

*Аманова Ж.Т., Ершебулов З.Д., Жугунисов К.Д., Таранов Д.С.,
Саметова Ж.Ж., Булатов Е.А., Умралина А.Р., Абдураимов Е.О.*

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА
«ХУРОСОН-07/4» ВИРУСА КАТАРАЛЬНОЙ ЛИХОРАДКИ ОВЕЦ**

*Zh.T. Amanova., Z.D. Ershebulov., K.D Zhugunisov., D.S Taranov.,
Zh.Zh. Sametova, E.A. Bulatov., A.R. Umralina, E.O. Abduraimov*

**COMPARATIVE STUDY OF METHODS CULTIVATION STRAIN
«HUROSON-07/4» BLUETONGUE VIRUS**

УДК: 578.823.2.57.083.224

В статье приведены результаты сравнительного исследования методов культивирования (роллерный, стационарный) штамма "Хуросон-07/4" вируса катаральной лихорадки овец (КЛО) для наработки активной вирусной биомассы.

The article presents the results of a comparative study of methods of cultivation (a roller, stationary) strain "Huroson-07/4" bluetongue virus (BTV) for production of active viral biomass.

Введение

Блютанг ("синий язык" КЛО) - вирусная трансмиссивная инфекция, характеризующаяся лихорадочным состоянием, воспалительно-некротическими поражениями ротовой полости, особенно языка, пищеварительного тракта, эпителия венчика и основы кожи копыт, а также дистрофией, изменениями скелетной мускулатуры [1, 2]. Возбудителем болезни является – РНК-содержащий вирус, принадлежащий к роду Orbivirus, семейства Reoviridae по определению Международного Эпизоотического Бюро (МЭБ), отнесен к группе болезней животных разных видов [3, 4].

Из литературных источников известно, что первое сообщение о заболевании овец с симптомами КЛО описано в Южной Африке в 1876 г.

Анализ эпизоотической ситуации по КЛО в мире за последние годы [5, 6, 7] свидетельствует о том, что ареал инфекции постоянно расширяется. По данным МЭБ, КЛО в 2012-2014 годах регистрировали в Греции, Италии, Испании, Люксембург, Тунисе, Португалии, ПАТи России [8, 9].

В борьбе с КЛО, наряду с комплексом общих ветеринарных мероприятий особое значение имеет, специфическая профилактика, которая осуществляется с помощью вакцин [10].

При изготовлении профилактических препаратов вирусной природы, несомненно, важную роль занимают культуры клеток, так как клеточные культуры являются одним из основных субстратов для выращивания вирусов, а также, позволяет быстро и эффективно нарастить вирусную биомассу для производства вакцин [11].

Однако нельзя не принимать во внимание и тот факт, что успехи в культивировании клеток и применение клеточных культур в различных областях вирусологии возможны лишь при наличии современной первоклассной техники [12, 13].

Как известно, для изготовления эффективных профилактических препаратов, при их разработке особое значение имеет не только правильно подобранные оптимальные условия, но и методы культивирования вируса. С этой целью нами проведены исследования по сравнительному изучению методов культивирования штамма "Хуросон-07/4" вируса КЛО для наработки активной вирусной биомассы.

Материалы и методы

Для сравнительного изучения методов культивирования штамма "Хуросон-07/4" вируса КЛО, проводили наработку вирусной суспензии стационарным и роллерным методом культивирования в культуре клеток почки сайги (ПС) при инфицирующей дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл. В качестве поддерживающей питательной среды использовали среду полусинтетическую пристеночную среду (ПСП) с содержанием 2 %-ной сыворотки крови крупного рогатого скота, предварительно инактивированной при 56 °С в течение 30 мин.

Роллерное культивирование проводили в 3,0 л круговых сосудах на аппарате «Технолог» при скорости вращения 12 об/час. Инкубирование сосудов с инфицированной культурой клеток проводили при температуре (37 ± 1) °С.

При стационарном методе, культивирование вируса в культуре клеток проводили в матрасах объемом 1,5 л в термостатах в течение 72-76 ч без смены поддерживающей среды.

Репродукцию вируса контролировали ежедневным визуальным осмотром при помощи светового микроскопа по проявлению характерного цитопатического действия. Сбор вирусной суспензии проводили при поражении клеточного монослоя на 85-90%.

Результаты и обсуждение

Проведено сравнительное исследование методов культивирования штамма "Хуросон-07/4" вируса КЛО для наработки активной вирусной биомассы. Для этого, с использованием ранее отработанных параметров культивирования в культуре клеток ПС, были наработаны вирусосодержащие суспензии штамма "Хуросон-07/4" вируса КЛО, роллерным и стационарным методами. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1

Наработка вирусной биомассы штамма «Хуросон-07/4» в культуре клеток ПС стационарным методом

Метод культивирования	Пассаж/Время инкубирования, час	Доза заражения, ТЦД ₅₀ /кл	Температура инкубирования, °С	Биологическая активность, lg ТЦД ₅₀ /мл
Стационарный	1/72	0,01	37 ± 0,5	6,50 ± 0,14
	2/76			6,75 ± 0,12
	3/72			7,00 ± 0,08

В результате проведенных исследований установлено, что при культивировании вируса КЛЮ в культуре клеток ПС стационарным методом начиная с 40 час после заражения в монослое культуры клеток, отмечались хорошо выраженные характерные цитопатические изменения. Которые характеризовались разрежением межклеточного вещества, округлением клеток, отделением их от стекла, с последующим дезагрегацией клеточного монослоя и разрушением клеточных оболочек.

