



УДК 578.823.2:57.083.224

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА КАТАРАЛЬНОЙ ЛИХОРАДКИ ОВЕЦ

*Д.С. Таранов, Е.О. Абдураимов, С.М. Мамадалиев, К.Д. Жугунисов,
З.Д. Ершебулов*

taranov_ds@mail.ru

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности
КН МОН РК, пгт. Гвардейский, Казахстан

В данной статье представлены результаты исследований по определению оптимальных параметров культивирования штамма «Хуросон-07/4» вируса катаральной лихорадки овец. Максимальная репродукция вируса КЛЮ отмечалась на культурах клеток ВНК-21, VERO и ПС. Установлены оптимальные параметры культивирования: множественность заражения 0,01-0,1 ТЦД₅₀/кл, 2%-ное содержание сыворотки КРС в поддерживающей питательной среде, температура инкубирования (37,0±0,5)°С, срок инкубирования 72 часа.

Введение

Наиболее значительный экономический ущерб эпизоотии катаральной лихорадки овец (КЛЮ) наносят при возникновении болезни среди овец или некоторых видов диких жвачных животных. Единственным способом предотвратить дальнейшее распространение инфекции является вакцинация восприимчивых животных вакциной [1]. Для производства инактивированной вакцины требуется значительное количество вирусного сырья, которое может быть получено при выборе чувствительной культуры клеток, а также отработанных параметров культивирования вируса.

Научные исследования в сфере разработки технологии изготовления препаратов при КЛЮ являются актуальной проблемой для Республики Казахстан. По данным мониторинговых исследований английских ученых, проводимых в рамках международной программы 1996-1998 гг. на территории Республики Казахстан, были выявлены антитела к вирусу КЛЮ в Актюбинской, Карагандинской, Южно-Казахстанской, Жамбылской и Алматинской областях. В результате было выявлено серопозитивных образцов сывороток крови 23,2% среди домашнего скота, в сыворотках крови от ди-

ких животных (сайгака) серопозитивных проб не оказалось [2].

Одним из важных этапов в приготовлении вакцин при вирусных инфекциях является культивирование возбудителя с целью наработки вирусосодержащих суспензий для изготовления профилактических средств. На сегодняшний день в литературных источниках достаточно подробно освещены вопросы культивирования вируса блютанга в различных биологических системах, в том числе в клеточных [3, 4]. Так, вирус КЛЮ успешно культивируется в перевиваемых культурах клеток ПСГК, Hela, MB-2 и ВНК-21 [5, 6]. Несмотря на это, изучение культуральных свойств и оптимизация условий культивирования новых штаммов вируса катаральной лихорадки, выделенных из очага эпизоотий, актуально в том плане, что полученные результаты дадут возможность в дальнейшем разработать эффективные профилактические и диагностические препараты.

Данная работа посвящена определению оптимальных условий культивирования вируса КЛЮ в первичных и перевиваемых клеточных линиях с целью получения высокоактивного вирусосодержащего материала, используемого при разработке технологии изготовления диагностических и профилактических средств.



Материалы и методы

В экспериментах использовали штамм «Хуросон-07/4» 4-го серотипа вируса КЛЮ, выделенного в Республике Таджикистан [7]. В качестве системы культивирования использовали первично-трипсинизированную культуру клеток почки ягнят (ПЯ) и перевиваемые линии культуры клеток почки сирийского хомячка (ВНК-21), почки сайги (ПС), почки овцы (ПО), почки африканской зеленой мартышки (VERO), клон культуры МА-104, полученной из почки мартышки (MARK-145), и почки сибирского горного козерога (ПСГК). В каждой культуре клеток проведено по 3 пассажа.

При определении оптимальных параметров культивирования использовали следующие условия: множественность заражения (0,001, 0,01, 0,1, 1,0 ТЦД₅₀/кл), содержание сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС) в поддерживающей питательной среде (0,5, 1,0, 2,0)%, температура инкубирования (33, 35, 37)°С, срок инкубирования 72-96 часов.

Биологическую активность вируса определяли по цитопатическому действию (ЦПД) в пробирочной культуре клеток ПС. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча в модификации Ашмарина и выражали в lg ТЦД₅₀/см³.

Результаты и обсуждения

Выбор клеточных субстратов при проведении наших исследований обуславливался видовой принадлежностью клеток, а также технологичностью клеточных систем.

