

[Электронный ресурс] – 2003. – Режим доступа : [http://www.fermenter.ru/content/page\\_175\\_0.html?fermenteru=51c15959eac2bef4501e16a004cdeb47](http://www.fermenter.ru/content/page_175_0.html?fermenteru=51c15959eac2bef4501e16a004cdeb47). – Дата доступа : 28.06.2009.7. Культуры животных клеток // Культивирование клеток // Системы культивирования клеток [Электронный ресурс] / Основы биотехнологии. – 2006. – Режим доступа : <http://biotechnoloq.ru>. – Дата доступа : 20.06.2009. 8. Репродукция культурального вируса бешенства при разных способах культивирования / Д.Ф. Осидзе [и др.] // Журн. Ветеринария. – 1990. – № 11. – С. 57. 9. Сафина, А.Н. Стационарное и роллерно-суспензионное культивирование межвидовой гибридной культуры клеток свинья х лошадь (а4х1) / А.Н. Сафина, Л.П. Дьяконов, Т.В. Гальнбек. – Жур. Успехи современного естествознания. – 2004. – № 3. – С. 65–66. 10. Фрешни, Р. Культура животных клеток. Методы / Р. Фрешни. – М. : Мир, 1989. – 318 с. 11. Doyle, A. Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology / A. Doyle, J.B. Griffiths. – 1998. – 332 p. 12. Jakoby, W.B. Cell Culture / W.B. Jakoby, I.H. Pastan. – 2004. – p. 639. 13. Pollard, J.W. Basic Cell Culture Protocols, 2<sup>nd</sup> ed / J.W. Pollard. – 2004. – 482 p. 14. Van Wezel, A. Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture / A. Van Wezel // Nature. – 1967. – Vol. 216. – P. 64–65.

УДК: 578:57.083

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ДОЛИНЫ РИФТ В ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЯХ КЛЕТОК

Балышева В.И., Капустина О.В., Закутский Н.И., Прудникова Е.Ю., Лукшин А.Л.

Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии», г. Покров, Россия

Представлены результаты изучения культивирования вируса лихорадки долины Рифт в перевиваемых линиях клеток стационарным и роллерным способами. Наиболее перспективными являются культуры клеток ПС, ПСГК-60, MDBK, в которых вирус накапливается в высоких титрах инфекционной ( $8,53 \pm 0,21 \lg \text{MICLD}_{50}/\text{см}^3$ ) и антигенной (в РПГА - 1: 64-128) активности.

The results of study of cultivation of Rift Valley fever virus in cell lines and stationary roller ways. Are the most promising cell culture PS, PSGK-60 MDVK, in which the virus accumulates in high titres of infectious ( $8,53 \pm 0,21 \lg \text{MICLD}_{50}/\text{см}^3$ ) and antigen (reaction of passive hemagglutination in - 1: 64-128) activity.

**Введение.** Лихорадка долины Рифт (ЛДР) - зооантропонозная трансмиссивная остро протекающая болезнь с признаками интоксикации, лихорадки, некротического гепатита, геморрагического гастроэнтерита, с высокой летальностью среди ягнят и козлят. Возбудитель относят к семейству *Vipuviridae* рода *Phlebovirus*. В настоящее время ЛДР является объектом пристального внимания исследователей, т.к. является особо опасным зооантропонозом и наносит огромный экономический ущерб, который складывается из потерь от аборт, высокого процента гибели молодняка, резкого снижения продуктивности скота, затрат на проведение карантинных и профилактических мероприятий, а также на госпитализацию и лечение людей (1). Эпизоотическое проявление болезни в виде эпизоотических вспышек и эпизоотий имеет место в африканских и азиатских странах. Однако имеются сообщения об обнаружении антител в крови шведских солдат из контингента войск ООН, что свидетельствует о возможности заноса болезни в страны Европы (2). Глобальное потепление может привести к увеличению числа и распространению потенциальных переносчиков возбудителя болезни - комаров *Cx. tritaeniorhynchus* и *Ae. vexans arabiensis*. Поэтому существует угроза распространения лихорадки долины Рифт и в Европе (3).

В связи с тем, что применение живых вакцин для профилактики ЛДР связано с потенциальной опасностью (реверсия, рекомбинация с полевыми изолятами), особую значимость приобретают инактивированные вакцины для защиты людей и животных. Производство инактивированных вакцин связано с наработкой большого количества вирусного сырья с высокой инфекционной активностью (4), в связи с чем поиск культуральных клеточных систем и разработка оптимальных параметров культивирования вируса всегда имеет важное значение для разработки вакцинных препаратов.

Поэтому целью наших исследований являлось изучение репродукции вируса ЛДР в перевиваемых линиях клеток – как наиболее технологичных продуцентов вирусного сырья.

