

ВЕТЕРИНАРНАЯ МЕДИЦИНА

УДК: 619:615.371: [579.843.95+578.834.1]

ОТРАБОТКА РЕЖИМОВ ИНАКТИВАЦИИ КУЛЬТУР PASTEURELLA MULTOCIDA И ШТАММОВ КОРОНАВИРУСА НОРОК ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ ВАКЦИНЫ

Д. С. БОРИСОВЕЦ (ORCID ID 0000-0003-4087-9833), Ю. А. КАЯК (ORCID ID 0009-0007-3622-0880),
Г. Е. ТОЛЯРОНОК

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелецкого»,
г. Минск, Республика Беларусь, 220063

П. А. СЕМИЖОН (ORCID ID 0000-0001-7986-8299)

Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии
Государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»,
г. Минск, Республика Беларусь, 220012

(Поступила в редакцию 03.01.2025)

В статье авторами предоставлена информация по результатам изучения режимов инактивации антигена *Pasteurella multocida* и антигена штамма коронавируса *Sars-CoV-2*, выделенного от норок, при конструировании бивалентной вакцины. Пастереллез, инфекционное заболевание респираторного тракта, наносит значительный экономический ущерб белорусским звероводческим хозяйствам, особенно норковым. Мы исследовали некоторые патологические образцы от норок и обнаружили *Pasteurella multocida* у 20,8 % животных. Это говорит о том, что *Pasteurella* присутствует всегда и играет важную роль в развитии этого вида респираторных заболеваний. Однако ситуация осложняется пандемией COVID-19, вызванной вирусом SARS-CoV-2. Помимо глобального кризиса общественного здравоохранения среди людей, этот вирус также вызвал вспышку легочного энтерита у норок. Заболевание, вызванное SARS-CoV-2, характеризуется клинической и морфологической картиной, очень похожей на пастереллез, что затрудняет быструю и точную диагностику. У этого сходства есть ряд общих черт: это проявляется в таких проявлениях, как одышка, кашель или лихорадка, а также в анатомических изменениях в легких и кишечнике. В ходе нашего исследования, генетический анализ показал наличие генома SARS-CoV-2 в 58,9 % образцов. Это свидетельствует о широком распространении вирусной инфекции среди норок и подчеркивает необходимость комплексного подхода к диагностике и лечению респираторных заболеваний у этих животных. Следует отметить, что дифференциальная диагностика пастереллеза и инфекции, вызванной SARS-CoV-2, является сложной задачей, требующей использования современных лабораторных методов диагностики, включая ПЦР-анализ для выявления геномов обоих патогенов, а также бактериологическое исследование для выделения и идентификации *Pasteurella multocida*.

Ключевые слова: инактиванты, концентрация, режимы инактивации, культура пастерелл, штамм коронавируса, антиген.

In this article, the authors provide information on the results of a study of the inactivation modes of the *Pasteurella multocida* antigen and the antigen of the *Sars-CoV-2* coronavirus strain isolated from minks when constructing a bivalent vaccine. Pasteurellosis, an infectious disease of the respiratory tract, causes significant economic losses to Belarusian fur farms, especially mink farms. We examined some pathological samples from minks and found *Pasteurella multocida* in 20.8 % of animals. This suggests that *Pasteurella* is always present and plays an important role in the development of this type of respiratory disease. However, the situation is complicated by the COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus. In addition to the global public health crisis among humans, this virus has also caused an outbreak of pulmonary enteritis in minks. The disease caused by SARS-CoV-2 is characterized by a clinical and morphological picture very similar to pasteurellosis, which complicates rapid and accurate diagnosis. This similarity has a number of common features: it is manifested in such manifestations as dyspnea, cough or fever, as well as in anatomical changes in the lungs and intestines. During our study, genetic analysis showed the presence of the SARS-CoV-2 genome in 58.9 % of samples. This indicates a wide spread of viral infection among minks and emphasizes the need for an integrated approach to the diagnosis and treatment of respiratory diseases in these animals. It should be noted that differential diagnosis of pasteurellosis and infection caused by SARS-CoV-2 is a complex task requiring the use of modern laboratory diagnostic methods, including PCR analysis to detect the genomes of both pathogens, as well as bacteriological examination to isolate and identify *Pasteurella multocida*.

Key words: inactivators, concentration, inactivation modes, pasteurella culture, coronavirus strain, antigen.

Введение

Пастереллез представляет собой одно из респираторных заболеваний, наносящее белорусскому звероводству существенный экономический ущерб. Как отмечают А. С. Андрусевич, А. П. Курдеко и Б. Я. Бирман (2011), доля выделения пастерелл при пневмониях у норок достигает 42,1 % [1].