При одинаковых стандартных условиях культивирования в испытуемых клеточных культурах вирус КЛЮ накапливался в пределах 4,87-7,00 lg ТЦД₅₀/см³. Увеличение пассажного уровня вируса вызвало незначительное повышение в накоплении вируса во всех клеточных культурах, составляющее 0,25÷0,82 lg ТЦД₅₀/см³. Суммированные результаты экспериментов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Уровень накопления штамма «Хуросон-07/4» вируса КЛЮ в клеточных культурах

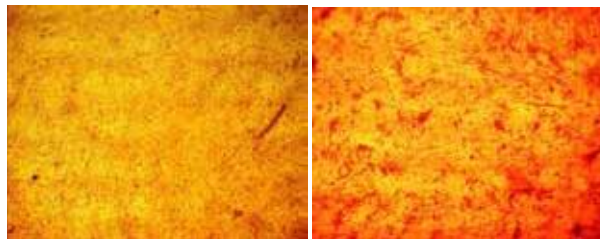
Культура клеток	Биологическая активность вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (X±m), n=3		
	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж
ПСГК	5,00±0,14	5,12±0,12	5,25±0,25
MARK-145	4,87±0,12	4,75±0,25	5,12±0,12
ВНК-21	6,91±0,22	7,12±0,23	7,50±0,19
ПО	4,62±0,20	5,00±0,25	5,37±0,12
Vero	7,00±0,12	7,62±0,12	7,62±0,37
ПЯ	5,87±0,16	6,75±0,00	н/и
ПС	6,75±0,00	6,87±0,14	7,00±0,13
Примечание: н/и - не исследовали			

Наибольшее накопление вируса КЛЮ отмечали в культурах клеток: VERO и ПС, культура клеток ВНК-21 была взята в виде контроля при определении спектра чувствительных к вирусу КЛЮ клеточных культур. Биологическая активность вируса на третьем пассажном уровне в указанных клеточных линиях составила 7,62±0,37, 7,00±0,13 и 7,50±0,19, соответственно. Цитопатическое проявление вируса в культурах клеток представлено на рисунках 1, 2, 3. В культурах клеток ПСГК, MARK-145, ПО и ПЯ вирус накапливался в пределах 5,12÷6,75 lg ТЦД₅₀/см³.



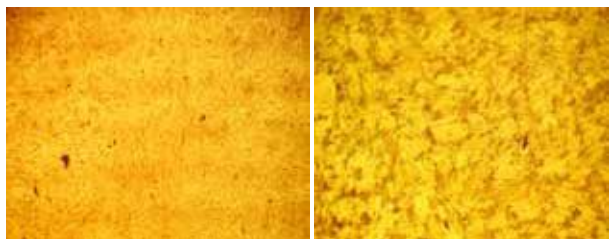
Контроль Проявление ЦПД вируса

Рис. 1. Репродукция вируса КЛЮ в культуре клеток ВНК-21 (ув.х600)



Контроль Проявление ЦПД вируса

Рис. 2. Репродукция вируса КЛЮ в культуре клеток VERO (ув.х600)



Контроль Проявление ЦПД вируса

Рис. 3. Репродукция вируса КЛО в культуре клеток ПС (ув.х600)

С учетом полученных результатов для дальнейших исследований по оптимизации параметров культивирования штамма «Хуросон-07/4» 4-го серотипа вируса КЛО использовались культуры клеток Vero, ПС и ВНК-21.

В следующей серии опытов выясняли влияние концентрации сыворотки крови КРС в поддерживающей среде на уровень накопления вируса. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2

Изучение влияния содержания сыворотки крови КРС в поддерживающей среде на уровень накопления вируса КЛО в культурах клеток

Культура клеток	Уровень накопления вируса в зависимости от содержания сыворотки крови КРС в поддерживающей среде, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (X±m), n=3			
	0,5%	1,0%	2,0%	без сыворотки
ВНК-21	7,12±0,25	7,25±0,13	7,50±0,08	6,87±0,16
Vero	6,87±0,22	7,08±0,10	7,37±0,19	6,62±0,20
ПС	7,00±0,12	7,50±0,25	7,66±0,18	6,75±0,22

При культивировании вируса в монослое клеток ВНК-21, Vero и ПС максимальное накопление вируса 7,37÷7,66 отмечено в среде, содержащей 2,0% сыворотки крови КРС. При использовании среды с 0,5, 1,0% сывороткой и без сыворотки уровень биологической активности в испытуемых культурах клеток был незначительно ниже.

Далее были проведены исследования по определению влияния температуры культивирования на уровень накопления вируса КЛО в культурах клеток. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3

Влияния температуры культивирования на накопление штамма «Хуросон-07/4» вируса катаральной лихорадки овец

Культура клеток	Уровень накопления вируса при различных температурах культивирования, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (X±m), n=3		
	33°C	35°C	37°C
ВНК-21	7,25±0,12	7,00±0,18	7,25±0,00
Vero	6,75±0,14	6,50±0,25	6,66±0,16
ПС	7,00±0,20	7,12±0,08	7,25±0,22

Исследования показали, что температура инкубирования не оказывает существенного влияния на уровень накопления вируса в использованных культурах клеток. Однако при понижении температуры увеличивается срок культивирования.

