

штаммов С-4 и С-8 титр их, как правило, возрастает. При оценке накопления микоплазм в культуре клеток и на куриных эмбрионах существенных различий не установлено.

Преимущество метода культур клеток по сравнению с оценкой по гибели куриных эмбрионов дает возможность вести ежедневное визуальное наблюдение культуры в световом микроскопе и выявлять более ранние сроки проявления цитопатических изменений.

Исследованием контрольных (неинфицированных) культур клеток, сывороток и питательных сред на специальных средах для микоплазм наличия микоплазмоконтaminантов не установлено.

## **В ы в о д ы**

1. Проведенные исследования показали, что в зависимости от вида клеточных культур одни и те же штаммы микоплазм могут вызывать острую или латентную инфекцию клеток.

2. Первично трипсинизированные клетки куриного эмбриона и почек поросенка обладают высокой чувствительностью и могут быть использованы для культивирования, титрования и изучения микоплазм, выделенных при энзоотической пневмонии свиней.

3. Культура клеток СПТ по чувствительности к микоплазмам имела сходство с куриными эмбрионами.

4. Культура клеток ПЯ поддерживала размножение микоплазм, но не проявляла цитопатических изменений.

## **ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА МЕШОТЧАТОГО РАСПЛОДА ПЧЕЛ**

---

НАУМЕНКОВ В. И.,  
*аспирант*

Вопрос о внутриклеточной репродукции вируса мешотчатого расплода пчел в литературе не освещен. Это послужило основанием для проведения настоя-

шей работы, цель которой состояла в изучении репродукции вируса мешотчатого расплода пчел в клетках куриных и мышинных фибробластов с применением метода флюорохромирования и непрямого метода иммунофлюоресценции.

В работе использовали эпизоотический штамм вируса мешотчатого расплода (штамм «п»), выделенный нами из погибших личинок. Титр этого штамма на куриных и мышинных фибробластах после 3-го пассажа —  $6,3 \lg$  ТЦД<sub>50/мл</sub>. На 2-е сутки после заражения клеточного монослоя отмечали выраженное цитопатогенное действие (ЦПД) вируса.

Куриные и мышинные фибробласты получали путем первичной трипсинизации кожно-мышечной ткани 7—9-дневных куриных эмбрионов и 20—25-дневных эмбрионов мышей. Клетки в питательной среде (5%-ный гемогидролизат с 10% бычьей сыворотки) разливали по 1,5 мл в стерильные пробирки, куда предварительно помещали полоску покровного стекла. Их инкубировали в термостате при температуре 37° в течение 3 суток до появления сплошного клеточного монослоя. Затем клетки заражали вирусом мешотчатого расплода пчел по общепринятой вирусологической методике. Через 4, 6, 9, 12, 24, 30, 48 и 58 часов полоски стекла с находившимся на них монослоем извлекали и фиксировали в охлажденном ацетоне в течение 10 минут. После фиксации промывали несколько раз дистиллированной водой, высушивали и изучали клеточный монослой методами люминесцентной микроскопии.

При исследовании препаратов методом флюорохромирования применяли акридин оранжевый, который растворяли в дистиллированной воде в соотношении 1:30 000, рН устанавливали в пределах — 3,8. Препараты окрашивали раствором акридина оранжевого в течение 5 минут, промывали в дистиллированной воде и высушивали в термостате.

Гипериммунную сыворотку, необходимую для исследования препаратов непрямым методом иммунофлюоресценции, получали от кроликов по предложенной нами методике (В. И. Науменков, В. М. Жавненко, 1971). В качестве вирусосодержащего материала использовали вирусосодержащую суспензию из инфицированных вирусом куриных фибробластов. Учитывая возможность присутствия неспецифических антител в сыворотке по отношению к тканевым антигенам, мы адсорбировали

сыворотку взвесью клеток куриных фибробластов. В дальнейшем адсорбированные сыворотки использовали во всех основных опытах и в контроле. Титры сыворотки (1:256) установили в реакции нейтрализации на куриных фибробластах.

Методика обработки препаратов при исследовании их непрямом методом иммунофлюоресценции состояла в следующем: на фиксированные препараты наносили несколько капель гипериммунной сыворотки, специфичной к вирусу мешотчатого расплода, в рабочем разведении и оставляли их на 15 минут в условиях влажной камеры в термостате. По истечении этого времени сыворотку сливали, препараты промывали в дистиллированной воде и дополнительно обрабатывали флюоресцирующей сывороткой против  $\gamma$ -глобулинов кролика (Фитц-конъюгат) в течение 15 минут при тех же условиях. После обработки сывороткой препараты промывали в физиологическом растворе и дистиллированной воде, высушивали в термостате.

Микроскопическое исследование препаратов, обработанных акридином оранжевым и иммунными сыворотками, проводили в следующем порядке: на предметное стекло наносили каплю забуференного глицерина (9 частей глицерина + 1 часть физиологического раствора) и помещали на нее полоску покровного стекла так, чтобы монослой находился на стороне, погруженной в глицерин. Сверху на покровное стекло наносили каплю нефлюоресцирующего иммерсионного масла и рассматривали препарат под люминесцентным микроскопом МЛ-2 (светофильтры ФС-1, СЗС-7, БС-8 и ЖС-18, объектив  $\times 90$ , окуляр  $\times 5$ ).