Согласно нашим исследованиям, проведенным в период с 2022 по 2023 год, *Pasteurella multocida* обнаруживалась у 20,8 % норок в звероводческих хозяйствах, что свидетельствует о значительной роли пастерелл в респираторной патологии данного вида.

Пандемия SARS-CoV-2 привела не только к глобальному кризису здравоохранения, но и стала одним из факторов развития пневмоэнтеритов у норок [2]. Клинико-морфологические проявления этих двух заболеваний схожи.

В ходе нашего исследования был проанализирован патологический материал (168 проб) от норок, полученный из пяти звероводческих хозяйств. В 58,9 % случаев в образцах был обнаружен геном коронавируса (SARS-CoV-2), что подтверждает высокую распространенность этой инфекции.

Пандемия SARS-CoV-2 стала причиной не только глобального кризиса здравоохранения, но и одной из причин пневмоэнтеритов у норок [2]. По клинико-морфологическому проявлению эти два заболевания сходны.

В связи с отсутствием эффективных противовирусных препаратов против заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2, разработка вакцины для профилактики этой болезни является наиболее перспективным решением в контексте пандемии [3, 4, 5].

В промышленном звероводстве преобладает использование инактивированных вакцин, которые обладают рядом преимуществ по сравнению с живыми вакцинами. К ним относятся: повышенная безопасность и отсутствие риска развития заболевания, возможность стандартизации дозировки специфического антигена, стабильность биологических свойств, способность вызывать стойкий и длительный иммунный ответ, а также возможность применения в поливалентных или ассоциированных формах [6, 7, 8].

При создании и производстве инактивированных вакцин критически важен выбор подходящих инактивантов, их оптимальной концентрации и режима inactivation патогенов.

Это необходимо для сохранения иммуногенных свойств антигенов. Качество антигена в биопродукте является определяющим фактором при разработке эффективных вакцин.

В современных технологиях производства вакцин широко используются следующие инактиванты: формалин, фенол, этанол, этиленимин и его производные [8].

Механизм действия инактивирующих агентов основан на их взаимодействии с нуклеиновыми кислотами вирусных частиц. В результате такого взаимодействия блокируется репликация вируса, а также происходит модификация белков, участвующих во взаимодействии с клеточными рецепторами.

При этом крайне важно, чтобы инактивация вируса была не только эффективной, но и максимально селективной, то есть минимизирующей сопутствующие изменения в структуре вирусных частиц и их компонентов.

В связи с этим выбор оптимальной дозы инактивирующего агента является критическим фактором. Наиболее распространёнными инактивирующими агентами для вирусов являются формальдегид, бета-пропиолактон и этиленимин.

Некоторые учёные считают, что экзотоксины играют важную роль в развитии патологических процессов, вызываемых бактериями семейства Pasteurellaceae. Эти токсины оказывают губительное воздействие на альвеолярные макрофаги, нейтрофилы и лимфоциты, а также приводят к коагуляционному некрозу тканей. В связи с этим наиболее перспективными видами вакцин являются бактериноксоидные и субъединичные вакцины [10].

Формалин обладает уникальным свойством превращать экзотоксины грамотрицательных бактерий в анатоксины, что способствует повышению защитных и антитоксических свойств вакцин, следовательно, и их иммуногенности [11].

Под воздействием формалина и температуры экзотоксины теряют свою токсичность, но сохраняют способность вызывать иммунный ответ. Такие модифицированные токсины, называемые анатоксинами, используются для профилактики столбняка, газовой гангрены, ботулизма и дифтерии. Анатоксины также применяются в качестве антигенов для иммунизации животных с целью получения анатоксических сывороток.

Важно отметить, что формалин распадается на углекислый газ и воду, не требуя нейтрализации побочных продуктов взаимодействия с бактериями и питательной средой.

В настоящее время для инактивации вирусных частиц при производстве вакцин преимущественно используется бета-пропиолактон. Преимущество этого реагента заключается в том, что он полностью гидролизуется при 37 °C в течение нескольких часов, образуя нетоксичные продукты.

При создании цельновирионных вакцин, не способных к репликации, применяются как химические, так и физические методы инактивации вирусных частиц. Среди химических соединений наибо-

лее распространены два основных типа инактиваторов: ретикулирующие (разрыхляющие) агенты и алкилирующие агенты.

К ретикулирующим агентам относятся альдегиды, в частности формальдегид, глутаральдегид и глицидальдегид, из которых чаще всего используется формальдегид. Алкилирующие агенты представлены бета-пропиолактоном, этиленимином и другими азиридинами.

Цель настоящего исследования было определение эффективной концентрации препаратов и режимов инактивации штаммов *Pasteurella multocida*, а также изолята вируса SARS-CoV-2, выделенных от норок.

Основная часть

Исследования проводились в лабораториях отдела вирусных инфекций опытно-экспериментального участка Республиканского унитарного предприятия «Институт экспериментальной ветеринарии имени С. Н. Вышелесского», а также в научно-исследовательском институте гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» и на звероводческих предприятиях Республики Беларусь.

