

дистиллированной воды растворяли 3 флакона интерферона и аккуратно взбалтывали. После смешивания препарата в каждую носовую полость ягненка пипеткой капали по 5 капель интерферона двукратно, утром и вечером, 3 дня подряд в дозе 0,25 мл в каждую носовую полость. Одновременно животным вводили антибиотик широкого спектра действия спектиномицин в дозе 600000 ED, который применяли один раз в день внутримышечно с целью уничтожения в организме бактериальных инфекций.

После отбивки ягнят в возрасте 6-8 месяцев проводили повторное введение интерферона в носовую полость в дозе 0,25мл, внутримышечно вводили антибиотик спектиномицин в дозе 600000 ED и подкожно инъецировали 1 мл препарата ивомек с целью профилактики и лечения животных от инвазионных болезней.

Считаем необходимым для профилактики пневмоэнтеритов правильно организовывать технологию выращивания и кормления животных. С профилактической целью можно также использовать препарат интерферон, который лучше применять животным групповым методом. Для этого в кошаре в родильном отделении монтировали из полиэтиленовой пленки мини-изолятор размером 4 м², высотой 1,5 м² и плотно закрывали. В середине изолятора на высоте 1,5 метра устанавливали ингалятор или же аэрозольный опрыскиватель САГ-1, который заправляли жидким интерфероном (на 10 мл дистиллированной воды 3 флакона сухого интерферона). После этого в изолятор помещали ягнят, плотно закрывали и производили аэрозольную обработку животных против респираторных заболеваний. Процесс повторяли два раза в сутки в течение двух дней. По итогам работы у ягнят брали сыворотку крови и исследовали (в РНГА) на содержание антител против респираторных вирусов ягнят.

Таким образом, полученные нами результаты исследований показали, что комплексное проведение лечебно-профилактических мероприятий обеспечивает сохранность поголовья до 95%.

Заключение. 1. Вирусные болезни овец с респираторным синдромом имеют широкое распространение в Республике Кыргызстан и наносят значительный экономический ущерб овцеводству.

2. Естественное ионизирующее излучение способствует ослаблению иммунной защиты у животных, наслению и более тяжелому течению вирусных пневмоэнтеритов.

3. При лечении животных, больных вирусными пневмоэнтеритами, высокой эффективностью обладает сыворотка реконвалесцентом и интерферон лейкоцитарный человеческий в сочетании с антибиотиками. Для профилактики болезней необходимо строгое соблюдение технологии выращивания и кормления животных.

Литература. 1. Карпуть, И.М. Ветеринарная наука производству / И.М. Карпуть // Межведомственный сборник. – Минск: Урожай, 1988. – С. 49-53. 2. Киришин, В.А. Ветеринарная радиобиология / В.А. Киришин, А.Д. Белов, В.И. Бударков // М: Агропромиздат, 1986. – С. 35-99. 3. Мурзалиев, И.Дж. Методы по предупреждению и ликвидации пневмовирусом овец и коз / И. Дж. Мурзалиев // Вестник КАУ, 2005. – № 1(4). – С. 84-86. 4. Соколов, М.Н. Влияние различных технологий содержания и выращивания ягнят на проявление инфекционного процесса при заболеваниях органов дыхания / М.Н. Соколов, И.Дж. Мурзалиев // Всесоюз. конф. – Москва, 1991. – С.39-41. 5. Писаренко, Н.И. Инфекционные агенты при респираторной патологии овец / Н.И. Писаренко [и др.]. – Всесоюз. конф. – Москва, 1991. – С.66-71. 5.

УДК 619:578.1

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ВИРУСА РРСС

Савельева Т. А., Красникова Е. Л.

РДУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского»,
г. Минск, Республика Беларусь

В статье приведены данные по изменению инфекционного титра вируса РРСС в зависимости от variability условий культивирования. Определены режимы культивирования, позволяющие минимизировать сроки получения вирусосодержащего материала.

