

УДК 619:616.9–098:636

Д. О. МАТЛАК, аспірант;

Л. А. ДУДНІКОВ, кандидат ветеринарних наук

НВП “Біо-Тест-Лабораторія”

Л. Є. КОРНІЄНКО, доктор ветеринарних наук;

Л. М. КОРНІЄНКО, кандидат ветеринарних наук

Білоцерківський національний аграрний університет

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ІНАКТИВАНТІВ НА ІМУНОГЕНІ ВЛАСТИВОСТІ АНТИГЕНУ ВИГОТОВЛЕНОГО ІЗ ВІРУСУ ГЕМОРАГІЧНОЇ ХВОРОБИ КРОЛІВ НА ПРИКЛАДІ ШТАМУ “БГ-04”

У статті розглядається питання вибору ефективного інактиванта для інактивації антигену, який би максимально зберігав антигенну структуру вірусного білку і забезпечував повну інактивацію вірусного антигену, не проявляв інактивуючої дії після завершення інактивації. Проведені дослідження по вивченню імунної відповіді на введення антигену виготовленого із вірусу геморагічної хвороби кролів який інактивувався формаліном та димером етиленіміну (ДЕІ).

Ключові слова: антиген, димер етиленіміну, інактивація, імуногенна ефективність, кролі, затримка агрегації, формалін.

Створення високоімуногенної інактивованої вакцини можливе за використання інактивантів, які забезпечують максимальне збереження антигенного білку. Після завершення процесу інактивації вони повинні швидко розпадатися, не чинити шкідливої дії на макроорганізм та забезпечувати повну інактивацію антигену.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. У виробництві вакцин найбільш поширеним методом інактивації антигену є хімічний, який ґрунтується на використанні різних хімічних сполук. Найпопулярнішим із інактивантів є формальдегід [1]. Останній інактивує віруси завдяки високій хімічній активності відносно білків та нуклеїнових кислот. Здатний вступати у хімічну реакцію не лише із віріонами, але й із іншими компонентами середовища у яке потрапляє. В процесі інактивації вірусів формальдегідом проходить складна хімічна реакція. Відбувається взаємодія із аміногрупами нуклеїнових кислот, аміногрупами пуринів та піраїдинів, що зумовлює руйнування структури та інформаційної активності нуклеїнових кислот. За оптимальних умов інактивації взаємодія формальдегіду із білками багатьох вірусів не чине значного впливу на їх антигенні властивості. Однак ряд вірусів втрачає значну частину антигенних властивостей за інактивації формальдегідом, особливо це стосується оболонкових вірусів [2].

Димер етиленіміну (ДЕІ) та його похідні проявляють сильно виражену інактивуючу дію на віруси, зберігаючи в цьому разі антигенні властивості [3–5]. Інактивувальна дія етиленіміну на віруси зумовлена вибірковою дією на нуклеїнові кислоти. Відбувається їх депуринізація із наступною полімеризацією. Перевага останнього, як інактиванта, перед формаліном полягає у вибіркової дії

на ядерний апарат, при тому він не діє на оболонку вірусу. За температури 25–27°C інактивація вірусу становить собою швидкий контрольований процес, а отримані в цьому разі неінфекційні агенти легко піддаються концентруванню та очищенню. Поряд із цим, значною перевагою азиридинів, як хімічних інактивантів є їхнє повне хімічне руйнування впродовж декількох діб.

Постановка завдання. Метою наших досліджень було визначення титру антитіл у реакції затримки гемаглютинації (РЗГА) в досліджуваних пробах сироваток крові кролів щеплених антигеном виготовленим із вірусу інактивованого ДЕІ.

Матеріали та методи дослідження. Робота проводилась на базі НВП “Біо-Тест-Лабораторія”, відділі тканинних та аутогенних вакцин, та 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. Всі тварин старше 4-місячного віку та із масою тіла 2,5–3,0 кг, загальна кількість тварин у досліді – 40 гол. Тварин було поділено на 2 групи: контрольну та дослідну, по 20 голів у кожній. Для щеплення використовували антиген виготовлений із вірусу ГХК штаму “БГ-04” інактивованій формаліном та димером етиленіміну (ДЕІ). Згаданий антиген мав однаковий титр гемаглютинабельної активності в РГА – 1:2048 (11 \log_2). Контрольна група була щеплювалась антигеном інактивованим формальдегідом. Обом групам тварин антигени вводили підшкірно в об’ємі – 1см³. Відбір крові для отримання сироваток й її дослідження проводили протягом 35 діб із 7-денними інтервалами (7-а, 14-, 21-, 28- та 35-а).