В ходе разработки оптимальных режимов инактивации биомассы *Pasteurella multocida* было принято решение использовать формалин в качестве инактивирующего агента. Этот выбор обусловлен способностью формалина превращать экзотоксины грамотрицательных бактерий в анатоксины, что, в свою очередь, повышает защитные свойства вакцин за счет увеличения их иммуногенности.

Для проведения исследования были выделены и культивированы две культуры *Pasteurella multocida* сероваров А и В, изолированные от норок. Выделенные штаммы демонстрировали стабильность по культурально-морфологическим признакам и были отобраны с учётом патогенных и антигенных свойств.

В дальнейшем эти серовары использовались в качестве антигенного компонента для разработки вакцины.

На начальном этапе исследования была проведена работа по определению оптимальной концентрации формалина, обеспечивающей полную инактивацию бактерий *Pasteurella multocida*. Для этого использовали смесь бульонных культур сероваров А и В в объеме 10 мл на флакон.

Концентрация микробных клеток в образцах составляла 1 и 2 миллиарда на миллилитр и была стандартизирована по мутности. Растворы смешивали в равных пропорциях (1:1) и добавляли формалин в различных конечных концентрациях: 0,05 %; 0,1 %; 0,2 %; 0,3 %; 0,4 %; 0,5 %. Каждый вариант эксперимента проводился в трехкратной повторности.

В ходе исследования образцы культур, содержащих формалин, инкубировались при температуре 37 °С. Отбор проб для оценки эффективности инактивации проводился в следующие временные интервалы: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36 и 48 часов.

Пробы объёмом 0,05 мл высевались на чашки Петри с питательной средой на основе сывороточного агара МПА и инкубировались в термостате при 37 °С в течение 48 часов. После инкубации оценивалось наличие или отсутствие роста бактерий в течение двух суток. Последний отбор проб и посев проводился через 48 часов.

Контрольные пробы представляли собой посеvy *Pasteurella multocida* А и В на агаре без добавления инактиватора.

Учет количества выросших колоний бактерий осуществлялся в различные интервалы времени, с окончательным подсчетом через 120 часов после последнего посева.

При отсутствии роста колоний на чашках Петри результат считался удовлетворительным для инактивации данного патогена при разработке биопрепарата.

В ходе работы с коронавирусом перед этапом концентрирования и очистки вирусного материала от сопутствующих компонентов (клеточных белков и нуклеиновых кислот) проводилась обязательная инактивация вирусной составляющей. Для этой цели использовался β -пропиолактон.

В ходе исследования были использованы различные концентрации инактивирующего агента: 0,5 %, 0,1 %, 0,05 % и 0,01 %. Результаты показали, что для полной инактивации коронавируса наиболее эффективно использовать бета-пропиолактон в концентрации 0,05 % с инкубацией в течение 16–20 часов при температуре +4 °С. При этом, двухчасовая обработка бета-пропиолактоном не выявила токсических эффектов, что было подтверждено тремя последовательными пассажами на клетках Vero E6.

Концентрирование вирусной культуры осуществлялось методом ультрацентрифугирования. Процедура проводилась при +4 °С в течение двух часов со скоростью 24 тыс. оборотов в минуту, исполь-

зуя 15 % раствор сахарозы. Полученный вирусный препарат был растворен в физиологическом растворе с рН 7.4 и использован для анализа основных вирусных антигенов.

В результате проведенных исследований был подготовлен пул инактивированного вирусного материала (изолят №1/3947, средний титр вируса – 6,05 lg ТЦД50/мл) объемом 1 литр. Была также проведена концентрирование вирусодержащей культуральной жидкости, что позволило увеличить концентрацию вируса в 30 раз.

Для оптимизации условий инаktivации пастереллезной культуры использовались различные концентрации формалина. Процедура инаktivации культур осуществлялась в течение 48 часов при температуре +37 °С с периодическим перемешиванием. Результаты исследований по инаktivации штамма *Pasteurella multocida* (смесь сероваров А и В) представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. Выживаемость смеси культур *Pasteurella multocida* с концентрацией 1 млрд. м.к. в 1 см³ под действием формалина

Экспозиция	Концентрация формалина (%) и рост колоний на питательной среде						Контроль
	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	
4	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	-	-	+
16	+	+	+	-	-	-	+
20	+	+	+	-	-	-	+
24	+	+	+	-	-	-	+
36	+	+	+	-	-	-	+
48	+	+	+	-	-	-	+

Таблица 2. Выживаемость смеси культур *Pasteurella multocida* с концентрацией 2 млрд. м.к. в 1 см³ под действием формалина

Экспозиция	Концентрация формалина (%) и рост колоний на питательной среде						Контроль
	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	
4	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	-	-	+
16	+	+	+	-	-	-	+
20	+	+	+	-	-	-	+
24	+	+	+	-	-	-	+
36	+	+	+	-	-	-	+
48	+	+	+	-	-	-	+

После инаktivации бактерий проводили очистку и концентрирование штаммов *Pasteurella multocida* с помощью центрифуги.