In article data on change infectious tumpa virus РРСС depending on variability of conditions of cultivation are cited. The cultivation modes are defined, allowing to minimise terms of reception a material containing material a virus.

Введение. Вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней(РРСС) - одноцепочный РНК-содержащий вирус сем. Arteriviridae р. Arterivirus. отряд Nidovirales, обладает высокой контагиозностью, поражает не только молодняк (респираторный синдром), но и маточное поголовье (аборт, прохолосты и т. д.), способен проникать через плацентарный барьер, что способствует появлению врожденного вирусносительства неиммунных групп, длительно персистирует в стаде, обладает сильным иммуносупрессирующим действием, т.к. поражает альвеолярные макрофаги, что способствует развитию смешанных инфекций, увеличивая процент смертности молодняка[1,2].

Исследования ученых подтвердили циркуляцию вируса РРСС в крупных свиноводческих комплексах Республики Беларусь. Кроме того, белорусский вирус, имея близкое родство со штаммами европейского типа, выделен в отдельную группу [3,4].

Штаммы вируса РРСС вариабельны (более 400 штаммов), цитопатичны для культуры клеток и отличаются между собой по нуклеотидной последовательности в серологических реакциях, а также по биологическим свойствам. Однако высокая видовая специфичность ограничивает рамки подбора оптимальных клеточных систем для культивирования [1,7,8].

В литературе опубликовано много сообщений различных авторов о попытках адаптации вируса РРСС к различным первичным и перевиваемым клеточным культурам. Вирус РРСС не удалось культивировать в первичных культурах легкого, почек, семенников, сердца, эндотелия, костного мозга и щитовидной железы свиньи, эпителия крупного рогатого скота, фибробластов, эндотелия и печени кур, в куриных эмбрионах. Изоляция вируса оказалась безуспешной на перевиваемых клеточных линиях свиньи носовой раковины, свиньи почки (РК-15, РК-2, SK-6), носовой раковины крупного рогатого скота.

Park и соавт. отмечали патогенный эффект вируса РРСС в первичной культуре трахеального кольца свиньи. Поражение ресничек мерцательного эпителия и эпителиальных клеток трахеального кольца зависели от патогенности изолята. Патогенные изоляты вызывали изменения вплоть до потери ресничек и дегенерации эпителиальных клеток.

Наиболее чувствительными оказались первичная культура альвеолярных макрофагов свиней (АМС) и два клоновых варианта перевиваемой линии клеток МА-104: CL-2621 и Marc-145 [5, 6, 7, 9]. К клеточным линиям, в которых, как сообщалось, происходит репликация вируса РРСС, относят также FL, и PS-EK, ВНК. Однако эти сообщения весьма ограничены и требуют дальнейшего подтверждения [3, 9].

Способы получения альвеолярных макрофагов свиньи, описанные в литературе, не рассчитаны на получение от одного донора большого количества культуры, что создает существенные ограничения для их применения. С увеличением возраста доноров выход макрофагов на 1 г ткани заметно снижается, а общий сбор повышается, что связано с ростом массы органа [7]. Клетки альвеолярных макрофагов свиней не размножаются, а, следовательно, для образования полного монослоя необходимо увеличение посевной дозы клеточного материала. Перевиваемая клеточная линия Marc-145 (почка макаки-резус) получена в научно-исследовательском институте «Центр здоровья животных» (США) с заданной чувствительностью к РРСС и представляет собой пристеночную перевиваемую культуру полигональных клеток, формирующих монослой на 3-4-е сутки, имеющих кратность рассева 1:5-6.

Существуют изоляты вируса, репродуцирующиеся только на АМС или только на перевиваемой культуре клеток Marc-145 [1, 3]. Правильно подобранные режимы, способы и системы культивирования позволяют получить качественный вирусологический материал в оптимальные сроки [1, 2, 8, 9], поэтому целью нашей работы стало изучение влияния условий культивирования на инфекционный титр вируса РРСС и сроки получения вирусосодержащей суспензии со стабильным инфекционным титром.