**Материалы и методы.** Вирус ЛДР: вакцинный штамм «1974-ВНИИВВиМ» с инфекционной активностью  $6,0-6,5 \lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$  получен из коллекции микроорганизмов ВНИИВВиМ.

Перевиваемые линии клеток почек: сирийского хомячка (ВНК-21/13); эмбриона козы (ПЭАК), теленка (MDBK), зеленой мартышки сайги (ПС), сибирского горного козерога (ПСГК-60), (CV-1), овцы (ПО), эмбриона кролика (ПЭКр-85). Для сравнения эффективности накопления вируса ЛДР в первичных и перевиваемых культурах клеток использовали первичную культуру клеток почки ягненка (ПЯ).

Среда Игла (МЕМ) фирмы Sigma (США), среда 0,25% ФГМ-суспензионная, обогащенная витаминами группы "В" и глутамином ( $600 \text{ мг}/\text{дм}^3$ ) с добавлением 5-10% сыворотки крови КРС; забуференный физиологический раствор (ЗФР) pH 7,2-7,4; 0,02%-ный раствор версена; 0,25%-ный раствор трипсина, бактериальные среды.

Культивирование вируса ЛДР в перевиваемых культурах клеток. Вирус выращивали при  $34^{\circ}\text{C}$  и  $37^{\circ}\text{C}$  в стационарных и роллерных условиях до проявления ЦПД и поражения 80-100% монослоя культуры клеток.

Инфекционную активность вируса определяли титрованием в элективной клеточной культуре или на мышцах по общепринятой методике. Для титрования использовали клинически здоровых беспородных белых мышей 1-3 дневного возраста. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча в модификации Ашмарина и выражали в  $\lg \text{TЦД}_{50}/\text{см}^3$  и  $\lg \text{MLD}_{50}/\text{см}^3$  соответственно.

**Результаты исследования и обсуждение.** При культивировании вируса в указанных выше однослойных культурах клеток изучали зависимость накопления вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» от множественности заражения (от 0,01 – 0,000001  $\text{TЦД}_{50}/\text{кл}$ ), содержания сыворотки КРС в поддерживающей среде, pH, длительности культивирования при стационарном методе культивирования.

Из культуральных сосудов (1,5 л матрасы) с выросшим монослоем клеток удаляли ростовую среду и вносили поддерживающую среду с 2% сыворотки. Множественность заражения составляла 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Инфицированную культуру инкубировали до наступления 80-100% ЦПД. В каждой культуре клеток проводили от 3-х до 5-ти последовательных пассажей.

В зависимости от культуры клеток первые признаки ЦПД в первом пассаже появлялись через 24-48 часов после заражения. В процессе последующих последовательных пассажей время проявления ЦПД сокращалось и к 24 часам культивирования отмечалось округление, сморщивание клеток, появление зернистости цитоплазмы, пикноз ядра, гибель клеток и отслаивание их от субстрата. Часть клеток приобретала звездчатую форму и сохраняла цитоплазматические связи в виде отростков с соседними клетками. Максимальные деструктивные изменения наблюдали через 48-72 часа (90-120 CV-1) культивирования.

При одинаковой множественности заражения (0,01 ТЦД<sub>50</sub>/клетка) длительность культивирования вируса составляла от 3 до 7 суток (табл. 1). Дальнейшее увеличение числа пассажей указанных серотипов в испытуемых клеточных субстратах не вызывало существенного увеличения «урожая» вируса. Во всех клеточных культурах, за исключением ПЭК-85, вирус ЛДР накапливался в пределах 5,70±0,21 до 6,90±0,14 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. В результате исследований (табл.1) установлено, что наряду с клетками ПО высокой вируспродуцирующей активностью обладали клетки ПС. В культурах клеток ВНК-21/13, МДВК и ПСГК-60 титры вируса были на 0,4-0,9 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> ниже, чем в первых двух культурах клеток.

Таблица 1 – Чувствительность культур клеток к вирусу ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ»

№ п/п	Количество пассажей	Культура клеток	Время развития 80-100% ЦПД	Титр инфекционной активности (M <sub>1</sub> CLD <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )
1	4	ВНК-21/13	3-4	6,25±0,15
2	5	ПЭАК	3-4	5,70±0,21
3	4	МДВК	3-5	6,00±0,25
4	3-4	ПС	4	<b>6,90±0,14</b>
5	5	CV-1	3-4	6,50±0,25
6	3-4	ПСГК-60	3-4	6,22±0,17
7	4-5	ПО	4	6,80±0,14
8	4	ПЭК-85	7	4,17±0,15
9	5	ПЯ	3	6,32±0,14

Множественность заражения в пределах от 0,01 до 0,0003 практически не влияла на урожай вируса и длительность культивирования, которая была в пределах от 60 до 84 часов. Уменьшение множественности заражения (0,00001 и 0,00003 ТЦД<sub>50</sub>/кл и ниже) приводило к снижению «урожая вируса» и увеличению сроков наступления полной деструкции монослоя до 4-5 дней.

