

УДК 616.988-085.371

МАТЛАК Д.О., аспірант; ДУДНІКОВ Л.А., канд. вет. наук
НВП “Біо-Тест-Лабораторія”

КОРНІЄНКО Л.Є., д-р вет. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

ВПЛИВ ЧАСУ ПІСЛЯ ЗАРАЖЕННЯ КРОЛІВ ВІРУСОМ ГЕМОРАГІЧНОЇ ХВОРОБИ НА ГЕМАГЛЮТИНАБЕЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ВІРУСОВІСНИХ МАТЕРІАЛІВ, ОТРИМАНИХ ВІД НИХ

Стаття присвячена питанню напрацювання вірусної сировини, призначеної для створення інактивованих вакцин проти геморагічної хвороби кролів, а саме отриманню вірусовмісного матеріалу із високою гемаглютинабельною активністю. Авторами зроблений висновок про те, що найбільшу активність має матеріал, відібраний від кролів, що загинули після 48-ї години. Отримані дані більш глибоко розкривають патогенез за вірусної геморагічної хвороби кролів.

Ключові слова: вірусна геморагічна хвороба кролів, вірусовмісний матеріал, вакцина, кролі, реакція гемаглютинації.

Постановка проблеми. В 1984 р. в Китаї було зареєстровано спалах хвороби кролів, яка спричинила значну смертність цих тварин. У зв'язку з тим, що у загинлих кролів у паренхіматозних органах спостерігали геморагічні зміни, цю хворобу було названо “вірусна геморагічна хвороба кролів”, вона була широко розповсюджена в Китаї, а потім в нашій країні й Європі [1, 2]. В нашій країні там, де не вакцинують кролів, реєструються випадки захворювання й загибелі кролів від вірусної геморагічної хвороби. Найбільш надійним захистом кролів від неї є профілактичні щеплення тварин. Для специфічної профілактики вірусної геморагічної хвороби в нашій країні розроблено декілька рідких інактивованих вакцин [3, 4].

Напрацювання вірусної сировини, яка буде використана для виготовлення інактивованих вакцинних препаратів проти геморагічної хвороби кролів, можливе за використання чутливих тварин (серонегативних до вірусу кролів). Всю вірусну сировину отримують з органів (печінки та селезінки) загинлих від вірусу кролів, у яких він міститься у максимальних концентраціях [5, 6]. Спроби вчених відносно культивування цього вірусу на різних лініях культур клітин і курячих ембріонів зазнали невдачі. Проте є повідомлення китайських вчених про культивування його на адаптованій культурі клітин нирки кроля. Незважаючи на це, використання чутливих до вірусу тварин з метою отримання вірусної сировини залишається актуальним [1, 7].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Отримання вірусовмісної сировини для біотехнологічного виробництва вакцин проти вірусної геморагічної хвороби кролів є актуальним і нині. Проте навіть отримання тканинної сировини від кролів, враховуючи значне накопичення вірусу в печінці заражених тварин, характеризується невисокою собівартістю вірусної сировини, виключенням використання поживних середовищ, сироватки крові та інших витратних матеріалів, які використовують за культивування клітинних ліній. Поряд із цим, ризик контамінації вірусної сировини сторонньою мікрофлорою набагато менший.

Мета і завдання досліджень – визначення гемаглютинабельної активності вірусовмісного матеріалу (печінки та селезінки), відбраного після загибелі кролів, заражених вірусом геморагічної хвороби, через 24, 48, 72, 96 та 120 годин, визначення впливу часу загибелі на гемаглютинабельну активність вірусовмісного матеріалу.

Матеріали і методи дослідження. Робота проводилась на базі ТОВ НВП “Біо-Тест-Лабораторія” у відділі тканинних та аутогенних вакцин і лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин Білоцерківського національного аграрного університету. У досліді використовувались серонегативні до вірусу геморагічної хвороби кролі – безпородні та породи білий велетень. Усі тварини старше 4-місячного віку масою тіла 2,5–3,5 кг, загальна кількість тварин у досліді – 140. Для зараження тварин використовували вірус геморагічної хвороби кролів зі штаму “БГ-04”. Кролів заражали внутрішньом'язово в дозі 500 ЛД₅₀ та об'ємі 1 см³. Після загибелі тварин проводили відбір вірусовмісного матеріалу (печінки) та досліджували в реакції гем-аглютинації за стандартною методикою. Всіх тварин, що загинули під час досліду, розділили на

