

АДАПТАЦИЯ *M. HYOPNEUMONIAE* К КУЛЬТУРАМ КЛЕТОК

Андросик Н.Н., Мистейко М.М., Финогенов А.Ю., Андросик Л.Д.  
РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского НАН Беларуси»

Вакцинация при многих инфекционных заболеваниях является одним из наиболее эффективных профилактических мероприятий. В то же время успех вакцинной профилактики во многом зависит от качества выпускаемых биопрепаратов, и их стоимости.

Для производства вакцин против микоплазмоза свиней, обусловленного *Mycoplasma hyopneumoniae* Respisure (Pfizer, США), Porcilis M, Porcilis BPM (Intervet, Голандия) используют жидкие питательные среды, которые даже при полноценном своем составе дают низкий выход биомассы микоплазм за короткий срок культивирования, а вследствие высокой стоимости ее компонентов применение вакцины не всегда экономически оправдано. Все это обуславливает поиска новых методов культивирования *M. hyopneumoniae*, обеспечивающих высокий выход конечного продукта.

В современном производстве вирусных вакцин главным субстратом их размножения являются культуры клеток. Учитывая способность некоторых видов микоплазм размножаться на культурах клеток, послужило основанием для проведения исследований по адаптации *M. hyopneumoniae* к культуре клеток.

Изучая взаимодействие *M. hyopneumoniae* (штамма J и 144L) с перевиваемыми культурами клеток фибробластов легкого свиньи (PK-15), человека (WWPL) и (MRC-5) почки свиньи (Zielinski G.C. с сотр., 1990) установили, что к *M. hyopneumoniae* штамм 144L лучше взаимодействовал с культурой клеток PK-15 и WWPL, чем штамм J. Оба штамма плохо взаимодействовали с клетками MRC-5. Отмечались различия в плотности прикрепления клеточного монослоя к стенкам плашек. Культура MRC-5 и WWPL легко отделялась от стенок в процессе отмывания, тогда как PK-15 отмывалась тяжело. На основе сравнения деформации клеточного монослоя, было выявлено, что штамм 144L имел лучшую способность прикрепляться к культуре клеток PK-15, и сама культура была наиболее устойчивой в процессе отмывания. В результате было установлено, что наилучшей моделью для культивирования *M. hyopneumoniae* штамма 144L явилась культура клеток PK-15.

Целью нашего опыта было подобрать культуру клеток, обеспечивающую максимальный рост *M. hyopneumoniae* и максимальный выход биомассы.

**Материалы и методы.** В работе использовали штамм *Mycoplasma hyopneumoniae* выращенный в среде Friis. Его адаптацию проводили на первично трипсинизированную культуру почки и легкого эмбрионов свиней, альвеолярных макрофагов, а также перевиваемые культуры клеток СПЭВ, МДВК, FL, Marc, Vero и FRHK находящиеся в логарифмической фазе роста.

Путем световой микроскопии культур клеток определяли равномерность роста клеток в пробирках. Сплошной монослой образовывался на 2-3 сутки при коэффициенте пролиферации 1:4–1:5.

Перед заражением культуры клеток освобождали от ростовой среды, дважды отмывали раствором Хенкса. В каждую пробирку вносили бульонную культуру *M. hyopneumoniae* в соотношении 1:10 к объему питательной среды, или в дозе  $10^{6-7}$  КОЕ/мл. Выдерживали на контакте в термостате при температуре 37,5-38,0°C в течение 15, 30 и 45 мин. Затем вносили поддерживающую среду на фетальной сыворотке КРС с добавлением глюкозы.

Инфицированные культуры инкубировали в течение 2-6 суток при температуре 37,5-38,0°C до появления выраженного деструктивного действия или до окисления среды продуктами роста культур клеток.

После культивирования культуру замораживали для разрушения клеточного монослоя и затем ее снова использовали для заражения культур клеток.

При работе с культурами клеток из антибиотиков использовали только ампициллин, так как другие могли оказать негативное влияние на рост микоплазмы.

Визуальную оценку микробного заражения культур клеток проводили по закислению, помутнению среды, появлению межклеточного гранулярного материала и взвешенных в среде не идентифицированных частиц при микроскопическом обследовании монослоя клеток.

Однако основным тестом контроля роста микоплазмы служил пересев на плотную питательную среду зараженной культуры клеток после ее замораживания, на которой подсчитывали количество колониеобразующих единиц.

Контроль стерильности, с целью выявления возможной контаминации аэробными и анаэробными бактериями и грибами проводили путем посева суспензии зараженных клеток на Среду Кит-Тароцци, МПБ, МПА и агар Сабуро.

**Результаты исследований.** В процессе проведения опытов, нами было установлено, что из испытанных культур, характерные деструктивные изменения мы наблюдали лишь на перевиваемой культуре клеток Marc, которая оказалась чувствительной к штамму *M. hyopneumoniae*. Первые цитопатические изменения начинали появляться через 24 часа, которые характеризовались некротическими изменениями в ядре и разрушением цитоплазматической мембраны. Через 48 часов наблюдали более значительное разрушение монослоя в виде единичных сползаний клеток. Полная гибель монослоя наступала через 72 часа и он был представлен в виде островков.

При пересеве на агар мы установили, что наиболее интенсивный рост микоплазмы наблюда-

ется спустя 48 часов после заражения и их титр составлял  $1 \times 10^5$  КОЕ/мл.

