

основном это гипофункция - 35,1 % в различной степени ее проявления, задержка овуляции - 18,9 % коров, ановуляторные половые циклы - 14,9 %, что в 2,5-3 раза больше, чем в группе здоровых животных.

Таблица 3 - Соотношение здоровых и больных субклиническим хламидиозным эндометритом животных по функциональному состоянию яичников, %

Группы животных	Гипофункция яичников	Задержка овуляции	Ановул. половой цикл	Лютеинизац. фолликула	Перс. желт. тело	Фолликул. кисты	Норм. сост. яичников
Здоровые	9,3	7,4	5,1	1,6	8,3	1,2	67,1
Больные	35,1	18,9	14,9	7,2	15,9	2,9	11,0

Такое состояние яичников у коров, больных скрытым эндометритом, объясняется тем, что количество эстрадиола 17-β в период половой охоты в 1,7 раза ниже по сравнению со здоровыми животными (соответственно 787±48,2 и 1342±141,0 пмоль/л) из-за недостаточного развития фолликула и задержки овуляции. В то же время в период половой охоты концентрация прогестерона в крови больных коров в 2,2 раза выше, чем у здоровых (соответственно 4,7±0,30 и 2,2±0,21 нмоль/л). Затем происходит снижение уровня прогестерона в крови больных животных и к моменту расцвета желтого тела становится ниже, чем у здоровых животных (соответственно 12,5±1,20 и 18,7±1,62 нмоль/л). Повышенный уровень прогестерона у больных коров в период половой охоты свидетельствует о наличии лютеиновых структур, а пониженный уровень этого гормона (до 7 суток полового цикла) указывает на недостаточную функцию желтого тела и наличие ановуляторных половых циклов у больных животных.

Также отмечается уменьшение уровня простагландина Ф-2α, который был ниже в 1,8 раза по сравнению со здоровыми животными. Такая динамика перечисленных выше гормонов приводит к задержке овуляции, ановуляторным половым циклам у больных животных и образованию лютеиновых структур. Снижение концентрации простагландина Ф-2α указывает на ограничение выработки этого биологически активного вещества в матке при субклиническом хламидиозном эндометрите, что способствует удлинению сроков регрессии желтых тел полового цикла.

В своей работе мы изучили степень раскрытия канала шейки матки у больных субклиническим хламидиозным эндометритом коров при различном функциональном состоянии яичников. Для этого путем ректальной фиксации шейки матки в ее канал вводили стерильную осеменительную пипетку. Она с трудом проходит по влагалищу (за счет наличия густой тягучей слизи), но без труда вводится в цервикальный канал и входит в полость рога матки. После извлечения пипетки из канала в ее полости и на стенках обнаруживается слизь с включениями гноя. Характерным признаком наличия скрытого эндометрита является приоткрытый канал шейки матки в межэстральный период при наличии желтых тел в яичниках. Имеющиеся желтые тела возвышаются над поверхностью яичника в виде грибовидного образования и имеют неглубокое основание, в отличие от полноценных желтых тел полового цикла и беременности, которые находятся глубоко в паренхиме яичника и незначительно возвышаются над его поверхностью. У 15,9 % коров наблюдали персистенцию желтых тел в яичниках. Возможно, это связано с уменьшением синтеза простагландина Ф-2α в матке при наличии воспалительного процесса.

Заключение. Таким образом, реакция рН среды содержимого матки у здоровых и больных субклиническим хламидиозным эндометритом коров не изменяется и находится в пределах 8. Диагностика субклинического хламидиозного эндометрита в период половой охоты производится по наличию в течковой слизи гнойных включений и нейтрофилов в мазке – отпечатке и путем окраски по Стампу мазков-отпечатков со слизистой оболочки матки, а также в серологических реакциях. В межэстральный период установить скрытый хламидиозный эндометрит возможно по приоткрытому каналу шейки матки, состоянию стенки рогов матки и наличию в яичниках желтых тел, нарастанию титров антител в два и более раза в парных пробах сыворотки.

УДК: 619:615.28:578.825.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕОТРОПИНА ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ

Чаплыго К.Э., Гусев А.А.

РДУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

В статье приведено описание метода химической инактивации вируса болезни Ауески теотропином. Полученная инактивированная вирусная суспензия проверена на антигенную активность. Проведенные эксперименты свидетельствуют о возможности использования данного способа инактивации для изготовления инактивированной вакцины.

This article gives the description of the mode chemical inactivation a virus of pseudorabies by teotropen. This obtained inactivated virus suspension is checked up on antigenic activity. Carried out tests show the opportunity of use of the mode inactivation for manufacture inactivated vaccine.

Введение. Среди инфекционных заболеваний свиней вирусной этиологии особое место занимают болезни молодняка, протекающие в форме эпизоотии с высокой смертностью животных. К ним в первую очередь

относится болезнь Ауески (БА), которая регистрируется на территории Республики Беларусь и наносит значительный экономический ущерб свиноводству.

Наиболее тяжело БА протекает у поросят – сосунов. Заболеваемость и летальность этой категории животных достигает 95-100%. В защите новорожденных поросят от инфекционных агентов основную роль играют колостральные антитела, поэтому особое внимание надо уделять схемам вакцинации супоросных свиноматок, с целью обеспечения высокой концентрации антител в их молозиве [3].

В настоящее время для специфической профилактики БА разработан ряд живых и инактивированных вакцин. Живые вакцины создают продолжительный и напряженный иммунитет, но при циркуляции возбудителя в стаде животных существует риск приобретения вакцинным штаммом патогенных свойств. Необходимо также учитывать способность данного вируса переходить в латентное состояние и реактивироваться под действием стресс-фактора, которым может явиться опорос.

Немаловажным является и тот факт, что живые вакцины обеспечивают напряженный клеточный иммунитет и относительно слабый гуморальный, поэтому больше подходят для иммунизации поросят – отъемышей и свиней на откорме.

Инактивированные вакцины, напротив, обеспечивают создание напряженного гуморального иммунитета, являясь при этом безопасным продуктом, так как не могут вызвать реверсию вирулентности [9].

При производстве инактивированных вакцин большое значение имеет подбор инактиванта и оптимальных параметров инактивации, способных обеспечить потерю инфекционной активности вирусной частицы, при максимальном сохранении ее антигенной структуры [4].

Все методы инактивации, в зависимости от используемого инактивирующего агента, условно можно разделить на физические, химические и их сочетание.

Из физических методов для инактивации вирусов наиболее часто применяют ионизирующее и ультрафиолетовое излучения (УФИ).

Инактивирующий эффект ультрафиолетового излучения основан на его способности вызывать изменения структуры нуклеиновой кислоты (НК) вируса за счет образования пиримидиновых димеров, также может происходить гидроксильное цитозина и урацила, формирование поперечных сшивок, разрывы цепей и денатурация ДНК. Значение таких повреждений возрастает при повышении интенсивности облучения.

Механизм действия ионизирующего излучения основан на изменении третичной структуры НК, за счет образования одноцепочечных или двухцепочечных разрывов в молекуле.

Однако применение УФ и гаммалучей имеет ряд недостатков: сложность подбора дозы облучения; содержание в вирусной суспензии балластных примесей, которые могут обладать экранирующим эффектом и не позволять полностью инактивировать вирус; непригодность для получения большого количества авирулентного антигена [8].

В качестве химических инактиваторов в ветеринарной биотехнологии чаще всего используют: формальдегид, бетапропиолактон, этиленмин и его производные.

Механизм действия формальдегида основан на подавлении матричной активности НК вирусов. Это происходит за счет способности формальдегида фиксировать азотистые основания, освобождающиеся от водородных связей в процессе репликации ДНК. Влияние формальдегида на структуру белка заключается в образовании конечных сшивок между полипептидами, с последующим уплотнением и нарушением проницаемости белковой оболочки вируса [1], [7].

Недостатком применения формальдегида является его высокая токсичность, вследствие чего возникает необходимость введения в рецептуру вакцины раствора гипосульфита натрия для нейтрализации остаточного количества инактиванта. Немаловажным является и тот факт, что формальдегид, инактивируя вирус, разрушает антигенную структуру вириона.