Таким образом, оптимальной множественностью заражения перевиваемой культуры клеток ПС является 0,01-0,0001 ТЦД<sub>50</sub>/кл, что позволяет получать вирусосодержащий материал с инфекционным титром 6,81±0,12 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> через 2,5-3,5 суток культивирования.

Установлено (табл. 2), что в культуре клеток ПС инфекционная и гемагглютинирующая активность вируса на 4-е сутки была значительно выше, чем в других клеточных культурах. Титр ГА-активности вируса, полученного в круговом монослое, в РПГА достигал величины 1:512, что более чем в 10 раз превосходит этот показатель при культивировании вируса ЛДР в культурах клеток ПСГК и ВНК-21. При этом показана прямая зависимость между титром инфекционной и гемагглютинирующей активностью.

Таблица 2 - Накопление инфекционной и гемагглютинирующей активности вируса ЛДР (шт. «1974-ВНИИВВиМ») при различных способах культивирования

Культура клеток	Способ культивирования			
	Стационарный монослой		Круговой монослой	
	Инф. актив, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	ГА-актив. в РПГА	Инф. актив, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	ГА-актив. в РПГА
ПС	6,81±0,12	1:258	7,32±0,17	1:512
ПСГК-60	6,05±0,15	1:16	6,25±0,12	1:32
ВНК-21/13	6,25±0,10	1:16	6,38±0,14	1:32

n=4 Примечание: исходный титр нативного вируса 6,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, множественность заражения - 0,001 ТЦД<sub>50</sub>/кл.

Изучение влияния значений pH на накопление вируса ЛДР показало, что поддержание pH в период адсорбции на уровне 6,7-6,9 и при дальнейшем культивировании на уровне 7,1-7,5 позволяет увеличить титр вирусосодержащего материала на 0,5-1,0 lg.

При изменении содержания сыворотки в поддерживающей среде от 0 до 10% установлено, что максимальное накопление вируса было в среде с 2% сыворотки крови КРС.

Известно, что снижение температуры культивирования инфицированной культуры обеспечивает стабилизацию pH поддерживающей среды, сохранение антигенной активности вируса и снижение риска реверсии вирулентных свойств штамма вируса. Поэтому нами было изучено влияние понижения температуры инкубирования до 34°С на сроки и уровень накопления инфекционной и антигенной активности вируса. Результаты сравнительного изучения динамики и максимального накопления инфекционной и антигенной активности вируса при температуре инкубирования 37°С и 34°С не выявили значительных отличий. Однако при температуре инкубирования 34°С pH поддерживающей среды изменялась в меньшей степени и не возникло необходимости периодического внесения (каждые 10-12 часов) раствора гидроксида натрия.

Изучение антигенной активности вирусосодержащего материала, полученного при разных температурах культивирования показало, что гемагглютинирующая и комплементсвязывающая активности практически не отличались и составляли 1:32-64 и 1:16-32, соответственно. Поддержание pH в пределах 7,2-7,5 в течение 48-72 часов культивирования стационарным методом при 34°C обеспечивало максимальное накопление вируса до  $6,81 \pm 0,12 \text{ lg TCD}_{50}/\text{см}^3$ , или  $7,5-8,7 \text{ lg MLD}_{50}/\text{см}^3$ .

Культивирование вируса роллерным методом в культурах клеток ВНК-21/13, ПСГК-60 и ПС при отработанных оптимальных параметрах выращивания: скорость вращения – 12-15 об/мин, оптимальная доза заражения  $0,01 \text{ MLD}_{50}/\text{кл.}$ , температура – 34°C, pH 7,2-7,5 позволяло получать через 48-72 часа вирусное сырье с инфекционной активностью  $8,53 \pm 0,21 \text{ lg MICLD}_{50}/\text{см}^3$  и с активностью в РПГА - 1: 64-128, в ТФ ИФА – 1:625-3125. Применение роллерной установки, разработанной во ВНИИВВиМ, для выращивания вируса ЛДР, обеспечивало одновременно получение 48 л вирусного сырья.

При проведении электронно-микроскопических исследований инфицированных культур клеток показано, что в области контакта вирусных частиц с клетками происходит утолщение клеточной мембраны и ее прогиб. Уже через 10 минут адсорбции при 37°C происходит частичное слияние клеточной мембраны с оболочкой вируса. Так же в период адсорбции обнаруживали вирусные частицы во внутриклеточных вакуолях. Установлено, что большинство чувствительных клеток инфицируются в период адсорбции вируса.