Материалы и методы: Для работы использовали европейский штамм вируса РРСС.

Культивирование вируса проводили на первичной культуре клеток (КК) альвеолярных макрофагов свиней (АМС) и перевиваемой культуре клеток Marc-145. Кроме того, в исследованиях использовали и другие перевиваемые КК (МА-104, ВНК-21/13 и Vero).

Перевиваемые культуры клеток готовили к заражению по общепринятым методикам [10] путем версен-трипсинизации монослойной культуры с последующим рассевом на носители (концентрация клеток 50-100 тыс.кл. в мл ростовой среды).

В качестве ростовой среды использовали комбинацию Игла MEM 0,5% ГЛА и 199 в соотношении оптимальном для данного типа перевиваемой культуры клеток и вируса. Росточная среда содержала 5-10 % эмбриональной сыворотки КРС. Объем росточной среды зависел от объема носителя. Культивирование клеток проводили на различных носителях путем роллерного (на 2 л роллеров) и стационарного (на 1,5-2 л матрасах) культивирования. Для приготовления первичной КК АМС использовали легкие клинически здоровых поросят из благополучного по РРСС хозяйства в возрасте 30-60 дней. Убой поросят, изъятие легких и подготовку к работе проводили по общепринятой методике [5]. Легкие брали бледно-розовые, без повреждений и признаков воспалительных процессов, в стерильных условиях. Для получения клеточной суспензии использовали: Раствор №1 раствор Хенкса pH 7,2-7,4 с концентрацией антибиотика 1000 ЕД/мл пенициллина и 1000мкг/мл стрептомицина; Раствор №2 раствор Хенкса с концентрацией антибиотика 100 тыс. ЕД (мкг)/мл pH 7,2-7,4; Раствор №3 Ростовая среда – Игла MEM с 5-10 % сыворотки КРС. В стерильных условиях легкие обмывали раствором №1, затем отмывали трахею и бронхи от слизи через трахею с помощью шприца Жане, вводя раствор №2. Объем однократно вводимого раствора зависел от размера легких и составлял от 50 до 150 мл. Первые две порции сливали. Для разжижения слизи использовали гепарин в дозе 4мл/400 мл. Затем путем 5-6-кратного вымывания с помощью раствора №2 шприцом Жане отмывали макрофаги из легких в вышеназванных объемах. Отмытые макрофаги собирали во флаконы и центрифугировали в течение 20-15-10 минут при 1500-2000 об/мин, сливая надосадок, а осадок отмывали повторно раствором №2 до полной прозрачности раствора.

Подсчет клеток проводили после окрашивания трипановым синим в счетной камере Горяева согласно общепринятой методике [5, 6], с определением количества жизнеспособных клеток. Оптимальными условиями для культивирования АМС являются культивирование на пластиковых носителях в условиях CO₂ - инкубатора 95% CO₂ при 37⁰С. Рассев проводили на пластиковые носители. Концентрация клеток варьировала – 1500 - 3000 тыс. /мл.

Заражение вирусом в дозе 0,01-1 ТЦД₅₀/кл. проводили на КК АМС через 24 часа культивирования на носителе путем слива росточной среды, двукратного отмывания монослоя раствором Хенкса и внесением вируса с инкубацией в течение 1 часа при 37⁰С и повторным внесением поддерживающей среды (с 2% сыворотки КРС).

Заражение КК проводили с адсорбцией вируса по общепринятой методике [6, 10] и без на культуре клеток, внося во втором случае вирус вместе с поддерживающей средой. В обоих случаях КК инкубировали при 37⁰С в течение 3-5 суток до получения тканевого цитопатического действия (ТЦД).

Заражение перевиваемых культур клеток проводили согласно общепринятой методике - 3-4 суточную культуру (на полный монослой) и суточную культуру (с 70-80 % монослоя).

Вирус культивировали на роллерах объемом 2 л и матрасах объемом 1,5-2 л на протяжении пяти последовательных пассажей.