Этиленмин и его производные (ацетилэтиленмин, этилэтиленмин, димерэтиленмин) оказывают сильное инактивирующее действие путем депуринизации НК вируса, которая возникает вследствие разрыва N-гликозидной связи, соединяющей пуриновые основания с остатками дезоксирибозы. Этиленмин является высокотоксичным препаратом (ЛД₅₀ 5-15 мг/кг живой массы), поэтому при его использовании остатки инактиванта необходимо подвергать нейтрализации [2].

Бетапропиолактон представляет собой алкилирующий агент. Данный инактиватор при растворении в воде быстро распадается с образованием высокоактивных производных, содержащих избыточный положительный заряд (электрофильную группу). Электрофильная группа взаимодействует с отрицательными зарядами (нуклеофильными группами) молекулы ДНК, образуя стабильную ковалентную связь и тем самым нарушая процесс репликации вирусного генома. Бетапропиолактон является токсичным веществом и оказывает сильное раздражающее и мутагенное действие на организм (ЛД₅₀ 50-100 мг/кг живой массы для белых мышей) [6].

В последнее время среди химических инактиваторов широкое применение нашли препараты группы амантадинов. Одним из представителей этого класса является теотропин.

Теотропин – продукт синтеза этилендиамина с формальдегидом в водной среде при температуре 12°C. Представляет собой мелкокристаллический порошок желтоватого цвета со специфическим запахом, хорошо растворим в воде, ацетоне, спирте. Водные растворы теотропина сохраняют свое дезинфицирующее действие в широком диапазоне температуры (от +4 до +40 °C) в течение не менее 120 суток.

Теотропин имеет низкий уровень токсичности (ЛД₅₀ для белых мышей 375 мг/кг при подкожном введении, ЭЛД₅₀ для развивающихся куриных эмбрионов составляет 364 мкг/кг), может быть использован в присутствии животных и птицы.

Теотропин обладает ярко выраженным вирулицидным действием. В частности, препарат был испытан для инактивации возбудителей таких вирусных инфекций, как классическая чума свиней, болезнь Тешена, ящур, катаральная лихорадка овец, болезнь Ньюкасла и др. Механизм действия теотропина обусловлен его способностью проникать в вирусную частицу и взаимодействовать с аминогруппами пуриновых и пиримидиновых оснований НК, блокируя их матричную активность [5].

Целью наших исследований явилась отработка параметров инактивации вируса БА теотропином, для конструирования инактивированной вакцины.

Материалы и методы. В работе был использован вакцинный штамм вируса болезни Ауески с титром инфекционной активности $8,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Вирус размножали в перевиваемой культуре клеток ВНК-21 (почка новорожденного сирийского хомячка) роллерным методом с соблюдением следующих параметров: температурный режим – 37°C , значение pH – 7,4 – 7,6, доза заражения 0,05 – 0,1 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$.

Заражение вирусом производили на сплошной клеточный монослой 1 -2-суточной культуры. В качестве ростовой среды использовали смесь ФГМ и ДМЕМ в соотношении 3:1 с добавлением 3% инактивированной сыворотки крупного рогатого скота, гентамицина из расчета 50 мг/мл, амфотерицина 2,5 мг/мл. Культивирование вируса осуществляли в течение 17 – 24 часов до 90% поражения клеточного монослоя.

После двухразового замораживания (при -20°C) и оттаивания содержимое роллеров сливали в стерильные флаконы объемом по 450 мл.

Стерильность полученной вирусной суспензии контролировали высевами на элективные среды: мясопептонный бульон (МГБ), мясопептонный агар (МПА), среду Китта-Тароцци и среду Сабуро.

Инфекционную активность вируса определяли путем титрации на культуре клеток ВНК – 21 по общепринятой методике. Конечный учет титрации проводили на 5 сутки по наличию или отсутствию цитопатических изменений в клетках. Результаты считали достоверными при сохранении интактного клеточного монослоя в контроле. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча в модификации Ашмарина и выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

С целью определения возможного токсического действия теотропина на культуру клеток ВНК-21, препарат в концентрациях 0,05% и 0,1% инокулировали на клеточный монослой. После двухчасового контакта при $t - 37^\circ\text{C}$, раствор теотропина удаляли, монослой промывали раствором Хенкса и добавляли поддерживающую среду.