Выявление антигенов вируса в процессе его репродукции проводили непрямым методом флуоресцирующих антител, непрямым и прямым методом ИФА на монослое с использованием специфической к ЛДР и контрольной сывороток овец, моноклональных антител к нуклеопротеину (NP) вируса ЛДР.

Показано, что уже через 6-9 часов после заражения культуры клеток удается выявить антигены вируса, в частности NP, в перинуклеарной зоне цитоплазмы в виде отдельных гранул, увеличение числа которых пропорционально сроку культивирования. Через 30 часов инкубирования антиген выявляется по всей поверхности цитоплазмы практически в 50% инфицированных клеток.

**Заключение.** Таким образом, полученные результаты исследования показали, что вирус ЛДР штамм «1974- ВНИИВВиМ» накапливается в перевиваемых культурах клеток ПС, ПСГК-60, МДВК в высоких титрах инфекционной ( $8,53 \pm 0,21 \text{ lg MICLD}_{50}/\text{см}^3$ ) и антигенной (в РПГА - 1: 64-128) активности и может быть использован для изготовления эффективной безопасной инактивированной вакцины против ЛДР.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 11-08-01245-а

**Литература.** 1. Книзе, А.В., Дмитренко Н.В., Стрижаков А.А. Эволюция эпизоотической ситуации по лихорадке долины Рифт. // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропоозоозов: труды Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 45-летию института 24-26 сентября / ГНУ ВНИИВВиМ.-Покров, 2003. Часть 1.-С.93-98. 2. Meegan, J. M., Bailey C.L. (1989) Rift Valley fever: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology, vol. 4, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Rationh, Florida, USA, 52-76. 3. The Deadly Dozen: 12 Diseases Global Warming Incubates/ From Lyme Disease to Ebola Virus, The World Is Getting Sicker!/- [Электронный ресурс]. – 2008. – Режим доступа: <http://www.thedailygreen.com/environmental-news/latest/deadly-dozen-global-warming-47100803#ixzz1UdUAav4g>. 4. Балышева В.И., Кошелева А.А., Жестевее В.И. Клеточные культуры в биотехнологии производства инактивированных вакцин Актуальные проблемы ветеринарной патологии и морфологии животных: Мат. междунар. науч.-произв. конф., посвященные 100-летию Авророва. - Воронеж, 22-23 июня 2006. – С.1027-1030.

УДК 619:616.34

## РОЛЬ АТИПИЧНЫХ ЭШЕРИХИЙ И ГНИЛОСТНЫХ БАЦИЛЛ ПРИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Бовкун Г.Ф.

ФГОУ ВПО «Брянская государственная сельскохозяйственная академия», г. Брянск

*Высокий уровень высеваемости атипичных эшерихий (24,6%), гнилостных бацилл (16,09%) от больных с поражением органов пищеварения свидетельствовал об их диареегенном действии условно патогенного характера, усугубляющем воспалительный ответ.*

*The high level of sowing ability of hemolytic putrefactive bacilli 16,09%, atypical Escherichia coli -24,6% from sick calves with affection of various parts of alimentary canal testifies to their diarreagenic action of conditionally pathogenic nature redoubling the inflammatory response.*

**Введение.** Роль фекальной микрофлоры как ведущего этиологического фактора неонатальных диарей у телят установлена многими исследователями [1,4]. Если этиологическое участие таких условно патогенных энтеробактерий как цитробактеры, протеи, клебсиеллы при диарейных заболеваниях у телят считают общепризнанными [3], то роль атипичных эшерихий (лактозонегативных, гемолитических), гнилостных бацилл подлежит изучению [2].

Цель работы: изучение спектра микрофлоры фекалий телят при диарейных заболеваниях, мониторинговые исследования по выделению атипичных эшерихий, гнилостных бацилл.

**Материалы и методы.** Диарейные заболевания у 311 больных телят диагностировали по топике поражения желудочно-кишечного тракта, используя общепринятые клинические методы. После установления клинического диагноза было проведено бактериологическое исследование 140 проб фекалий больных в течение 2-х часов с момента забора материала. Разведения фекалий 1:10 сеяли на среду Эндо, сывороточный, кровяной, сывороточно-теллуритовый, питательный агар. Возбудителей кишечных инфекций идентифицировали согласно действующих методических указаний по лабораторной диагностике колибактериоза, сальмонеллеза, стафилококкоза и смешанной кишечной инфекции. Остальные микроорганизмы идентифицировали по культуральным, морфологическим, ферментативным свойствам. При необходимости определяли