5 груп, залежно від часу загибелі. Перша група: тварини, які загинули через 24 год, друга – 48, третя – 72, четверта – 96 та п'ята (контрольна) – 120 годин. Перед постановкою реакції з проб

печінки готували 10% суспензію на фосфатному буфері (ФСБ). Реакцію гемаглютинації ставили мікрометодом на 96 лункових пластикових мікропланшетках з використанням автоматичних піпеток зі змінними носиками. Для постановки РГА спочатку готували дворазові розведення вірусного матеріалу (1:2 – 1:16384) на ФСБ в об'ємі 50 мкл. До одержаних розведень вірусу додали по 50 мкл 1% суспензії еритроцитів (О) – групи людини. Планшет залишили за температури 4 °С на 45 хв. Після цього провели облік реакції. За титр гемаглютиніну або за одну гемаглютинабельну одиницю (ГАО) приймали найбільше розведення вірусу, що дає чітко виражену аглютинацію еритроцитів 4 або 3 хрести.

Результати досліджень та їх обговорення. Актуальним питанням за виробництва інактивованих вакцин проти геморагічної хвороби кролів є час збору вірусної сировини, а саме: впродовж якого часу він буде проводитись та в який період можна отримувати матеріал із максимальною активністю. Адже в цьому випадку буде мати значення не лише час максимального накопичення вірусу в органах-мішенях, а також оптимальний час накопичення в органі без зниження уже накопиченого збудника. Знання цих параметрів дає змогу мінімізувати економічні витрати на годів-лю та утримання дослідних тварин, зменшити витрати часу виробничого циклу та допомагає у плануванні роботи на виробництві.

Як видно з матеріалів, наведених у таблиці 1, у першій дослідній групі середня активність відібраного матеріалу склала $10,82 \pm 1,61 \log_2$, що на $2,49 \log_2$ (23 %) більше, ніж у контрольній групі ($p < 0,1$), другій – $11,08 \pm 1,26 \log_2$, – на $2,75 \log_2$ (24 %) ($p < 0,5$), третій – $10,40 \pm 1,59 \log_2$, на $2,07 \log_2$ (19 %) ($p < 0,1$), четвертій – $11,00 \pm 1,24 \log_2$, що на $2,07$ і $2,67 \log_2$ (24%) більше, ніж у контрольній групі ($p < 0,1$).

Таблиця 1 – Активність вірусомісної суспензії печінки кролів залежно від часу зараження

Титр ГАО	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192	1:16384	Середній титр \log_2	К-сть загиблих тварин (гол.)
Титр \log_2	8	9	10	11	12	13	14		
(1-ша група) 24 години після зараження	3	1	4	9	2	3	1	$10,82 \pm 1,61$	23
(2-га група) 48 годин після зараження	5	4	9	42	20	4	4	$11,08 \pm 1,26$	88
(3-тя група) 72 години після зараження	0	3	2	9	5	2	0	$10,40 \pm 1,59$	21
(4-та група) 96 годин після зараження	0	1	0	2	2	0	0	$11,00 \pm 1,24$	5
(5-та група) 120 годин після зараження	2	1	0	0	0	0	0	$8,33 \pm 0,57$	3

Примітка. * $P < 0,05$ та $0,01$ порівняно із контрольною групою.

Отже із результатів дослідження видно, що найбільшу гемаглютинабельну активність має вірусомісний матеріал, відібраний на другу добу у загиблих від вірусу геморагічної хвороби кролів. Активність вірусомісних суспензій, відібраних через 24, 72, 96 і 120 год, є дещо нижчою. Так, активність вірусомісної суспензії на 24, 72 і 96 годину загибелі нижча від 48-годинної загибелі за часом, але різниця не є достовірною. Різниця в активності суспензії за часу загибелі 120 годин є достовірною. Максимальне накопичення вірусу відбувається в селезінці і печінці. Для реалізації такої патогенетичної складової потрібний певний проміжок часу. І, як показують результати досліджень, найбільш високі титри вірусу (у нашому випадку гемаглютинабельна активність) спостерігаються через 48 год після зараження. Ймовірно, включення імунологічних механізмів на клітинному і гуморальному рівнях, а можливо й “виснаження” клітин-мішеней для вірусу з часом не призводить до збільшення кількості останнього.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Виходячи з отриманих даних, можна зробити висновок про те, що за напрацювання вірусної сировини, необхідної для виготовлення вакцинних препаратів проти геморагічної хвороби кролів, найбільш активний матеріал можна отримати на другу добу. Вірогідно у цей проміжок часу відбувається максимальна реплікація вірусу в гепатоцитах кролів, а дія чинників, які виступають антагоністами зазначеного процесу, зведені до мінімуму. Саме у цей період настає максимальне виснаження гепатоцитів. Адже накопичення вірусу в селезінці хоча і є значним, проте не може задовільнити біотехнологів необхідною кількістю вірусу. Збільшення проміжку часу не сприяє подальшому зростанню кількості вірусу, навіть навпаки, титри його (гемаглюти-

