

УДК 619:578.835.1:636.4

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ЭНТЕРОВИРУСОВ СВИНЕЙ ПО МАРКЕРНОМУ ПРИЗНАКУ D**Демиденко И. Ф., Романенко В. Ф.**

Институт ветеринарной медицины НААН Украины, г. Киев

В статье приведены экспериментальные результаты последовательного клонирования коллекционных и прототипных к ним эпизоотических штаммов энтеровирусов свиней. Анализируются выявленные внутрштаммовые различия между полученными клонами.

The article deals with the results of experiments for sequential cloning of collection and their prototype epizootic strains of enteroviruses of swine. There is an analysis of intrastrain differences between derived clones.

Введение. В медицинской и ветеринарной практике энтеровирусные инфекции давно обращали на себя внимание ученых разных стран. После детального изучения, особенно после введения в практику вирусологических исследований культур тканей, стало возможным выделение цитопатогенных агентов и изучение их роли в развитии заболеваний.

Выделенные с проб фекалий людей на культуре клеток вирусы в 1955 г. объединены американским экспертным комитетом в группу вирусов *ECHO* (*Enteric Cytopathogenic Human Orphan*). Вирусы с идентичными энтеровирусными признаками выделены от разных видов животных, в том числе и свиней [1, 2].

Для всех энтеровирусов характерны следующие общие свойства:

- 1) небольшие размеры вирионов, кубическая симметрия типа икосаэдрона и способность образовывать внутри пораженных клеток кристаллы;
- 2) в центре вириона находится инфекционная рибонуклеиновая кислота, составляющая 20 – 30% вириона и окруженная белковыми субъединицами или капсомерами;
- 3) устойчивость к эфиру, зависящая от отсутствия в вирионе липоидов;
- 4) приобретение вирусом устойчивости к прогреванию при 50° в течении часа после обработки 1 М раствором хлористого магния или других солей двухвалентных катионов [3].

Весьма характерным для энтеровирусов является существование выраженных внутритиповых отличий. За данными М. К. Ворошиловой штаммы энтеровирусов людей одного и того же серотипа могут отличаться друг от друга по ряду маркирующих признаков (нп.: некоторые особенности поведения в культуре тканей, стойкость к физическим и химическим факторам, отличия антигенного строения и т.п.). А под внутритиповыми отличиями, припускаются, отличия между клонами, полученными с одного штамма. Такие отличия, выявляемые в культуре тканей, были установлены впервые Лединко и сотр., которые отметили различия в цитопатогенной активности двух иммунологически родственных штаммов. В 1956 г. Дюбес при изучении бляшкообразования у 13 штаммов полиовируса смог разделить их на три категории: 1) штаммы, вызывающие крупные бляшки, 2) мелкие бляшки и 3) бляшки средней величины [4, 5].

Метод бляшкообразования является одним из наиболее чувствительных и точных методов при работе с энтеровирусами. Он позволяет осуществить точный количественный подсчет инфекционных вирусных частиц, проводить первичную идентификацию энтеровирусов по форме, величине, динамике развития бляшек [6].

По данным литературы исследований энтеровирусов свиней в таком направлении не проводилось. В связи с этим, **нашей целью** было изучение внутритиповых отличий клонов энтеровирусов свиней как коллекционных, так и эпизоотических тех же серотипов за маркерных признаков *d*.

Материалы и методы. Исследования проводили согласно модифицированного метода Сюн и Мельника (1955 г.) и В. Ф. Романенко (1973). Клонирование энтеровирусов свиней проводили на культуре клеток СПЭВ. Для каждого последующего пассажа использовали отдельную бляшку соответствующего размера и формы [7].

Для исследований были отобраны такие коллекционные и эпизоотические штаммы (тех же серотипов) с соответствующей инфекционной активностью в культуре клеток СПЭВ, как *Conratice* (штамм с английской коллекцией) – ТЦД_{50/см³} 9,5, Перечинский-652 (вакцинный) – ТЦД_{50/см³} 8,5, 780 (2-й серотип), – ТЦД_{50/см³} 9,0, V13 (8-й серотип) – ТЦД_{50/см³} 8,75, эпизоотический 1-го серотипа – ТЦД_{50/см³} 8,0, 2-го серотипа – ТЦД_{50/см³} 8,5 и 8-го серотипа – ТЦД_{50/см³} 9,5.

Для этого проводили 10-кратные разведения вируса на буферном растворе и по 0,2 мл каждого его разведения вносили в три флаконы со сплошным монослоем клеток. После одночасового контакта вируса с клетками, монослой покрывали агаровой смесью. После застывания агарового покрытия флаконы инкубировали в термостате при температуре 37±0,5° семь дней с просмотром через каждые 24 часа.

Результаты исследований. Согласно данным первой таблицы, бляшки эпизоотических штаммов в основном появлялись через 72 – 96 часа после заражения, в отличие от бляшек коллекционных штаммов, которые появлялись через 48 – 72 часа. На 5 – 6 сутки исследования отмечали разрушение культуры ткани под агаровым покрытием, что способствовало слиянию бляшек.