Для изучения влияния теотропина на вирус 10% водный раствор вносили в заранее оттитрованную вирусосодержащую жидкость до конечной концентрации 0,05, 0,1%. Так как теотропин вызывает резкое повышение концентрации водородных ионов, при его добавлении к вирусной суспензии проводили коррекцию pH с помощью 5% раствора уксусной кислоты. Инактивацию вирусного материала проводили в течение 48 часов при температурных режимах $- 20^\circ\text{C}$, 37°C и значениях pH – 7,2, 7,8 при периодическом перемешивании.

Для изучения динамики инактивации вируса осуществляли отбор проб инактивируемого материала через 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 часов с последующей титрацией на культуре клеток. Контролем служила вирусосодержащая жидкость без добавления теотропина, выдержанная при тех же параметрах. Константу скорости инактивации (K) рассчитывали по уравнению 1-го порядка, выражая в час^{-1} .

Полноту инактивации вируса определяли в культуре клеток ВНК – 21, не менее чем в 3-х последовательных пассажах.

Антигенную активность образцов инактивированного вируса оценивали по титру вируснейтрализующих антител (ВНА) в сыворотках крови иммунизированных белых мышей. Реакцию нейтрализации ставили на культуре клеток ВНК – 21 с использованием двукратных разведений сывороток и постоянной дозой вируса $150 \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. За титр антител сыворотки принимали то ее разведение, которое еще сдерживало развитие цитопатического действия вируса в 50% зараженных культур клеток.

Результаты исследований. Полученные результаты показали, что контакт монослоя культуры клеток ВНК-21 с исследуемыми концентрациями инактиванта не вызвал в нем развития никаких видимых деструктивных изменений.

Изучение влияния различных концентраций теотропина на инактивацию вируса болезни Ауески первоначально проводили при температуре $- 37^\circ\text{C}$ и pH-7,2.

С целью определения динамики инактивации вируса через заданные интервалы времени отбирали пробы материала и определяли их остаточную инфекционность методом титрации на культуре клеток ВНК-21 (рис. 1).

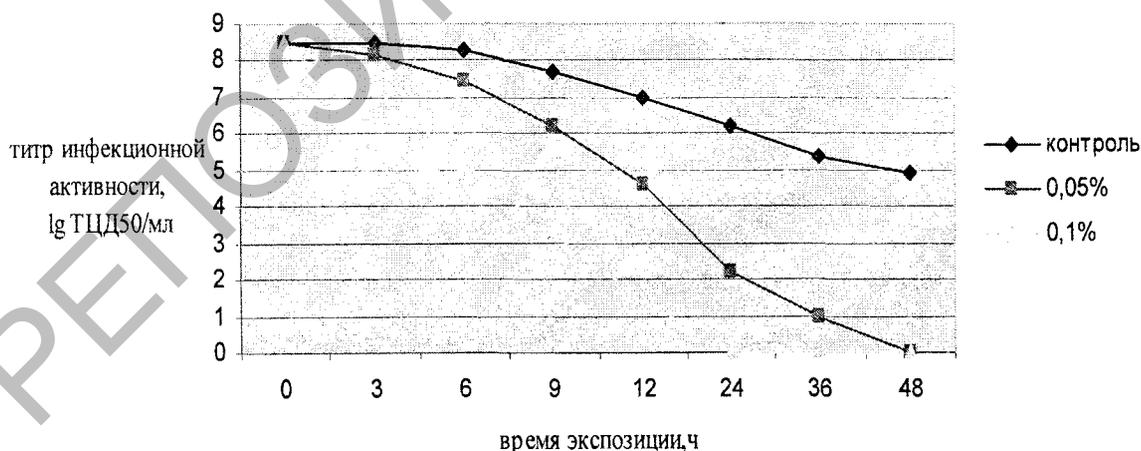


Рисунок 1 – Динамика снижения инфекционной активности вируса БА при инактивации теотропином (0,1%, 0,05%)

Из рисунка 1 видно, что эффективность воздействия инактиванта безусловно определяется его концентрацией.

Константу скорости инактивации рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{2,303}{t} * \lg \frac{C_0}{C}$$

где: $\lg C_0$ - исходный титр вируса;

$\lg C$ - титр вируса через определенный промежуток времени;

t - время инактивации;

2,303 - коэффициент перевода натуральных логарифмов в десятичные.

