

Литература

1. Артюхов И.Л., Шокун Ю.Г. Применение мембранного процесса для получения ферментного препарата из рыбного сырья: научн.тр. Дальрыбвтуза-Владивосток, 1999. - Вып.2. - С.120-126.
2. Федоренко Б.Н., Трефилов Э.М., Згуревец Н.А. Снижение потерь фермента от инактивации в промышленной ультрафильтрации: тез. докл.Всес. конф. «Биотехнология 86». - М. - 1986. - С.99-100.
3. Hu G., Leger R.J. A phylogenetic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi// Journal of Evolutional Biology.-2004.-V.17.-P.1204-1214.
4. Leiros N.K., Brandsdal B.O., Andersen O.A., Os V., Leiros I., Helland R., Otlewski J., Willassen N.P/, Smalas A.O. Trysin specificity by LIE calculations, X-ray structures, and association constant measurements //Protein Sci. - 2004. - V.13, N.4. - P.1056-1070.
5. Polgar L. The catalytic triad of serine peptidases // Cell. Mol. Life Sci.-2005.-V.62.-P.2161-2172.
6. Rawlings N.D., Barrett A.J. Families of serine peptidases // Methods in Enzymology.-1994.-V.244.-P.19-61.

ПОДБОР ИНАКТИВАНТОВ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

П.П.Красочко, В.П.Красочко

Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины, Витебск, Республика Беларусь
e-mail: 7696695@gmail.com

Профилактика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных невозможна без применения эффективных вакцин. На рынке биопрепаратов имеется большое количество вакцин, многие из которых совершенствуются. Для профилактики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (ИРТ КРС) встречаются как моновакцины так и поливалентные, содержащие антигены возбудителей других инфекций. Кроме того, на ряду с живыми вакцинами имеются и инактивированные. В последнее время отмечается тенденция в переходе применения живых вакцин на инактивированные вакцины. Последние имеют существенные преимущества – менее жесткие требования к хранению и транспортировке, отсутствие осложнений в виде развития инфекции после вакцинации ослабленных организмов. Кроме то-

го, применение живых вакцин ограничивается ветеринарным законодательством.

При изготовлении инактивированной вакцины важным этапом работы является подбор эффективного инактиванта, который полностью инактивирует патоген, сохраняя его иммуногенность, а также не оказывает отрицательного влияния на здоровье животных.

Материалы и методы. Для проведения инаktivации вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота были использованы ряд инактивантов – теотропин, прополис, формалин.

Формалин представляет собой бесцветную жидкость с характерным резким запахом. Применяется во многих отраслях промышленности. В ветеринарной практике применяется в качестве дезинфектанта животноводческих помещений и консерванта для гистологических исследований. Выраженное свойство коагуляции белков позволяет применять его для уничтожения вирусов бактерий и плесневых грибов. Применяемый для инаktivации вирусов формалин обладает такими отрицательными свойствами, как повышенная токсичность, реактогенность и иммунодепрессия. Для преодоления этого необходима нейтрализация формалина, что удорожает стоимость вакцины и в то же время осложняет технологический процесс изготовления вакцины.

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. Водные растворы стойкие, при комнатной температуре (18-20⁰С) сохраняют свое действие в течение 4-х месяцев. Теотропин – препарат нового поколения, используемый не только как дезинфектант, но и препарат для инаktivации вирусов и бактерий.

Бета-пропиолактон представляет собой высокоактивный алкилирующий агент, нестойкий в водных растворах и легко гидролизуемый с образованием безвредных веществ: гидроакриловой и бета-оксипропионовой кис-

лот. В связи с этим отпадает необходимость в нейтрализации избытка бета-пропиолактона и продуктов его распада.

Димер этиленимина - насыщенное, гетероциклическое соединение, впервые было синтезировано из бромэтиламина в 1988 г. и относится к группе высокореакционных алкилирующих соединений, обладающих токсичностью.

Димер этиленимина оказывает сильное инактивирующее действие на вирусы, сохраняя их антигенные свойства. Его инактивирующий эффект на вирусы объясняется депуринизацией и последующей деполимеризацией нуклеиновых кислот.

Для отработки методов инаktivации вакцинного штамма вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, «КМИЭВ-V123», с использованием теотропина, димер этиленимина, бета-пропиолактона и формалина были использованы различные разведения препаратов (от 0,1- до 0,5%) путем их добавления в заранее оттитрованную вирусосодержащую жидкость. После контакта вирусов с инаktivантами в течение 24, 48, 72, 96 и 120 часов была проверена полнота инаktivации вирусов на культуре клеток.

Для работы использован штамм вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота «КМИЭВ-V123» с инфекционной активностью $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$.

Для изучения антигенной активности инаktivированного и неинаktivированного вируса ИРТ исследования проведены на лабораторных животных. Для этого использованы белые мыши.

На первом этапе было сформировано 6 групп белых мышей по 5 голов в группе. После проверки каждого из вирусных антигенов через 21 день после их введения мыши были тотально обескровлены и в сыворотках крови был определен титр противовирусных антител в РНГА или РН.