Таблица 1 – **Время появления бляшек исследуемых серотипов энтеровирусов свиней**

Штамм энтеровирусов свиней	№ пассажа	Время появления бляшек, часы						
		24	48	72	96	120	144	168
<i>Conratice</i>	I				+	+	+	слияние
	V				+	+	+	слияние
Перечинский-642	I		+	+	+	слияние		
	V				+	+	+	слияние
Эпизоотический штамм 1-го	I			+	+	+	+	слияние

	V				+	+	+	слияние
T-80	I		+	+	+	слияние		
	V				+	+	+	слияние
Эпизоотический штамм 2-го серотипа	I			+	+	+	слияние	
	V				+	+	+	слияние
V13	I				+	+	+	слияние
	V					+	+	+
Эпизоотический штамм 8-го серотипа	I		+	+	+	+	слияние	
	V				+	+	+	слияние

В проведенных нами исследованиях бляшки коллекционных штаммов энтеровирусов свиней по сравнению с бляшками эпизоотических штаммов, были больше по размеру и имели четко ограниченный ровный край. По данным второй таблицы, размеры бляшек отличаются, как между штаммами разных серотипов, так и между штаммами одного и того же серотипа. С увеличением количества пассажей одного и того же клона с бляшки размер бляшек существенно не изменялся.

Таблица 2 – Размер бляшек и их морфологическая характеристика

Назва штамма	Размер бляшки I пассаж, d см	Размер бляшки, V пассаж, d см	Морфологическая характеристика бляшек
<i>Conratice</i>	0,1	0,5	Средние и большие, четко выраженные матовые, круглые бляшки с ровными краями
Перечинский-642	0,02	0,02	Однородные, четко выраженные матовые, кругле бляшки с ровными краями
Эпизоотический штамм 1-го серотипа	0,01	0,01	Однородные, четко выраженные блестящие, кругле бляшки с нечеткими краями
T-80	0,1	0,1	Однородные, четко выраженные матовые, кругле бляшки с ровными краями
Эпизоотический штамм 2-го серотипа	0,01	0,01	Однородные, четко выраженные блестящие, кругле бляшки с нечеткими краями
V13	0,02	0,02	Однородные, четко выраженные матовые, кругле бляшки с ровными краями
Эпизоотический штамм 8-го серотипа	0,3	0,01	Однородные, четко выраженные блестящие, кругле бляшки с нечеткими краями

ЦПД полученных клонов коллекционных штаммов энтеровирусов проявлялось через 24 – 48 часов после заражения возникновением мелких фокусов круглых клеток большинства штаммов, которые через 4 – 6 часов после этого превращались в очаги круглых клеток, охватывающих 50 – 70% всего монослоя. ЦПД полученных клонов эпизоотических штаммов возникало через 48 – 72 часа. При этом существенных отличий в характере ЦПД не отмечалось. Из третьей таблицы видно, что инфекционная активность штаммов коллекционных была выше, чем эпизоотических тех же серотипов, а также отмечается ее увеличение в процессе клонирования методом бляшек.

Таблица 3 – Инфекционная активность штаммов энтеровирусов свиней в культуре клеток СПЭВ до и после проведения клонирования методом бляшек

Название штамма	Время появления ЦПД до проведения бляшечных пассажей, часы	Титр до проведения бляшечных пассажей lg TCID ₅₀ /см	Время появления ЦПД первого бляшечного пассажа, часы	Титр первого бляшечного пассажа lg TCID ₅₀ /см	Время появления ЦПД пятого бляшечного пассажа, часы	Титр пятого бляшечного пассажа lg TCID ₅₀ /см
<i>Conratice</i>	24	9,5	24	9,5	48	9,75
Перечинский-652	48	9,5	48	9,5	48	9,75
Эпизоотический штамм 1-го серотипа	72	8,0	72	8,0	96	8,25
T80	24	9,0	24	9,25	48	9,5
Эпизоотический штамм 2-го серотипа	48	8,0	48	8,0	72	8,25
V13	48	8,75	48	8,75	72	9,0
Эпизоотический штамм 8-го серотипа	48	8,5	48	8,75	72	8,75

Таким образом, проведенные нами исследования свидетельствуют, что по маркерному признаку *d* (свойство образовывать мелкие бляшки), а также времени появления бляшек есть отличия как среди клонов штаммов разных серотипов, так и между штаммами одного и того же серотипа.

Заключение. Проведенные исследования свидетельствуют, что между клонами бляшек штаммов энтеровирусов свиней, как коллекционных, так и эпизоотических (тех же серотипов) есть отличия (нп.: маркер *d*), которые требуют детального изучения, для чего будет проведено дальнейшее исследование клонов этих штаммов по другим маркерным признакам.