Результаты расчета константы скорости инактивации вируса представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Зависимость константы скорости инактивации вируса БА от концентрации инактиванта

Время, ч	3	6	9	12	24	36
$K_1 \cdot 10^{-2}, \text{ч}$	1,5	2,5	3,2	4,4	-	-
$K_2 \cdot 10^{-2}, \text{ч}$	0,4	0,7	1,0	1,5	1,6	1,7

Примечание: * K_1 -константа скорости инактивации при концентрации теотропина 0,1%;

K_2 - константа скорости инактивации при концентрации теотропина 0,05%

Как видно из таб.1, константа скорости инактивации при использовании теотропина в концентрации 0,1% остается достаточно высокой на протяжении всего времени инактивации. Низкое значение константы при применении теотропина в концентрации 0,05% объясняет необходимость увеличения экспозиции вируса с инактивантом при использовании данного режима инактивации.

В результате проведенных исследований было установлено, что теотропин в концентрации 0,1% инактивирует вирус в течение 24 часов. А при концентрации теотропина 0,05% инфекционная активность при той же экспозиции составила 2,17 \lg ТЦД₅₀/см³, инактивацию вируса наблюдали через 48 часов.

При проведении последовательных пассажей инактивированного материала на культуре клеток ВНК-21, вирус был выявлен на 3-м пассаже. С учетом полученных данных было решено изменить значение pH инактивируемой вирусной суспензии до 7,8, при сохранении остальных параметров.

Результаты опыта показали, что теотропин в концентрации 0,1% и pH 7,8 полностью инактивирует вирус в течение 24 часов. При применении такого режима инактивации вирус не выделялся в 3-х последовательных пассажах на культуре клеток ВНК-21.

На основании полученных данных для дальнейшего исследования было выбрано применение теотропина в концентрации 0,1% и pH 7,8.

Следующим этапом работы стало изучение динамики инактивации вируса при t=20 °С. Установлено, что снижение температуры до 20 °С способствует уменьшению степени инактивирующего воздействия теотропина и увеличению времени экспозиции до 36 часов (рис. 2).

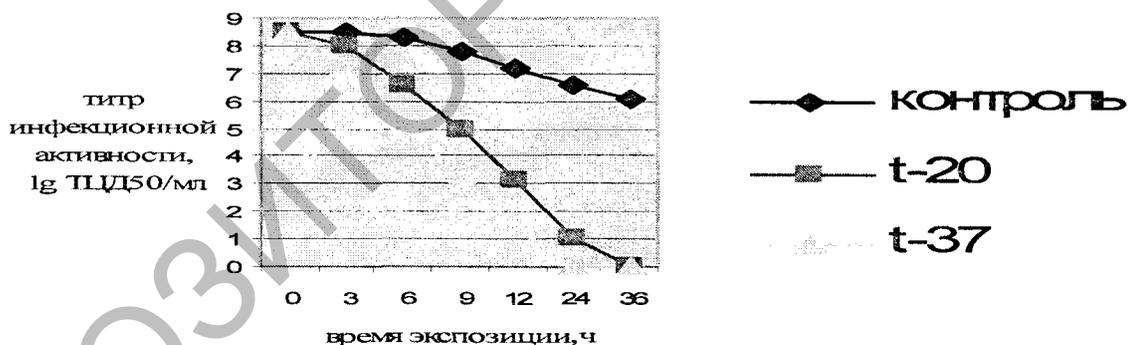


Рисунок 2 – Динамика снижения инфекционной активности вируса БА при инактивации теотропином (t=20°C, t=37 °С)

Результаты расчета константы скорости инактивации вируса представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Зависимость константы скорости инактивации вируса БА от температуры

Время, ч	3	6	9	12	24
$K_1 \cdot 10^{-2}, \text{ч}$	1,5	2,5	3,2	4,4	-
$K_2 \cdot 10^{-2}, \text{ч}$	0,6	1,2	1,7	2,4	2,6

Примечание: * K_1 -константа скорости инактивации при t=37°C

K_2 - константа скорости инактивации при t=20 °С

Как видно из таблицы 2, значение константы скорости инактивации при применении температурного режима 20°C ниже по сравнению с показателями константы, полученными при 37°C, что объясняет необходимость увеличения экспозиции вируса с инактивантом до 36 часов.