набельна активність) зменшуються. Зменшення кількості вірусу особливо чітко простежується у період після 120 години після зараження тварин, що вказує на ефективну противірусну дію імунологічних механізмів перебудови зараженого організму.

Перспективою подальших досліджень є створення вакцинного препарату проти вірусної геморагічної хвороби кролів, який буде характеризуватись високою імунологічною активністю, нешкідливістю і безпечністю для тварин. Такий препарат має відповідати світовим стандартам за вірусомісною сировиною і титр ГАО має становити 1:1024–1:2048. Крім того, такий препарат у вигляді відповідної складової повинен увійти до високоефективного асоційованого препарату проти геморагічної хвороби та міксоматозу кролів із використанням антигенів з високими імуногенними властивостями, що ґрунтується на відборі найбільш антигенно активного вірусомісного матеріалу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сытенко В. Вакцины Лапимун – для всех регионов Украины / В. Сытенко // Сучасна ветеринарна медицина. – 2013. – № 5. – С. 60–62.
2. Новицька О.В. Вивчення впливу вакцин проти вірусної геморагічної хвороби та міксоматозу кролів на фізіологічний та імунний стан вакцинованих тварин / О.В. Новицька, М.М. Гулянич // Сучасна ветеринарна медицина. – 2012. – № 6. – С. 26–29.
3. Du N.X. Rabbit hemorrhagic disease (RHD) a new disease and its viral etiology / N.X. Du // Dt. Tirartl, Wschr. – 1990. – Vol. 97. – № 3. – P. 114–116.
4. Rabbit haemorrhagic disease first outbreak in Israel and review of the literature / E. S. Kuttin, N. Nowotny, A. Nyska et al. // Isr. J. Vet. Med. – 1991. – Vol. 46. – P. 119–126.
5. Сюрин В.П. Ветеринарная вирусология / В.П. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. – М.: Агропромиздат, 1991. – 431 с.
6. Власов Н.А. Вирус геморрагической болезни кроликов / Н.А. Власов // Общая эпизоотология, иммунологические, экологические и методологические проблемы: материалы междунар. науч.-практич. конф. – Харьков, 1995. – С. 322–325.
7. Ji C.Y. A preliminary report on RHDV adaptation to DJRK cell line (in Chinese) / C.Y. Ji, N.X. Du & Y.K. Wang // [Res. Rep. Collec. RHD]. Nanjing Agric. Univ. Press, September. – 1990. – P. 160–167.

Влияние времени после заражения кроликов вирусом геморрагической болезни на гемагглютинирующую активность вирусосодержащих материалов, полученных от них

Д.А. Матлак, Л.А. Дудников, Л.Е. Корниенко

Статья посвящена вопросу промышленной наработки вирусного сырья, предназначенного для создания инактивированных вакцинных препаратов против геморрагической болезни кроликов, а именно получению вирусосодержащего материала с высокой гемагглютинирующей активностью. Авторами сделан вывод о том, что самой большой активностью обладает материал, отобранный у кроликов, погибших после 48-ми часов. Полученные данные помогут более глубоко понимать механизм патогенеза вирусной геморрагической болезни кроликов, снизить экономические затраты на содержание опытных животных, уменьшить затраты времени производственного цикла и помогут в планировании работ на производстве.

Ключевые слова: вирусная геморрагическая болезнь кролей, вирусосодержащий материал, вакцина, кроли, реакция гемагглютинации.

Надійшла 15.10.2013.