Литература. 1. Поширення ентеровірусів свиней в умовах зони Полісся УРСР/ В. П. Романенко, В. Н. Опанасенко// Мікробіологічний журнал, 1972, №1, С. 121- 122. 2. Керованість інфекційним процесом при ентеровірусних хворобах свиней/ В. П. Романенко, В. Б. Білоштан, І. Ф. Соколянський, Л. М. Музикіна та ін.// Вет. Біотехнологія. – 2007. – № 10. – С. 188–195. 3. Wallis C., Melnick J. L. Virology, 1962, 16, 504. 4. Ворошилова М. К. Иммунология, эпидемиология и профилактика полиомиелита и сходных с ним заболеваний. – М.: Медицина, 1966. – 439 с. 5. Ворошилова М. К. Энтеровирусные инфекции человека. – М.: Медицина, 1979. – 360 с. 6. Гендон Ю. З. Генетика вирусов человека и животных. – М.: Наука, 1967. – 356 с. 7. Бляшкообразующие свойства энтеровирусов свиней// В. Ф. Романенко, О. Г. Прусс. Тезисы докладов Всесоюзной межвузовской научной конференции по вет. вирусологии.- М, 1973, ч. I, ст. 47-38.

УДК 619:616.98:578.824.11

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ

Ероховец Н.Ф.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского», г. Минск

Статья посвящена подбору оптимальных параметров культивирования вируса болезни Ауески свиней для максимального его накопления при промышленном производстве вакцины. Установлено, что наиболее подходящей культурой клеток для накопления вируса является ВНК-21, максимальный титр вируса при стационарном способе культивирования составлял $7,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ при множественности инфицирования - $0,01 - 0,1 \text{ТЦД}_{50}$, а при роллерном - $8,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Article is devoted to selection of optimum parameters of cultivation a virus of Aujeszky's disease for its maximum accumulation to vaccine industrial production. It is established that the most suitable cell culture for virus accumulation is ВНК-21, maximum virus title in stationary way cultivation is $7,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ in plurality infection - $0,01 - 0,1 \text{ТЦД}_{50}$, and in "spinner-culture" method - $8,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$

Введение. Массовое выращивание клеток в культуре является центральным звеном любого технологического процесса, основанного на использовании клеток животных, и в первую очередь производства противовирусных препаратов. Эта стадия определяет массу и количество клеток и тем самым в целом технологию получения вирусного сырья. Выбор способа культивирования вируса в значительной мере определяется способностью клеток размножаться на поверхности плотного субстрата или в суспензионной культуре.[3, 4, 5, 6]

При получении вакцин вирус выращивают в однослойных и суспензионных культурах различного происхождения. Суспензионные культуры постоянных линий клеток оказались весьма продуктивными для промышленного получения вирусного сырья. Вирус в этих системах накапливается в титре $10^8 - 10^9 \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ [1, 2].

Определяющим параметром для изготовления любого вакцинного препарата является способность вируса размножаться в чувствительной биологической модели с накоплением в максимальном титре. В связи с чем целью нашего исследования являлось отработка способа накопления вируса в перевиваемой культуре клеток с максимальным титром, определение множественности инфицирования ткани вируса [1, 2]

Материалы и методы. Для создания вакцины был использован выделенный нами штамм вируса. Выделение вируса проводили на перевиваемой клеточной линии ВНК-21. Культивирование проводили стационарным методом в 1,5 литровых матрацах. Вирус болезни Ауески инокулировали после удаления ростовой среды и трехкратного промывания монослоя раствором Хенкса. Контакт вируса с клетками осуществляли в течение 1 часа. Затем вносили по 150 см^3 поддерживающей питательной среды. Инкубирование инфицированных культур клеток проводили при $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Контролем служили матрасы с незараженными клетками. Учет результатов проводили, начиная с 17-го часа после заражения культуры клеток. При наличии цитопатического действия вируса для освобождения его из клеток матрасы замораживали при температуре минус 40°C и оттаивали при плюс 25°C . Исследованию подлежал вирусный материал после однократного замораживания-оттаивания вирусной суспензии, снятой через 1-2 суток после инокуляции вируса в культуру клеток.

После накопления вируса определяли его инфекционную активность титрацией на культуре клеток по стандартной методике.

Готовили десятикратные разведения вирусной суспензии на среде Игла MEM. Для получения разведения 10^{-1} , в стерильный флакон, содержащий $9,0 \text{ см}^3$ питательной среды вносили $1,0 \text{ см}^3$ пробы, тщательно перемешивали пипетированием. Затем 1 см^3 этого разведения вносили во второй флакон с 9 см^3 среды, тщательно перемешивали, затем из второго флакона брали 1 см^3 раствора и вносили в третий, содержащий 9 см^3 среды, и так далее, до восьмого флакона, получая последовательно разведения: $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$.

Культуру клеток ВНК-21 заражали каждым разведением вирусной суспензии (по четыре пробирки с культурой клеток для каждого разведения). Для этого, в каждую пробирку с монослоем культуры клеток ВНК-21 с помощью пипетки стерильно вносили по $0,2 \text{ см}^3$ каждого разведения ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$)