Хранение вирусосодержащей суспензии осуществляли при -20⁰С.

Идентификацию штамма вируса проводили с помощью ИФА и ПЦР. Титр вируса определяли в реакции нейтрализации (РН) на культуре клеток.

Результаты исследований. Проведенные нами исследования в течение 6-ти пассажей штамма вируса РРСС на выбранных культурах клеток показывают, что оптимальной системой культивирования вируса РРСС являются АМС и перевиваемая КК Marc-145, относительно чувствительна к вирусу РРСС МА-104.

Перевиваемые культуры ВНК и Vero на протяжении 6 последовательных пассажей оставались нечувствительны к инфицирующему штамму.

Таблица 1 - Чувствительность культур клеток к вирусу РРСС

| Пассаж вируса | Цитопатическое действие на культуре клеток | | | | |
|---------------|--|------------|--------|------|-----|
| | АМС | Марс - 145 | Ma-104 | Vero | ВНК |
| 1 | + | + | + | - | - |
| 2 | + | + | + | - | - |
| 3 | + | + | + | - | - |
| 4 | + | + | + | - | - |
| 5 | + | + | + | - | - |

Дальнейшие исследования проводили на перевиваемой культуре клеток Марс-145, так как работа с АМС в силу особенностей получения и культивирования довольно трудоемкая и дорогостоящая, а титр вируса в нашем опыте был на четвертом пассаже несколько ниже, чем при культивировании штамма на перевиваемой культуре клеток Марс-145 $6,25$ и $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ соответственно, поэтому в качестве тест-объекта использовали перевиваемую культуру клеток Марс-145.

Накопление вируса в наших исследованиях не зависело от способа внесения вирусосодержащего материала и незначительно отличалось по титру ($7,5$ и $7,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$).

Наибольший титр вируса - $7,75 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ был нами получен на 3-4-е сутки после заражения суточной перевиваемой культуры клеток (70-80% монослоя). Ежесуточное проведение микроскопии позволило установить время проникновения вируса в клетку, максимального накопления и выхода из клетки.

Уже в первые сутки при заражении культуры клеток в дозе $0,01 \text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$. вирус проникает в клетку и начинает интенсивно реплицироваться, на третьи сутки поражается (округление клеток) до 70 % клеток, на пятые сутки наблюдается максимальное поражение монослоя и вирус, полностью разрушая клетку, выходит в окружающую поддерживающую среду (см. рис. 1)

В течение первых 10 часов после заражения появляются округлые клетки, количество которых постепенно увеличивается и к третьим суткам поражается почти весь монослой, отдельные пораженные клетки собираются в конгломераты, напоминающие гроздья винограда, затем монослой постепенно слущивается, клетки разрушаются, вирус выходит из клетки, оставляя на пятые-седьмые сутки отдельные поврежденные деформированные клетки на носителе.

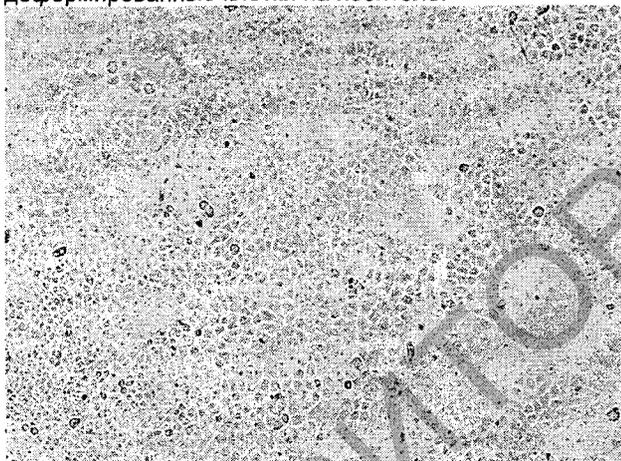


Рисунок 1 - КК Марс-145 в 1-е сутки после заражения отдельные единичные повреждения клеток (округление)