На основании наших исследований установлено, что концентрации формалина от 0,3 до 0,5 % вызывают полное обеспложивание пастерелл в течение 16–48 часов (срок исследования) при температуре +37 °С. В посевах на питательных средах роста бактериальных колоний не наблюдалось.

Исследование влияния формалина и бета-пропионлактона на жизнедеятельность бактерий и вируса.

При исследовании воздействия формалина в концентрациях от 0,05 % до 0,2 % на *Pasteurella multocida*, не было отмечено гибели бактерий. На питательных средах наблюдался рост колоний, морфологически идентичных исходной культуре. Аналогичный рост был зафиксирован и в контрольных пробах.

В дальнейшем был проведен анализ условий инаktivации вируса с оценкой ее эффективности. Для этого использовались различные концентрации бета-пропионлактона (0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %).

Оптимальной для полной инаktivации вируса оказалась концентрация 0,05 % бета-пропионлактона при инкубации в течение 16–20 часов при температуре +4 °С. В этом случае не наблюдалось цитопатического эффекта (ЦПД) в течение трех последовательных пассажей при заражении клеток препаратом вируса. При этом, после инаktivации бета-пропионлактоном в течение 2 часов, токсического эффекта на культуру клеток Vero E6 не было отмечено.

Результаты исследования инаktivации коронавируса представлены в табл. 3.

Таблица 3. Жизнеспособность изолята 1/3947 вируса SARS-CoV-2 после обработки различными концентрациями бета-пропионлактона

Экспозиция/Инаktivация, ч	Концентрация BPL (%) и жизнеспособность вируса на культуре клеток Vero E6 (наличие эффекта ЦПД)			
	0,5	0,1	0,05	0,01
16/2	–	–	–	+
20/2	–	–	–	+

Заключение

1. Определена оптимальная концентрация инактиванта вирусного антигена SARS-CoV-2 – в концентрации 0,05 % бета-пропиолактона.

2. Определена оптимальная концентрация инактиванта *Pasteurella multocida*, – в концентрации 0,4 % формалина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андруевич, А. С. Пастереллез пушных зверей: монография / А. С. Андруевич, А. П. Курдеко, Б. Я. Бирман. – Горки: БГСХА, 2011. – 87 с.

2. Wang, C. Immediate Psychological Responses and Associated Factors during the Initial Stage of the 2019 Coronavirus Disease (COVID-19) Epidemic among the General Population in China / P. Riyu, C. Roger // – Int J Environ Res Public Health. –2020. doi: 10.3390/ijerph17051729.

3. Huang, C. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China / Y. Wang, B. Cao // – Lancet. – 2020. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

4. Rothe, C. Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany / M. Schunk, P. Sothmann // N Engl J Med. – 2020. doi: 10.1056/NEJMc2001468.

5. Cao, B. A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19 / Y. Wang, D. Wen // N Engl J Med. – 2020. doi: 10.1056/NEJMoA2001282.

6. Научные основы звероводства 1 под. ред. В. А. Берестова. – Л.: (Наука», 1985. – С. 336–338. Wenzel V. D. Pelztiergezundheitsdienst. – Jena: VEB Gustav Fischer Verlag, 1982. – 254 s.

7. Разработка средств специфической профилактики инфекционных болезней животных / В. В. Максимович [и др.] // Научные труды / Институт экспериментальной ветеринарии им. С. И. Вышелесского НАН Беларуси. – Минск, 2005. – Вып. 38: Ветеринарная наука – производству. – С. 359–361.

8. Справочник по применению вакцин, зарегистрированных в Республике Беларусь, против инфекционных болезней крупного рогатого скота, свиней, мелкого рогатого скота, лошадей, плотоядных и животных разных видов / сост. В. В. Максимович [и др.]. – Минск: Техноперспектива, 2006. – 166 с.

9. Медведев, А. П. Основы получения противобактериальных вакцин и сывороток / А. П. Медведев, А. А. Вербицкий. – Витебск: ВГАВМ, 2010. – 200 с.

10. Лебедев, Н. В. Получение анатоксинов *Astinobacillus pleuropneumoniae* и изучение их свойств: автореферат дис. кандидата ветеринарных наук / Н. В. Лебедев. – Владимир, 2013. – 24 с.

11. Воробьев, А. А. Анатоксины / А. А. Воробьев, Н. Н. Васильев, А. Т. Кравченко. – Москва: Медицина, 1965. – 488 с.