Результаты исследований. На первом этапе работы было изучено влияние инаktivантов на клеточный монослой, чтобы исключить неспеци-

фическую дегенерацию культуры клеток из-за действия инактиванта. Для этого на сформированный монослой вносили питательную среду, содержащую инактивант в различной концентрации. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Влияние различной концентрации инактивантов
на культуру клеток МДБК

Инактивант	Концентрация, %	Время контакта, ч				
		12	24	48	72	96
1	2	3	4	5	6	7
Формалин	0,05	+	+	+	+	+
	0,1	+	+	+	+	+
	0,2	+	+	-	-	-
	0,3	+	-	-	-	-
	0,4	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-	-
Теотропин	0,05	+	+	+	+	+
	0,1	+	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	+	+
	0,3	+	+	-	-	-
	0,4	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-	-
Димер этиленимина	0,05	+	+	+	+	+
	0,1	+	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	+	-
	0,3	+	+	+	+	-
	0,4	+	-	-	-	-
	0,5	+	-	-	-	-
Бета-пропиолактон	0,05	+	+	+	+	+
	0,1	+	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	+	-
	0,3	+	+	+	+	-
	0,4	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-	-
Контроль	-	+	+	+	+	+

* - «+» - клеточный монослой без изменений,
«-» - дегенерация клеток монослоя.

При изучении влияния инактивантов на культуру клеток МДБК установлено, что добавление на монослой формалина в концентрации свыше 0,1% вызывало дегенерацию монослоя. Для устранения этого эффекта воз-

можно нейтрализация формалина 10% раствором тиосульфата натрия. При добавлении теотропина, димера этиленimina и бета-пропиолактона в различных концентрациях установлено, что концентрация препаратов свыше 0,2% ведет к дегенерации монослоя культуры клеток.

На втором этапе работы была установлена оптимальная концентрация инактиванта для полной инактивации вируса. Результаты представлены в таблице 2.

При инактивации вируса инфекционного ринотрахеита с использованием формалина оптимальной оказалась его 0,2% концентрация в течение 48 часов, при использовании теотропина – 0,15% концентрация в течении 24 часов, бета-пропиолактона - 0,15% - в течение 28 часов, димера этиленimina - 0,2% концентрация в течение 24 часов.

Таблица 2
Влияние времени контакта с инактивантом и его концентрации на инактивацию вируса ИРТ КРС

Инактивант	Концентрация, %	Время контакта с инактивантом, ч				
		24	48	72	96	120
Формалин	0,05	-	-	-	+	+
	0,1	-	-	+	+	+
	0,125	-	+	+	+	+
	0,15	-	+	+	+	+
	0,2	-	+	+	+	+
Теотропин	0,05	-	+	+	+	+
	0,1	+	+	+	+	+
	0,125	+	+	+	+	+
	0,15	+	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	+	+
Бета-пропиолактон	0,05	-	+	+	+	+
	0,1	-	+	+	+	+
	0,125	-	+	+	+	+
	0,15	+	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	+	+
Димер этиленimina	0,05	-	-	-	-	+
	0,1	-	-	-	+	+
	0,125	-	+	+	+	+
	0,15	-	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	+	+

* - «+» - вирус инактивирован

«-» - вирус не инактивирован

В связи с активным воздействием инактиванта на белки вируса, возможно их повреждение и как следствие снижение иммуногенности при введении животным. Поэтому для изучения влияния инактивантов на иммуногенность получаемого препарата был поставлен опыт на белых мышах.

В таблице 3 представлены результаты изучения титров противовирусных антител у мышей при отработке оптимального метода инактивации вирусов.

Таблица 3

Результаты изучения титров противовирусных антител у мышей при отработке оптимального метода инактивации вирусов

№ № п/п	Группы животных	Наименование вирусного антигена	Инактивант	Кол-во мышей в группе	Титр антител в РНГА
1	Опытная группа № 1	Вирус ИРТ, инактивированный	Формалин	5	1:16
2	Опытная группа № 2		Теотропин	5	1:32
3	Опытная группа № 3		Димер этиленimina	5	1:16
4	Опытная группа № 4		Бета-пропиолактон	5	1:16
5	Опытная группа № 5	Вирус ИРТ, живой	-	5	1:8
6	Контрольная группа	-	-	5	1:2

Как видно из таблицы 3, наилучшей иммуногенностью обладал вирус, инактивированный теотропином.

Заключение. Несмотря на эффективность проверенных временем инактивантов поиск новых обусловлен наличием у первых определенных недостатков: высокая реактрогенность, необходимость нейтрализации инактиванта и снижение иммуногенности вируса. Проведенные исследования показали преимущество инактиванта теотропина, который позволяет быстрее и в более низкой концентрации инактивировать вирус с сохранением его высо-

кой иммуногенности. В результате опытов были установлены оптимальные параметры применения инактиванта: в концентрации 0,15% он инактивирует вирус за 24 часа. Обработанный таким образом вирус способствует образованию специфических антител у мышей в титре 1:32, что выше по сравнению с инактивацией формалином, димером этиленimina и бета-пропиолактоном (титр 1:16).

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ АДЬЮВАНТОВ ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ХЛАМИДИОЗА РОГАТОГО СКОТА

*В.В.Евстифеев, Д.И.Нигъматуллина, Ф.М.Хусаинов, Л.А.Барбарова,
Г.И.Хусаинова, Н.Р. Мифтахов*

Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности (ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), Казань
e-mail: vnivi@mail.ru

В связи с широким распространением хламидиоза, наносимым им ущербом для животноводства и потенциальной угрозой для здоровья человека, специфическая профилактика этого инфекционного заболевания является актуальной задачей для ветеринарных специалистов.

Для хламидиозной инфекции характерна недостаточная иммуногенность возбудителя, что препятствует выработке антител в необходимом количестве и способствует продолжительному персистированию хламидий в организме животных, создавая хронические очаги инфекции. Эта особенность возбудителя хламидиоза обуславливает необходимость изыскания и внедрения в ветеринарную практику эффективных средств специфической профилактики, обеспечивающих формирование высокого уровня гуморального иммунитета, без чего невозможна эффективная борьба с хламидиозной инфекцией.

Распространение получили эмульсионные вакцины, которые состоят из минерального масла с растворенным в нем липофильным эмульгатором и