

М. В. ЯКУБОУСКІ, Т. Я. МЯЦОВА, С. І. ВЯРЭНІЧ,
С. І. ЛАВОР, У. В. МІЛЮТКІН, А. П. ЛЫСЕНКА,
А. Ф. ДЗЕРАЗА

АТРЫМАННЕ АНТЫГЕНУ З ЛІЧЫНАК СТРАНГІЛОІДАУ. I

Странгілаідоз у Беларусі моцна пашыраны. Хварэюць у асноўным цяляты, ягняты і казляняты. Странгілаідоз з'яўляецца адным з галоўных фактараў у развіцці хваробаў органаў дыхання і стрававання, на якія перахворвае амаль увесь маладняк, і гібель ад гэтай інвазіі дасягае 20—30%. Шматлікія высокаэфектыўныя антгельмінтыкі, што выкарыстоўваюцца пры странгілаідозе, не ўздзейнічаюць на прэімагінальныя стадыі паразітаў.

Даных пра біялагічныя сродкі барацьбы са странгілаідозам у айчыннай літаратуры няма. З замежных крыніцаў вядома, што існуюць пэўныя спосабы атрымання вакцын з паразітычных арганізмаў. Аўстра-ліійскім даследчыкам удалося забяспечыць імунітэт у ягнят і цялят пры вакцынацыі супраць фінозу, паспяхова выкарыстоўваецца вакцына супраць дыктыякаулэзу, эфектыўнай аказалася вакцынацыя куранят супраць аскарардыёзу і сінгамозу [2]. Шмат якія вакцыны рыхтуюць шляхам апраменьвання ўзбуджальнікаў. Так, прыгатавана вакцына з эафагастомаў і зроблена спроба вакцынацыі ёю ягнят [6], вакцынавалі авечак апрамененымі лічынкамі астэртагіяў [7], гемонхаў [8] і бунастомаў [9]. Арыгінальнай з'яўляецца метадка атрымання замарожанай вакцыны для барацьбы з бабезіёзам і анаплазмозам буйной рагатай жывёлы [1].

У паразіталогіі, як і ў іншых галінах ветэрынарнай медыцыны, вядуцца інтэнсіўныя пошукі магчымасцяў стварэння малекулярных вакцынаў, у тым ліку генна-інжынерных, пептыдных і антыдыяцэптычных. Прычым калі жывыя вакцыны ствараюць, як правіла, працягла, напружаны клеткавы і гумаральны імунітэт, то ачышчаныя антыгены, якія ёсць у пептыдных вакцынах, наадварот, індуюць сінтэз антыцелаў, і клеткавы імунітэт у прышчэпленых імі жывёл выражаны недастаткова. Гэты недахоп пептыдных вакцынаў ліквідуецца шляхам уключэння ў іх В- і Т-лімфацытарных эпітопаў [3, 5]. Што ж датычыць странгілаідозу, то пакуль што зроблена толькі спроба індукцыі ахоўнага імунітэту да гэтых паразітаў шляхам падскурнага ўвядзення інвазаваных лічынак [4].

Матэрыял і метады даследаванняў. Работа праводзілася ў віварыі і аддзеле паразіталогіі БелНДІ эксперыментальнай ветэрынарыі. Інвазійную культуру лічынак странгілоідаў атрымлівалі ад трусой-донараў. У гаспадарках у спантанна заражаных странгілоідамі ягнят бралі фекаліі з драўняным прагартаваным пілаваннем у суадносінах 1 : 2, культывавалі ў тэрмастаце пры 27°C на працягу двух дзён. Лічынкі выдзялялі метадам Бермана, адмывалі метадам седыментацыі водаправоднай вадой ад свабодных генерацый. У далейшым трусой-донараў у колькасці 10 галоў заражалі камбінаваным спосабам у дозе 20 тыс. лічынак на 1 галаву: 2/3 дозы наносілі перкутанна на ўнутраную паверхню бядра і 1/3 — на сліззістую рота пад языком. Праз 9—12 дзён фекаліі трусой даследавалі флатацыйным метадам на наяўнасць яек странгілоідаў. Інвазійныя лічынкі з яек атрымлівалі па пададзенай вышэй метадшчы. Лічынкі адмывалі стэрыльным ізатанічным растворам хларыду натрыю і захоўвалі ў гэтым жа раствору пры —18°C. Падлічвалі лічынкі гэтых нематодаў пры дапамозе метаду шматразовых разбаўленняў.