С учетом отработанных режимов инактивации были приготовлены образцы авирулентного антигена:

1-й образец – вируссодержащий материал с титром инфекционной активности 8,5 \lg ТЦД₅₀/см³, инактивированный теотропином в конечной концентрации 0,1% при t= 37 °С, pH=7,8, время экспозиции 24 часа;

2-й образец – вирусодержащий материал с титром инфекционной активности $8,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, инактивированный теотропином в конечной концентрации 0,1% при $t=20^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7,8$, время экспозиции 36 часов.

Антигенная активность полученных образцов была испытана на белых мышах. Для этого были сформированы 3 группы беспородных белых мышей живой массой 18 г, по 5 голов в каждой. Авирулентный антиген вводили мышам подкожно в области лопатки в дозе $0,2 \text{ см}^3$. Мышам контрольной группы вводили живой вирус в той же дозе. Через 21 день мыши были тотально обескровлены. Сыворотки крови были исследованы в реакции нейтрализации на наличие ВН-антител.

Результаты испытаний показали, что все образцы антигена при инокуляции животным вызывали синтез вирусспецифических антител (таб.3).

Таблица 3 - Антигенная активность инактивированного теотропином вируса БА

Наименование материала	титр антител, \log_2
Вирус БА без инактиванта	6,2
Вирус БА+0,1%теотропин ($t - 37^\circ\text{C}$, $\text{pH} - 7,8$, 24ч)	5,4
Вирус БА+0,1%теотропин ($t - 20^\circ\text{C}$, $\text{pH} - 7,8$, 36ч)	5,3

Титры антител в сыворотках крови мышей, привитых исходным вирусом, выше по сравнению с титрами антител, полученных в сыворотках мышей остальных групп. Иммуногенность же обоих образцов с авирулентным антигеном находится на почти одинаковом уровне. Поэтому, с учетом меньшей пригодности условий приготовления образца №2 (концентрация теотропина - 0,1%, $t - 20^\circ\text{C}$, $\text{pH} - 7,8$, время экспозиции 36 часов), был выбран режим инактивации: концентрация теотропина - 0,1%, $t - 37^\circ\text{C}$, $\text{pH} - 7,8$, время экспозиции 24 часа.

Заключение. Показана возможность использования теотропина в качестве инактиванта при конструировании инактивированной вакцины против болезни Ауески. На основании проведенных опытов определены оптимальные параметры инактивации вируса болезни Ауески 0,1% раствором теотропина при $t - 37^\circ\text{C}$, $\text{pH} - 7,8$, и времени экспозиции 24 часа. Изучены показатели антигенной активности инактивированного вируса, полученного с применением данного способа инактивации.

Литература. 1. Костина, Т.И. К вопросу о механизмах химической инактивации микроорганизмов/Т.И.Костина//ЖМЭИ.-1981.-№8.-С.25-32. 2. Кошелева А.А. Инактивация вирусов различных таксономических групп теотропином и димерэтиленимином /А.А.Кошелева //Актуальные проблемы ветеринарной патологии и морфологии животных: Материалы Межд. науч. - прощв. конф., посвященной 100-летию Авророва-Воронеж, 2006.-С.1055-1057. 3. Максимович, В.В. Инфекционные болезни свиней/В.В.Максимович.-Витебск: УО ВГАВМ, 2007.-373с. 4. Медуницын, Н.В. Вакцинология/Н.В.Медуницын. Москва: Триада, 1999.-324с. 5. Патент РФ №2123337, А61К31/645, А61L2/16, 2118, 20.03.97а. 6. Химический канцерогенез [Электрон. ресурс].- 2009.-Режим доступа: <http://www.ronc.ru/4044>.- Дата доступа: 18.05.2009. 7. Fraenkel-Conrat, H. Chemical modification of viruses/ H. Fraenkel-Conrat// Comprehens virology.-1981.-V.17, P.245-283. 8. Heins J. New vaccines/J. Heins // J. Med.-1999.-V.52, №1.-P.21-22. 9. Wittmann, G. Augeszky's disease vaccination and infection of pigs with maternal immunity: effects on cell- and antibody- mediated immunity/G. Wittmann // Arch. Virol. -1987. -V. 92, № 1/2. - P. 87-101.