При контроле титра микоплазм в культуре клеток в зависимости от их пассажа мы установили, что он был не постоянным. Начиная с первого пассажа он с небольшими колебаниями постепенно возрастал достигая максимума ( $1 \times 10^{5.5}$  КОЕ/мл) к 6-му пассажу. Затем титр микоплазм снижался с небольшим подъемом после 10 и 11-го пассажей.

**Выводы.** В результате проведенных исследований установили, что размножение *M. hyorhynchos* на перевиваемых культурах клеток СПЭВ,

МДБК, FL, Vero и FRHK мы не наблюдали, и лишь культура клеток Marc оказалась чувствительной к этому виду микоплазм. Однако и в данной культуре клеток высоких и стабильных показателей накопления возбудителя микоплазмоза свиней не произошло. Поэтому необходимо провести дальнейшие исследования по подбору оптимальной питательной среды как для культуры клеток Marc так и самой микоплазмы, а также по использованию других культур клеток, которые оказались более чувствительными к *M. hyorhynchos*.

УДК 619. 616.98.579:615.843.94

**ВЛИЯНИЕ ФОРМАЛИНА, ТЕОТРОПИНА И ГИДРОКСИЛАМИНА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ *M. HYORHYNCHOS***

Андросик Н.Н., Мистейко М.М., Финогенов А.Ю.

РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси»

Своевременное и четкое проведение в жизнь комплекса профилактических и противозoonотических мероприятий позволит надежно предупредить болезни свиней, а при возникновении в короткие сроки ликвидировать их, что обеспечит высокую рентабельность свиноводства. Это во многом зависит от качества вакцин, степени сохранения антигенных свойств возбудителя и способности обеспечивать напряженный иммунный ответ.

Согласно литературным данным для инактивации вирусов и бактерий используется фенол, формалин и некоторые другие химические соединения, которые оказывают воздействие на эффективность вакцины. Они приводят к разрушению не только клеточных структур, но и к частичной инактивации наиболее лабильных антигенных фракций.

В тоже время, солянокислый гидроксилламин в процессе взаимодействия с микроорганизмами разрушает их генетический аппарат, максимально сохраняя нативность белковой оболочки [3,5]. Кроме того, он является безостаточным препаратом, так как в процессе обработки культур солянокислый гидроксилламин полностью расщепляется на воду и газообразные, легко удаляющиеся продукты - аммиак и азот [4].

С целью инактивации *Mycoplasma hyorhynchos*, *Mycoplasma laidlawii* было апробировано радиоактивное излучение [1]. Для облучения использовалась гамма-установка с возрастающими дозами облучения (от 0,05 до 0,5 кГр). Было установлено, что микоплазмы слабоустойчивы к воздействию радиоактивного излучения и выживаемость их зависит от дозы облучения.

Изучение инактивирующего действия солянокислого гидроксилламина проводилось на культуры *Haemophilus parasuis* и *Mycoplasma hyorhynchos*. Было установлено, что полное инактивирование *H. parasuis* наступало в дозах препарата 0,1 мг на 1 млрд. м.к. и выше через 8 часов, а в концентрации гидроксилламина 0,05 мг на 1 млрд. м.к. и ниже не вызывает их гибели в течение 2 суток. При опреде-

лении инактивирующего действия солянокислого гидроксилламина на *M. hyorhynchos* было установлено, что в концентрации 1:9000 снижает титр микоплазм до  $10^4$ . Доза его 1:7000 уменьшает титр *M. hyorhynchos* до  $10^2$ , а концентрация 1:5000 - 1:6000 - до  $10^2$ . Добавление этого препарата в конечной концентрации 1:4000 и выше вызывало полную инактивацию через 24 ч [2].

Целью нашей работы было проведение исследования о влиянии различных концентраций и экспозиций на инактивацию бульонной культуры *Mycoplasma hyorhynchos* формалином, гидроксилламином и теотропином.

**Материалы и методы.** В работе использовали референтный штамм *Mycoplasma hyorhynchos*. Инактивации подлежала культура, полученная после 8-дневного культивирования в бульоне. Концентрация микробной взвеси составляла  $10^9$ .

Гидроксилламин гидрохлорид испытывали в 0,1%, 0,25%, 0,4% и 0,5%, теотропин 0,05%, 0,1% и 0,2%, формалин 0,1%, 0,25%, 0,5% и 1% конечном насыщении. Инактивацию проводили при 37 °С в течение 72 часов. Выживаемость *M. hyorhynchos* определяли путем отбора проб и посева их на агар Мартена сразу после внесения препаратов и через каждые 12 часов.

**Результаты исследований.** Проведенный опыт позволил нам представить динамику инактивации *M. hyorhynchos* в жидкой питательной среде различными инактивантами и определить зависимость процентного соотношения инактиванта и среды. Результаты испытаний показали, что эффективное инактивирование *M. hyorhynchos* достигается при доведении конечного насыщения инактивирующих растворов до 0,1% теотропина, 0,4% гидроксилламина и 0,5% формальдегида в среде. Для того, чтобы полностью инактивировать возбудителя потребовалась экспозиция 12 часов. Конечная концентрация 0,05% теотропина, 0,25% гидроксилламина и 0,25 % формалина в культуральной среде при той же экспозиции инактивирующих рас-