Антыген са странгілоідаў гатавалі шляхам механічнай і ультрагукавой дэзінтэграцыі нематодаў. Лічынкі дэзінтэгралі на шарыкавым

млынчыку з фарфоровымі шарыкамі на працягу 24 гадз і на УЗДН-1 пры 100 Вт/см² на працягу 15 мін (трыма пяцімінутнымі курсамі). Нездэінтэграныя странгілоіды і буйныя часцінкі аддзялялі цэнтрыфугаваннем пры 500 г. Надасадкавую вадкасць кансервавалі мертыялатам натрыю 1 : 500. Агульны бялок у антыгенах вызначалі па Лоуры і біурэ-тавай рэакцыяй. Антыгенны склад вывучалі ў рэакцыі імунадыфузіі (РІД) і перакрыжаваным імунаэлектрафарэзе (ПІЭФ) па Axelson (1974).

Для вывучэння пратэктывных уласцівасцяў антыгенаў трусаў імуні-завалі механічным дэзінтэгратам у дозах па бялку 6,8 мг, 10,95 і 13,69 мг на 1 галаву, ультрагукавым — у дозах 5,2 мг, 8,0 і 10,4 мг на 1 галаву, што адпавядае 500 тыс., 800 тыс. і 1 млн лічынак. На кожную дозу антыгену выкарыстаны па 3 доследныя трусы, 6 былі кантроль-нымі.

Для імунізацыі трусаў антыгены дыспергавалі ультрагукам у няпоў-ным ад'юванце Фрэйнда 1 : 3 і ўводзілі падскурна двухразова з інтэр-валам 7 дзён. Заражалі трусаў усіх доследных і кантрольных груп інва-зійнымі лічынкамі странгілоідаў праз 14 дзён пасля імунізацыі ў дозе 12 тыс. на 1 галаву. Сываратку крыві даследавалі ў РІД і ІФА (імуна-ферментны аналіз) да і пасля імунізацыі, у якасці антыгенаў выка-рыстоўвалі механічныя і ультрагукавыя дэзінтэграты. Пры пастаноўцы ІФА антыгены ў карбанат-бікарбанатным буферы фіксавалі на імуна-лагічных панелях «Dunatex». Сывараткі вывучалі ў разбаўленні 1 : 200 і 1 : 1000. Кантролем былі сывараткі крыві трусаў, гіперімунізаваных разбуранымі лічынкамі странгілоідаў. Пасля кожнага этапу панелі адмывалі 0,5 М NaCl з 0,2% твіну-20. Утвораныя комплексы антыген—антыцела выяўлялі кан'югатам анты IgG труса з пераксідазай хрэну (1 : 5000) і субстратнай сумессю на аснове *o*-фенілу. Рэакцыю ўлічвалі на спектрафатометры Microelisa R 250 пры 492 нм. РІД ставілі па агульнапрынятай метадыцы.

Жывёл усіх груп забілі на 20-ы дзень пасля заражэння і зрабілі ўлік прыжывальнасці странгілоідаў. Колькасць гельмінтаў падлічвалі метадам няпоўнага гельмінталагічнага ўскрыцця. Даследавалі антыген са странгілоідаў на антыгеннасць, пірагеннасць і бяшходнасць.

Для даследаванняў выкарыстоўваліся дзве серыі антыгенаў, атры-маных са странгілоідаў. Першая серыя ўяўляла сабой антыген, выдзе-лены са странгілоідаў ультрагукавым метадам з колькасцю бялку 13 мг/мл, другая — атрымана са странгілоідаў механічным шляхам з колькасцю бялку 27 мг/мл.

Бяшходнасць антыгенаў правяралі падскурным увядзеннем іх 6 марскім свінкам масай 300—400 г (па 3 свінкі на кожны антыген) у пераразліку на бялок па 27 мг. Назіранне за жывёламі праводзілі на працягу 30 сут. Антыген лічылі бяшходным, калі марскія свінкі за-сталіся жывыя, не страчвалі ў масе і ў іх адсутнічалі прыкметы інтак-сікацыі.

Таксічнасць антыгенаў правяралі на белых мышах, па 20 на кож-ную серыю. Непасрэдна перад увядзеннем антыгену вызначалі агуль-ную масу паддоследных мышэй, затым усім звяркам першай групы ўнутрычарэўна ўводзілі па 0,4 мл антыгену (5,2 мг бялку), атрыманага ультрагукавым метадам; жывёлам другой групы — па 0,2 мл антыгену (5,4 мг бялку), атрыманага механічным спосабам. Клінічнае назіран-не за мышамі вялі 7 дзён, а потым вызначалі іх агульную масу. Калі яна была не ніжэй за масу да ўвядзення антыгену, апошні лічылі бяш-ходным.

Пірагенныя ўласцівасці антыгенаў правяралі на трусах (па 5 на кожную серыю). Перад пачаткам доследу ў жывёл вымяралі тэмпера-туру цела, затым падскурна ўводзілі па 2 мл антыгену, прыгатаванага са странгілоідаў ультрагукавым метадам (27 мг бялку), і па 1 мл анты-гену, прыгатаванага механічным спосабам (27 мг бялку). Праз 6—

24—36 гадз мералі тэмпературу цела. Антыген лічылі апірагенным, калі тэмпература не ўзнімалася вышэй чым на 0,5 °С у параўнанні з зыходнымі данымі.