Использование метода флюорохромирования (просмотрено 50 препаратов) позволило установить, что начиная с четвертого часа после заражения, вокруг ядра клетки возникает своеобразный ободок, представляющий собой зернистую массу красно-оранжевого цвета. Через 6 часов после образования округлой формы (2—5  $\mu$ к) его светящиеся красным цветом зерна обнаруживались на значительном расстоянии от ядра и на периферии цитоплазмы, но в небольшом количестве. Спустя девять часов отмечали диффузное свечение всей цитоплазмы клетки, изменение морфологии фибробластов (образование двухъядерных клеток). Аналогичные изменения отмечали и через 12 часов после заражения клеточного монослоя.

Результаты, полученные в течение 12 часов с момента инфицирования клеточного монослоя, свидетельствуют о постепенном накоплении вирусного антигена в околоядерной зоне и на периферии цитоплазмы. Красное свечение подтверждает, что вирус мешотчатого расплода содержит РНК.

С 24 до 38-го часа отмечали присутствие в ядре и цитоплазме фибробластов своеобразных включений неправильной формы (размер 3—5 мк), светящихся красным цветом. Количество этих включений заметно возросло к 30—38 часам. К этому времени многие клетки частично разрушились или объединились в симпласты — гигантские многоядерные клетки, в цитоплазме которых находились вышеуказанные красные включения.

К 48—58 часам число флюоресцирующих красным цветом образований в цитоплазме клеток значительно уменьшилось вследствие некротизации и отслоения клеточного монослоя.

Применение непрямого метода иммунофлюоресценции (просмотрено 50 препаратов) показало, что через 4 часа после заражения монослоя у 30—40% просмотренных клеток в околоядерной зоне находились люминесцирующие желто-зеленые очаги, имевшие гранулярное строение. К шести часам число светящихся гранул возросло и одновременно увеличилась яркость их люминесценции, что можно объяснить увеличением абсолютного количества антигена. При этом светящиеся гранулы обнаруживались не только около ядра, но и на периферии цитоплазмы, которая к 9-му часу после заражения почти вся диффузно светилась.

Через 12 часов люминесцирующий материал занимал всю клетку. При этом у некоторых клеток наблюдалось ограниченное свечение цитоплазмы в виде кольца, окружающего ядро. Это можно объяснить своеобразным расположением вирусного антигена. Вирусный антиген обнаруживался не только в цитоплазме, но и в ядре клетки в период между 24 и 38 часами в виде светящихся гранул.

К 48—58 часам количество светящихся клеток в монослое заметно уменьшилось вследствие их некротизации.

Наши исследования вируса мешотчатого расплода в куриных и мышинных фибробластах по вышеописанной методике показали, что как в тех, так и других культурах клеток процесс репродукции протекал аналогично.

В контрольных препаратах (незараженные вирусом мешотчатого расплода куриные и мышинные фиброблас-

ты), исследованных параллельно методом флюорохромирования и непрямом методом иммунофлюоресценции, отклонений от нормы не наблюдали.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что использованная нами методика позволяет определить тип нуклеиновой кислоты и изучить динамику размножения вируса мешотчатого расплода в куриных и мышинных фибробластах.

## **В ы в о д ы**

1. Методом флюорохромирования подтверждена принадлежность вируса мешотчатого расплода к группе РНК-содержащих вирусов.

2. С помощью непрямого метода иммунофлюоресценции и метода флюорохромирования изучена динамика накопления и установлены места локализации вирусного антигена в мышинных и куриных фибробластах: в первые часы после заражения антиген накапливается в околоядерной зоне клетки, затем в виде светящихся гранул заполняет цитоплазму и проникает в ядро. Процесс размножения вируса в клетке продолжается 24—38 часов.

## **ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНОВ НА СОСТОЯНИЕ ПЧЕЛ И ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИХ И СЕРНОКИСЛОГО КОБАЛЬТА КАК СТИМУЛЯТОРОВ РАЗВИТИЯ ПЧЕЛИНЫХ СЕМЕЙ В ВЕСЕННЕ-ЛЕТНИЙ ПЕРИОД**

---

СМИРНОВА Н. И.,  
*доктор ветеринарных наук, профессор;*  
ПРУС П. М.,  
*зоотехник*

В литературе сообщается о положительном влиянии некоторых витаминов на жизнеспособность и устойчивость животных и человека к инфекционным болезням (М. В. Рево, М. Д. Жукова, 1958; Н. Е. Мозгов, 1961, 1969; В. М. Жданов, 1948). Некоторые данные об использовании витаминов в пчеловодстве приведены В. И. Полтевым и О. Ф. Гробовым (1970). Однако этот вопрос изучен недостаточно. Представляет интерес изу-