Как видно из данных таблицы 1, максимальный рост инфекционного титра вируса 7,25 ± 0,12 lg ТЦД₅₀/мл, отмечался на третьем пассажном уровне. При этом срок культивирования вируса составил 72 час.

Таблица 2

Наработка вирусной биомассы штамма «Хуросон-07/4» в культуре клеток ПС роллерным методом

Метод культивирования	Пассаж/Время инкубирования, час	Доза заражения, ТЦД ₅₀ /кл	Температура инкубирования, °С	Биологическая активность, lg ТЦД ₅₀ /мл
Роллерный	1/72	0,01	37 ± 0,5	7,12 ± 0,08
	2/72			7,25 ± 0,22
	3/72			7,50 ± 0,12

При культивировании и наработке роллерным методом вируса КЛЮ штамма «Хуросон-07/4», начиная с 48 час после инфицирования, наблюдались первые, видимые при микроскопировании признаки цитопатических изменений клеток, и на 72 час культивирования обнаруживалось практически полное разрушение монослоя, 70-80% клеток.

В результате проведенных исследований при роллерном культивировании вируса КЛЮ в культуре клеток ПС на 72 час инкубирования отмечается высокое накопление вируса, титры которого достигают 7,50 ± 0,12 lg ТЦД₅₀/мл.

Таким образом, из данных, представленных в таблице 1 и 2 видно, что в ходе проведенных исследований с использованием ранее отработанных параметров культивирования, были наработаны вирусные биомассы штамма "Хуросон-07/4" в культуре клеток ПС роллерным и стационарным методами, с высокой биологической активностью.

Выводы

На основании полученных результатов по сравнительному изучению методов культивирования штамма "Хуросон-07/4" вируса КЛЮ можно сделать вывод, что вышеизложенные методы культивирования позволяют наработать вирусную суспензию с высокой биологической активностью. При этом используя роллерный метод, можно получить вирусный материал активнее стационарного не менее чем на 0,50 lg ТЦД₅₀/мл, которое имеет большое значение при изготовлении профилактических препаратов против вируса КЛЮ.

Литература

1. Сюрин В.Н., Фомина Н.В. Вирус инфекционной катаральной лихорадки овец. // В кн.: Частная ветеринарная вирусология, М., 1979. С. 174-81.
2. Лактионов А.М. Вирус катаральной лихорадки овец. В кн.: Руководство по ветеринарной вирусологии. - М., 1966, С. 482 - 486.
3. Кодекс здоровья наземных животных МЭБ, Том 1, Двадцать первое издание, 2012 г. С.11
4. Murthy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. et. al. (1995). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. // Arch. Virol. -Suppl. 10.
5. Кошематов Ж.К. Койдың катаралды безгегі вирусынын ферменттерге, органикалык жэне майлык ерітінділерге төзімділігі. // «Вестник СГУ им. Шакарима» - 2010. №1 С. 11-15.
6. Ажибаев А.Ж., Кошематов Ж.К., Мамадалиев С.М., Нурабаев С.Ш., Бурабаев А.А., Абдураимов Е.О., Жугунисов К.Д. Применение различных адъювантов для получения антивидовой (антиовечьей) сыворотки. // Вестник Кыргызского научно-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ имени Арстанбека Дуйшеева (КыргНИИЖВиП). №3, 2010. Бишкек. С. 38-40.
7. Кошематов Ж.К., Матвеева В.М., Нурабаев С.Ш., Сансызбай А.Р., Сандыбаев Н.Т., Хайруллин Б.М., Кондыбаева Ж.Б., Корягина М.И. Оптимизация условий постановки непрямого варианта иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу катаральной лихорадки овец. Астана Биотехнология-2011. С. 145.
8. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI.
9. Бакулов И.А., Котляров В.М. Мировая эпизоотическая ситуация по болезням диких животных // Материалы междунац.-практ. Конф. 16-18 апр. 2002 г., г. Покров. С. 34-38.
10. Хлыбова Т.В. Экспериментальные исследования по разработке метода приготовления инактивированной вакцины против КЛЮ // автореф. Канд. Вет. Наук: - Гвардейский. - 1974. С. 84.
11. Хапчаев Ю.Х., Клеблеева Т.Д., Попова В.Д. и др. Культивирование клеток линии Vero и вакцинных штаммов вируса полиомиелита (штаммы А, Сэбина) в условиях псевдосуспензии в полупромышленном биореакторе // Журнал Биотехнология. 1999. №6. С.45-50.
12. Animal tissue culture advances in technique. Edited by Gerald D. Wasley – London Butterworths. 1972.
13. Культуры клеток биореакторы (часть 1) // Распечатано из Веб.сайта www.fermenter.ru/content/page_175_0.html 05.04.2006.

Рецензент: к.б.н. Бейшеналиева С.