Антыгенныя ўласцівасці вывучалі ў рэакцыях імунадыфузіі, імуна-электрафарэзу, сустрэчнага электрафарэзу (СІЭФ), а таксама ў сералагічных — РА. Дзеля гэтага кожнай серыяй антыгенаў двойчы імунізавалі 4 трусы ў дозе 27 мг па бялку падскурна з інтэрвалам 7—10 дзён. Праз 20 дзён пасля другой імунізацыі ў трусое бралі кроў і сываратку, даследавалі іх у пералічаных вышэй рэакцыях. Па выніках сералагічных і імуналагічных рэакцый меркавалі пра антыгенныя ўласцівасці прыгатаваных прэпаратаў.

Вынікі даследаванняў. Пасля заражэння трусоеў лічынкамі странгілоідаў першыя яйкі з фекаліямі пачалі выдзяляцца на 10—12-ы дзень і працягвалася гэта 15—20 дзён. Да выкарыстання лічынкі захоўвалі пры —18 °С у 0,9%-ным растворе хлорыстага натрыю.

Пры даследаванні антыгенаў у РІД і ПІЭФ выяўлена 6—7 сералагічна актыўных кампанентаў, якія былі імуналагічна аднолькавыя ў прэпаратах, атрыманых як механічным разбурэннем, так і з дапамогай ультрагуку. Аднак, мяркуючы па інтэнсіўнасці прэцыпітатаў у РІД і ПІЭФ, больш актыўнымі былі механічныя дэзінтэграты.

У РІД і ІФА вывучылі ўплыў віду антыгену і яго дозы на ўтварэнне антыцелаў. Вынікі даследавання пададзены ў табл. 1 і 2. З дапамогай РІД вызначана, што сінтэз антыцелаў з прэцыпітацыяй лепш стымуляваў механічны дэзінтэрат (табл. 1).

У табл. 2 паказаны вынікі супастаўлення актыўнасці сываратак крыві ў ІФА да і пасля імунізацыі трусоеў антыгенамі ў розных дозах. Як відаць з табліцы, большы прырост антыцелаў забяспечваў механічны дэзінтэрат, прычым больш інтэнсіўнаму назапашванню садзейнічала павелічэнне дозы антыгену. У кантрольных жывёл не адзначана прыросту ўзроўню антыцелаў.

У выніку няпоўнага гелмінталагічнага ўскрыцця тонкага кішэчніка выяўлена, што прыжывальнасць странгілоідаў у трусоеў, імунізаваных механічным дэзінтэгратам у дозе 10,95 мг на 1 галаву, склала ў сярэднім 123 экз., у дозе 13,69 мг — 80, а ў кантролі — 349 экз. на 1 га-

Табліца 1. Даследаванні сывараткі крыві імунізаваных трусоеў у РІД

Нумар труса	Колькасць ліній прэцыпітацый		Нумар труса	Колькасць ліній прэцыпітацый	
	да імунізацыі	пасля імунізацыі		да імунізацыі	пасля імунізацыі
<i>Ультрагукавы дэзінтэрат</i>			<i>Механічны дэзінтэрат</i>		
500 тыс. лічынак			500 тыс. лічынак		
1	0	0	10	0	1
2	0	1	11	0	2
3	0	1	12	0	2
800 тыс. лічынак			800 тыс. лічынак		
4	0	0	13	0	0
5	0	1	14	0	2
6	0	0	15	0	2
1 млн лічынак			1 млн лічынак		
7	0	2	16	0	2
8	0	1	17	0	2
			18	0	2
			Кантроль		
			19	0	0
			20	0	0
			21	0	0

Табліца 2. Прырост антыцелаў пасля імунізацыі

Нумар труса	АШч да імунізацыі		АШч пасля імунізацыі		Перавышэнне, разоў	
	1:200	1:1000	1:200	1:1000	1:200	1:1000
<i>5,2 мг, ультрагукавы антыген</i>						
1	74	66	205	85	2,8	1,3
2	88	65	257	147	2,9	2,3
3	137	83	287	119	2,1	1,4
У сярэднім па групе					2,6	1,7
<i>8,0 мг, ультрагукавы антыген</i>						
4	147	88	193	70	1,3	1,3
5	116	33	231	92	2,4	1,1
6	116	65	134	131	1,1	2,0
У сярэднім па групе					1,6	1,5
<i>10,4 мг, ультрагукавы антыген</i>						
7	103	72	299	138	2,9	1,9
8	133	87	279	163	2,1	1,9
У сярэднім па групе					2,5	1,9
<i>6,8 мг, механічны антыген</i>						
10	144	67	287	221	2,0	3,3
11	153	113	223	135	1,5	1,2
12	143	71	312	217	2,2	3,1
У сярэднім па групе					1,9	2,5
<i>10,96 мг, механічны антыген</i>						
13	142	86	295	213	2,1	2,5
14	142	78	226	111	1,6	1,4
15	138	92	316	239	2,3	2,6
У сярэднім па групе					2,0	2,2
<i>13,69 мг, механічны антыген</i>						
16	143	91	241	194	1,7	2,1
17	150	78	287	251	1,8	3,2
18	107	77	358	275	3,4	3,6
У сярэднім па групе					2,3	3,0
<i>Кантроль</i>						
19	153	152	168	103	1,1	0,7
20	138	77	157	115	1,1	1,5
21	174	96	153	95	0,8	1,0
У сярэднім па групе					1,0	1,1

