивирования в течение 72–96 часов определяли титр в реакции гемагглютинации (РГА). Предварительно

проводили инактивацию остаточного количества формалина раствором тиосульфата натрия.

Исследования по изучению антигенной активности инаktivированного и неинаktivированного штаммов парвовируса проводили на 20 белых мышах, которых разделили на 4 группы по 5 голов в каждой. Мышам 1-й группы был введен парвовирусный антиген, инаktivированный формалином, внутримышечно в дозе 0,25 мл, мышам 2-й группы – инаktivированный теотропином, 3-й группе – неинаktivированный. Лаборатор-

ные животные 4-й группы служили контролем. На 21 день после введения вируса с различными инаktivантами у мышей путем декапитации отобрали кровь. В полученной сыворотке крови определили уровень специфических антител в реакции торможения геммагглютинации (РТГА).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты исследований по изучению полноты инаktivации парвовируса при использовании различных инаktivирующих веществ представлены в таблице 1 и 2.

Таблица 1 – Инаktivация парвовируса при применении формалина и теотропина в различных концентрациях

№ п/п	Концентрация инаktivантов, %	Время контакта с инаktivантом	Титр парвовируса в РГА после инаktivации и культивирования на культуре клеток	
			Формалин	Теотропин
1	0,1	24 часа	1:512	1:8
2	0,1	48 часов	1:512	1:8
3	0,2	24 часа	1:128	1:4
4	0,2	48 часов	1:16	1:4
5	0,3	24 часа	1:8	1:4
6	0,3	48 часов	1:8	1:4
7	0,4	24 часа	1:8	1:4
8	0,4	48 часов	1:8	1:4
9	0,5	24 часа	1:4	1:4
10	0,5	48 часов	1:4	1:4
11	Контроль инаktivанта 0,1%	-	-	-
12	Контроль инаktivанта 0,2%	-	24 часа (дегенерация клеток) +	-
13	Контроль инаktivанта 0,3%	-	24 часа (дегенерация клеток) +++	-
14	Контроль инаktivанта 0,4%	-	12 часа (дегенерация клеток) ++++	24 часа (дегенерация клеток) +
15	Контроль инаktivанта 0,5%	-	12 часа (дегенерация клеток) ++++	12 часа (дегенерация клеток) +++

Из таблицы 1 видно, что наиболее полная инаktivация парвовируса происходит при добавлении формалина в 0,5 %-ной концентрации в течение 24 и 48 часов, теотропина – в 0,2% концентрации в течение 24 часов. При изучении влияния на культуру клеток инаktivантов установлено, что формалин только в 0,1% концентрации не оказывает влияния на клетки, а теотропин – в 0,2% концентрации. Однако формалин начиная с 0,2% концентрации, а теотропин – с 0,3% концен-

трации вызывает разрушение монослоя и дегенерацию клеток.

Таким образом, в дальнейшем для инаktivации парвовируса нами использована 0,2 % концентрация теотропина и 0,4% концентрация формалина.

Результаты по изучению антигенной активности инаktivированного и неинаktivированного парвовируса приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Антигенная активность инактивированных и неинактивированных штаммов парвовируса

№ п/п	Группы животных	Наименование вирусного антигена	Инактивант	Титр антител в РТГА
1	Опытная группа № 1	Парвовирус инактивированный	Формалин	1:16
2	Опытная группа № 2		Теотропин	1:32
3	Опытная группа № 3	Парвовирус неинактивированный	-	1:16
4	Контрольная группа (плацебо)		-	0

Установлено, что парвовирус после инактивации как формалином так и теотропином при внутримышечном введении его мышам приводит к выработке специфических антител. Титр антител определяемый в реакции задержки гемагглютинации как при введении инактивированных, так и при введении неинактивированных штаммов составляет 1:16–1:32, что свидетельствует о достаточно высокой антигенной активности вируса. Так как формалин в конечной concentra-

ции 0,4 % вызывает дегенерацию клеточного монослоя, следовательно, применение формалина в качестве инактиванта не представляется возможным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для инактивации парвовируса культивируемого на культуре клеток РК-15 наиболее оптимальным является использование теотропина в 0,2 %-ной концентрации при экспозиции 24 часа.

ЛИТЕРАТУРА

1 Апатенко, В.М. Смешанные инфекции сельскохозяйственных животных / В.М. Апатенко. - 2-е изд. - Киев: Урожай, 1990. - 176 с.
 2 Болезни сельскохозяйственных животных // Красочко П.А., Якубовский М.В., Ятусевич А.И., Зелютков Ю.Г. и др. Науч. ред. Красочко П.А. - Минск, Бизнесофсет, 2005. - 800 с.
 3 Красочко, П.А. Методические рекомендации по профилактике, лечению и мерам борьбы с пневмоэнтеритами телят / Под ред. П.А. Красочко //

Мн., Энциклопедикс, 2000. - 40 с.

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 [и др.]. - Витебск: УО ВГАВМ, 2007.- 54 с.

5 Химические методы инактивации вирусов // [Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://meduniver.com/Medical/Microbiology/965.html>