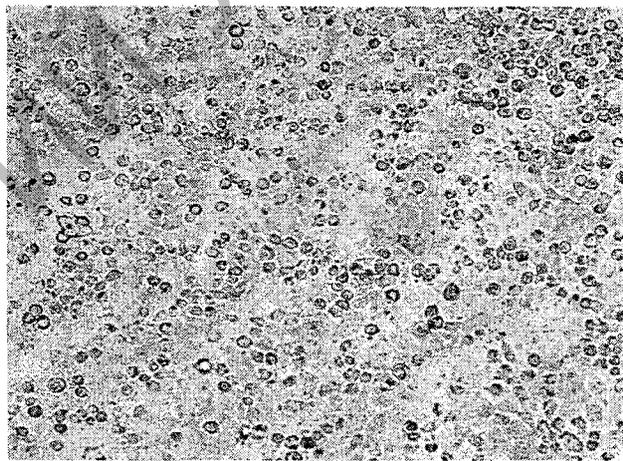


Рисунок 2 - Третьи сутки после заражения – значительное поражение монослоя, увеличение количества округлых клеток, разрежение отдельных участков монослоя

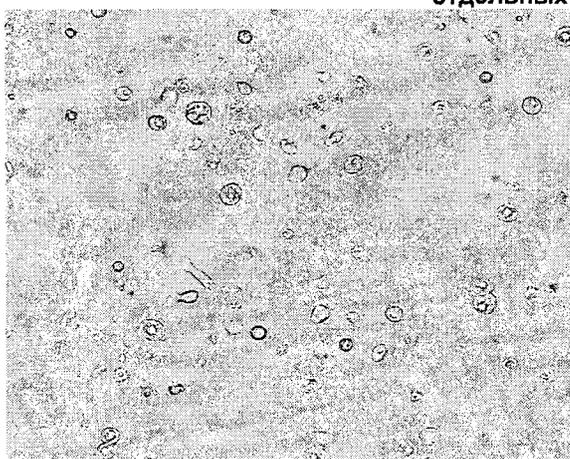


Рисунок 3 - Пятые сутки после заражения – полное разрушение монослоя, единичные пораженные клетки на носителе, клетки имеют поврежденную клеточную стенку, вакуолизированную цитоплазму, округлую или неправильно вытянутую форму

Увеличение инфицирующей дозы вирусного агента до 1 ТЦД₅₀ / кл. сокращало сроки проникновения вируса в клетку, поражения и разрушения клеточного монослоя до трех суток, обеспечивая получение одинаковых титров вируса (6,75 lg ТЦД₅₀/мл и 7,0 lg ТЦД₅₀/мл) за более короткий срок.

Максимальное накопление вируса РРСС в культуре клеток в нашем опыте зависело от вносимой дозы вируса, полноты монослоя и количества клеток, находящихся в момент инфицирования в стадии логарифмического роста, что не отличается от сообщений в литературных источниках [3,4,5,9].

Культивирование вируса на стационарной культуре клеток с 4 по 7 пассажи повышало титр вируса с 6,5 до 7,5 lg ТЦД₅₀/мл, затем на протяжении трех пассажей титр вируса был стабилен в пределах 7,5 lg ТЦД₅₀/мл, что, по всей видимости, связано с адаптацией вируса к культуре клеток.

Таблица 2 - Изменение вирулентности вируса РРСС в зависимости от пассажа вируса на перевиваемой культуре клеток Marc-145

| Пассаж вируса на культуре клеток Marc-145 | Титр вируса lg ТЦД ₅₀ /мл |
|---|--------------------------------------|
| 4 пассаж | 6,5 |
| 7 пассаж | 7,5 |
| 10 пассаж | 7,5 |

Таблица 3 - Зависимость инфекционного титра вируса от метода культивирования

| Носители | Число пассажей | Число опытов | Титр вируса (lg ТЦД ₅₀ /мл) |
|-----------------|----------------|--------------|--|
| Матрасы 1,5-2 л | 1-5 | 5 | 6,5-7,5 |
| Роллеры 2 л | 1-5 | 3 | 7,0-7,75 |

Из таблицы 3 видно, что титр вируса на роллерах на 0,25- 0,5 lg ТЦД₅₀/мл выше, чем на матрасах, однако, по всей видимости, это связано с увеличением площади монослоя и, как следствие, объема клеточной массы на носителе при одинаковых объемах поддерживающей среды, что связано с особенностями роллерного культивирования.