Визначення титру антитіл до вірусу геморагічної хвороби кролів проводили за допомогою РЗГА за стандартною методикою. Визначили робочий титр антигену – 4 ГАО постановкою реакції гемаглютинації на 96-й лунковій плексигласовій мікропланшетці. Проводили інактивацію досліджуваних проб сироваток крові кролів на водяній бані за 56°C протягом 30 хв. Готували послідовні 10-кратні розведення досліджуваних сироваток крові на 96 – лункових мікропланшетках від 1:10 до 1:2560 на фосфатно-сольовому буфері. В кожен лунку із розведеною сироваткою вносили робоче розведення вірусу – 4ГАО. Після цього мікропланшетки поміщали у термостат на 45 хв за температури 37°C для контакту. Потім в кожен лунку із розтитрованою сироваткою вносили 1% суспензію еритроцитів людини першої (О) групи. Планшетки поміщали у холодильник (+4°C) на 45 хв. По завершенні зазначеного часу проводили облік реакції.

Обґрунтування отриманих результатів. Використання ДЕІ, як інактиванта, дає змогу отримати антиген із більш вираженими імунними властивостями порівняно із формаліном.

На 7-у добу після щеплення середній титр антитіл у дослідній групі склав – $6,65 \pm 0,22 \log_2$, що на $0,3 \log_2$ (4,5%) більше ніж у контрольній за значення $P < 0,01$. На 14-у добу після щеплення середній титр антитіл у дослідній групі склав – $7,15 \pm 0,81 \log_2$, що на $0,45 \log_2$ (6,2%) більше ніж у контрольній групі, за значення $P < 0,01$. На 21-у добу після щеплення середній титр антитіл у дослідній групі склав – $7,95 \pm 0,48 \log_2$, що на $0,45 \log_2$ (5,6%) більше ніж у контрольній групі, за значення $P < 0,01$. На 28-у добу після щеплення середній титр антитіл у дослідній групі склав – $8,60 \pm 0,57 \log_2$, що на $0,55 \log_2$ (6,3%) більше ніж у контрольній групі, за значення

$P < 0,05$. На 35-у добу після щеплення середній титр антитіл у дослідній групі склав $- 9,6 \pm 0,73 \log_2$, що на $1,1 \log_2$ (11,4%) більше ніж у контрольній групі, за значення $P < 0,05$. Результати дослідів відображенні у таблиці № 1.

Таблиця 1

Титри антитіл в сироватках крові кролів щеплених експериментальними антигенами

Інактивант	Доба після щеплення	К-ть, гол	80	160	320	640	1280	2560	Середній титр \log_2 (M \pm m)	Значення (P)
			ГАО 6,3 \log_2	ГАО 7,3 \log_2	ГАО 8,3 \log_2	ГАО 9,3 \log_2	ГАО 10,3 \log_2	ГАО 11,3 \log_2		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Формальдегід	7	20	19	1	–	–	–	–	$6,35 \pm 0,22$	0,01
ДЕІ		20	13	7	–	–	–	–	$6,65 \pm 0,47$	
Формальдегід	14	20	12	8	–	–	–	–	$6,70 \pm 0,50$	0,01
ДЕІ		20	8	7	5	–	–	–	$7,15 \pm 0,81$	
Формальдегід	21	20	2	12	6	–	–	–	$7,50 \pm 0,61$	0,01
ДЕІ		20	–	8	12	–	–	–	$7,95 \pm 0,48$	
Формальдегід	28	20	–	5	15	–	–	–	$8,05 \pm 0,44$	0,05
ДЕІ		20	–	1	12	7	–	–	$8,6 \pm 0,57$	
Формальдегід	35	20	–	–	17	2	1	–	$8,5 \pm 0,52$	0,05
ДЕІ		20	–	–	3	8	9	–	$9,6 \pm 0,73$	