В следующей серии опытов выясняли репродукцию вируса в зависимости от инфицирующей дозы и продолжительности культивирования. Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4

Определение оптимальной заражающей дозы штамма «Хуросон-07/4» и срока инкубирования в культурах клеток

МИД ТЦД ₅₀ /кл	Уровень накопления вируса в зависимости от длительности инкубирования и множественности заражения, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (X±m), n=3					
	ПС		ВНК-21		Vero	
	72 час	96 час	72 час	96 час	72 час	96 час
0,001	6,91±0,08	6,25±0,13	6,87±0,12	6,50±0,15	6,37±0,12	6,00±0,00
0,01	7,25±0,13	6,87±0,20	7,08±0,22	6,65±0,09	6,66±0,16	6,50±0,19
0,1	7,00±0,14	6,87±0,02	6,75±0,22	6,75±0,12	6,00±0,10	5,75±0,12
1,0	6,50±0,25	6,00±0,16	6,50±0,18	6,25±0,18	5,87±0,11	5,12±0,14

Проведенные исследования показали, что вирус КЛО в наибольших титрах накапливается в культурах клеток ПС, ВНК-21

и Vero на 72 час инкубирования, при увеличении длительности инкубирования до 96 часов происходит снижение титра вируса



при всех испытанных дозах. В указанных культурах клеток вирус накапливается примерно в одинаковых титрах при заражении от 0,01 до 0,1 ТЦД₅₀/кл, повышение дозы до 1,0 ТЦД₅₀/кл приводит к некоторому снижению титра вируса. Уменьшение дозы заражения до 0,001 ТЦД₅₀/кл приводило к снижению титра вируса и увеличению сроков наступления деструкции монослоя.

Результаты проведенных нами исследований согласуются с данными литературного источника [7] по выбору чувствительной культуры клеток к вирусу КЛЮ.

Выводы

В результате проведенных исследований определены клеточные субстраты (ПС,

ВНК-21 и Vero), а также установлены оптимальные параметры культивирования штамма «Хуросон-07/4» 4-го серотипа вируса КЛЮ (доза заражения от 0,01 до 0,1 ТЦД₅₀/кл, содержание сыворотки крови КРС - 2% в поддерживающей питательной среде, инкубирование при температуре 37°C в течение 72 час), позволяющие получать вирусосодержащую суспензию с биологической активностью $7,00 \div 7,62 \text{ lgTCID}_{50}/\text{cm}^3$. Установленные параметры культивирования позволяют использовать штамм вируса КЛЮ и указанные клеточные линии при наработке высокоактивного вирусосодержащего материала, пригодного для изготовления диагностических и профилактических препаратов.

Литература

1. Стрижаков А.А. Разработка альтернативных методов серотипирования изолятов вируса блютанга // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных. – Покров, 2000. – С. 148-150.
2. M. Lundervold, E.J. Milner-Gulland, C.J. O'Callaghan, C. Hamblin, A. // Corteyn⁴ and A.P. Macmillan⁵ A Serological Survey of Ruminant Livestock in Kazakhstan During Post-Soviet Transitions in Farming and Disease Control Actavet. scand. 2004, 45, 211-224.
3. Calistri P., Goffredo M., Caporale V. The distribution of *Culicoides imicola* in Italy. Application and evaluation of current Mediterranean models based on climate // J.Vet.B. 2003, 40, 132-138.
4. Балышева В.И., Сливко В.В., Жестерев В.И. Культивирование вируса блютанга в культурах клеток животных // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2002. - №6. - С. 46-48.
5. Балышева В.И., Недосекова В.В., Чурбанова Г.Н., Жестерев В.И., Топская Р.А. Некоторые аспекты культивирования вируса блютанга в различных культуральных системах // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных. – Покров, 2000. – С. 179-181.
6. M.A. Ramakrishnan, A.B. Pandey, K.P. Singh, R. Singh & M.L. Mehrotra. Immune response and protective efficacy in sheep immunised with hydroxylamine-inactivated bluetongue virus vaccine // Veterinaria Italiana, 2005. 41 (3), 149-155.
7. Абдураимов Е.О., Кошеметов Ж.К., Ершебулов З.Д., Нурабаев С.Ш. Изучение культуральных свойств вируса катаральной лихорадки овец, выделенного в Республике Таджикистан // Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития. – Алматы, 2008. - С. 34-36.

Түйін

Бұл мақалада қойдың инфекциялы катаралды қызбасы вирусының «Хуросон-07/4» штаммын өсірудің қолайлы параметрлерін анықтау бойынша нәтижелер келтірілген. Вирустың репродукциясы ВНК-21, VERO және ПС жасуша өсінділерінде жоғары болды. Вирусты өсірудің оңтайлы параметрлері: жұқтыру дозасы 0,01-0,1 ТЦД₅₀/т, қоректік ортадағы ірі қара мал қан сарысуы көрсеткіші 2%, температурасы (37,0±0,5)°C, өсіру мерзімі 72 сағат болды.

Summary

The article presents the results of the study of determination of optimal cultivation parameters bluetongue virus Khuroson 07/4 strain. Maximal reproduction of bluetongue virus was registered in BHK-21, VERO and PS (dog kidney) cell cultures. Optimal cultivation parameters are the following. Infection multiplicity is 0.01 – 0,1 TCD₅₀/cell. Supportive medium should contain 2% bovine serum. Incubation temperature is (37,0±0,5)°C. Incubation time is 72 hours.