* Развядзенне сываратак.

Табліца 3. Вынікі даследавання пірагенных уласцівасцяў антыгену на трусах

Група	Антыген	Доза ўвядзення, мг бялку	Тэмпература да ўвядзення, °С	Сярэднегрупавая тэмпература цела (°С) пасля ўвядзення праз		
				6 гадз	24 гадз	36 гадз
1	Ультрагукавы	27	38,3	38,5	38,4	38,2
2	Механічны	27	38,9	39,1	38,8	38,7

лаву. Праэктывная актыўнасць антыгену складае 64,76—77,08%. У інтактных трусаў гелмінтаў не выяўлена.

Назіранне за марскімі свінкамі на працягу 30 дзён паказала, што ўсе свінкі засталіся жывыя, сярэдняя маса да доследу ў першай групе была 386 г, пасля доследу — 395, у другой групе — 357, пасля доследу — 368 г. Рэактыўнасць захавалася.

Пры вывучэнні таксічных уласцівасцяў антыгену на мышах выяўлена, што на працягу 7 дзён усе зваркі ў абедзвюх групх засталіся жывыя, а сярэдняя маса ў першай групе да доследу была 378 г, пасля доследу — 375 г, сярэдняя маса мышэй другой групы — адпаведна 386 і 388 г.

Пірагенныя ўласцівасці антыгену вывучаліся на трусах (табл. 3).

Пры вывучэнні антыгенных уласцівасцяў высветлілася, што ў рэакцыі імунадыфузіі лініі прэцыпітацыі ўтвараліся ў гамалагічных сістэмах як з ультрагукавым антыгенам, так і з механічным, аднак колькасць іх была рознай. У першым выпадку назіралася адна прыкметная лінія, у той час як у другім адрознівалі да трох, але размытых ліній. У рэакцыі аглюцінацыі гранічны цітр сывараткі ультрагукавога антыгену 1 : 1280, механічнага — 1 : 640.

Вывады

1. Атрыманы лабараторны ўзор антыгену шляхам механічнай і ультрагукавой дэзінтэграцыі інвазаваных лічынак странгілоідаў, які бясшкодны, не таксічны і апірагенны.

2. Антыген, атрыманы пры механічнай дэзінтэграцыі, мае ў сабе 6—7 актыўных кампанентаў і валодае большай сералагічнай (трохразовы прырост антыцелаў) і пратэктывнай (да 77,08%) актыўнасцю.

Summary

Literature data on existing vaccines under some diseases of the animals are presented in this article. Methodical approaches to recovery of *Strongyloides larva* antigen are reported. The principal features of the antigen obtained are cited, its protein content is given at mechanical and ultrasonic disintegration of larvae and determination of the protective efficiency of this antigen, that reached 77,08% is described.

Літаратура

1. Dalglish R. J., Jorgensen W. K., De Vos A. J. // Trop. anim. Health Product. 1990. Vol. 22, N 1. P. 44—52.
2. Mulligan W. // Magyar Allatorvosok lapja. 1984. Vol. 39, N 3. P. 171—174.
3. Murray P. K. // Veter. Parasitol. 1987. Vol. 25, N 2. P. 121—133.
4. Murrell K. D. // Am. J. veter. Res. 1981. Vol. 42, N 11. P. 1915—1919.
5. Roitt I. M. // Parasitology. 1989. Vol. 98. P. 7—12.
6. Sharma R. L., Dhar D. M. // J. Helminthol. 1983. Vol. 57. P. 325—330.
7. Smith W. D., Jackson E., Jackson F. // Res. in veter. Sc. 1982. Vol. 32, N 1. P. 101—105.
8. Soekardji, Arifin M., Murnihari I. // Majalah Batan. 1983. Vol. 16, N 4. P. 76—84.
9. Srivastava V. K., Singh K. S., Subramanian G. // Indian J. anim. Sc. 1987. Vol. 57, N 2. P. 79—82.

БелНДІЭВ
імя С. М. Вышалескага

Паступіў у рэдакцыю
21.01.93