Длительность хранения и частота замораживаний-оттаиваний, согласно полученным нами данным, также влияют на титр вируса. В нашем случае титр падал на 1 lg ТЦД₅₀/мл уже через 4 месяца хранения при -20⁰С и 20 кратном замораживанием-оттаиванием.

Таблица 4 - Зависимость инфекционного титра вируса от длительности хранения и интенсивности замораживаний-оттаиваний

| Пассаж вируса на культуре клеток Marc-145 | Длительность хранения | Число замораживаний-оттаиваний | Титр вируса lg ТЦД ₅₀ /мл |
|---|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| 7 пассаж вируса РРСС | 1 нед. | 3 | 7,5 |
| | 4 мес. | более 20 | 6,5 |

Заключение: 1. Максимальное накопление вируса РРСС в культуре клеток в нашем опыте происходило при заражении суточной культуры клеток на 5-10 пассажах при инфицирующей дозе вируса 1 ТЦД₅₀/кл. в роллерах. 2. Заражение суточной перевиваемой культуры клеток вирусом в дозе 1 ТЦД₅₀/кл. позволяет сократить срок культивирования вируса с пяти до трех суток без значительного снижения титра вируса. 3. На инфекционный титр вируса РРСС влияют: адаптация к культуре клеток, полнота монослоя, количество клеток, находящихся в стадию логарифмического роста, инфицирующая доза вируса, длительность хранения и интенсивность использования.

Литература: 1. Голубцов А.В. Клинико-эпизоотологическая характеристика и профилактика репродуктивно-респираторного синдрома свиней: Автореф. дис.канд. вет. наук-Воронеж,2000. 2. Шевцов И.А. Эпизоотологическая характеристика, диагностика и профилактика репродуктивно-респираторного синдрома свиней в Курской области: Автореф. дис.канд.вет.наук - Курск, 1999. 3. Балашова Е.А., Куриннов В.В., Вишняков И.Ф. и др. Чувствительность некоторых перевиваемых культур клеток к вирусу РРСС // Вирусные болезни с.-х. жив-х: Тез. докл. всерос. науч.-практ. конф.-Владимир, 1995.-С.96. 4. Гаврилова В.Л., Байбиков Т.З., Гусев А.А., Дудникова Н.С. Выявление антител к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней в сыворотках крови в реакции нейтрализации // Пробл. инфекц. патологии жив-х: Тез. докл. конф., посвящен. 100 - летию открытия вируса ящура.- Владимир,1997. 5. Голубев Д.Б., Соминина А.А., Медведева М.Н. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии.-Л.: Медицина, 1976.-С.59-61. 6. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных.-М.:ВНИТИБП,1998.-С.552-558. 7. Юрков С.Г. Совершенствование методики изготовления альвеолярных макрофагов свиньи // Ветеринария.-1996. -№ 1. -С. 19-21. 8. Van Woensel P.A., Liefkens K., Demaret S. Effect on viremia of an American and a European serotype PRRSV vaccine after challenge with European wild-type strains of the virus//Vet. Rec.-1998.-V.142, №19.-P.510-512. 9. Van Woensel P.A., Liefkens K., Demaret S. European serotype PRRSV vaccine protects against European serotype challenge whereas an American serotype vaccine does not //Adv. Exp. Med. Biol.-1998.-V.440.-P.713-718. 10. Савельева Т.А., Гусев А.А., Лысенко А. П., Красникова Е. Л. и др. Методические указания по диагностике и профилактике репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) Мн.с. 27-2007.