Таким чином, титри сироваток від кролів щеплених антигенами інактивованими ДЕІ були достовірно більш активними, ніж такі інактивовані формальдегідом. Різниця не була критичною. Можливо із-за консервативності геному каліцивірусів вплив формальдегіду й не є значним, проте саме ДЕІ показав себе як більш перспективний у виробництві вакцинних препаратів проти ВГХК.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Виходячи із отриманих даних можна зробити висновок про те що використання азиридину – ДЕІ, як інактиванта, дає змогу посилити антигенну відповідь на введений антиген. Різниця відносно імуногенної ефективності складає близько одного логарифму. Крім того, переваги димеру етиленіміну характеризуються повною інактивацією антигену впродовж 48 год та швидким його розпадом. Антиген інактивований ДЕІ зберігає високу гемаглютинабельну активність впродовж року (термін спостереження).

Перспективою подальших досліджень є створення вискоєфективного асоційованого препарату проти вірусної геморагічної хвороби та міксоматозу кролів із використанням антигену з високими антигенними й імуногенними властивостями. Це у свою чергу дасть можливість використати вірусну суспензію (рідкий компонент вакцини) як розчинник для ліофілізату, який містить атенуйований вірус міксоматозу кролів.

1. McLean I. W. Experiences in the production of poliovirus vaccines // I. W. McLean., A. R. Taylor // Prog Med Virol. – 1958. – Vol. 1. – P. 122–164.

2. Хвороба Ауескі / Л. Є. Корнієнко, Л. М. Корнієнко, В. С. Білокінь та ін.; За ред Л. Є. Корнієнка. – Біла Церква, 2002. – 220 с.

3. Batnemann H. G. Vaccine / H. G. Batnemann // – 1990. – Vol. 8. – № 4. – P. – 299–303.
4. Phillips C. R. I Review / C.R. Phillips, Kaye S. // Amer. Journ. Hyd. – 1949 – Vol. 50. – P. – 270–279.
5. Saul K. Epidemiology / K. Saul // Amer. Journ. Hyd. – 1949 – Vol. 50. – P. – 285–295.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНАКТИВАНТИВ НА ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА АНТИГЕНУ ИЗГОТОВЛЕННОГО ИЗ ВИРУСА ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ КРОЛЕЙ НА ПРИМЕРЕ ШТАММА “БГ-04”/ Д. О. Матлак, Л. А. Дудников, Л. Е. Корниенко, Л. М. Корниенко.

В статье рассматривается вопрос выбора эффективного инактиванта для инактивации антигена, который бы максимально хранил антигенную структуру вирусного белка и обеспечивал полную инактивацию вирусного антигена, не проявлял инактивирующее действие после завершения инактивации. Проведены опыты по изучению иммунного ответа на введение антигена изготовленного из вируса. Проведены опыты по изучению иммунного ответа на введение антигена, изготовленного из вируса геморрагической болезни кролей, который инактивировался формалином и димером этиленimina (ДЕИ).

Ключевые слова: антиген, димер этиленimina, инактивация, иммуногенная эффективность, кроли, задержка гемагглютинации, формалин.

...
STUDIES ON THE EFFECT ON THE IMMUNOGENIC PROPERTIES OF INAKTIVANTOV ANTIGEN PREPARED FROM RABBIT HEMORRHAGIC DISEASE VIRUS AS AN EXAMPLE OF THE STRAIN “BG-04”/D. Matlak, L. Dudnikov, L. Kornienko, L. Kornienko

The paper discusses the choice of effective inactivate to inactivate the antigen, which would be retained as the antigenic structure of viral proteins and provide a complete inactivation of viral antigen, showed no inactivating action after inactivation. Conducted a study on the immune response to the introduction of an antigen prepared from rabbit hemorrhagic disease virus, which is inactivated by formalin and ethyleneimine dimer.

Webs keys: antigen, ethyleneimine dimer, inactivation, efficiency of a immunogenic, rabbits, delay off hemagglutination, formalin.

Рецензент – кандидат ветеринарных наук М. П. Ситюк.