

*Ершебулов З.Д., Абдураимов Е.О., Шаршеналиева Г.А.*

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА  
«КАЗАХСТАНСКИЙ» ВИРУСА ОСПЫ КОЗ**

*Ershebulov Z.D., Abduraimov E.O., Sharshenalieva G.A.*

**DETERMINATION PARAMETERS OF CULTIVATION OF STRAIN  
"KAZAKHSTAN" GOATPOX VIRUS**

УДК: 578.831.22.224.28.13

*В данной статье представлены результаты исследований по определению оптимальных параметров культивирования штамма «Казахстанский» вируса оспы коз.*

*This article presents the results of studies to determine the optimal parameters of strain cultivation "Kazakhstan" goatpox virus.*

**Введение**

Оспа коз – остро протекающая контагиозная болезнь коз, характеризующаяся образованием специфической папулезно-пустулезной сыпи (экзантемы) на коже и слизистых оболочках. По классификации кодекса здоровья наземных животных, заболевание относится к группе опасных вирусных болезней овец и коз [1, 2].

Согласно литературным данным вирус репродуцируется в культуре клеток почек и тестикул козлят, ягнят и телят, вызывая ЦПД, проявляющиеся округлением и сучиванием клеток, увеличением гранулярности цитоплазмы, и появлением фельген-положительных цитоплазматических включений [1, 3, 4].

Целью наших исследований являлось изучение культуральных свойств штамма «Казахстанский» вируса оспы коз (ВОК) на различных культурах клеток и отработать оптимальные условия культивирования на выбранной системе для наработки высокоактивной вирусосодержащей суспензии.

**Материалы и методы**

В исследованиях использовали штамм «Казахстанский» ВОК. В качестве системы культивирования использовали первично-трипсинизированные культуры клеток почки ягнят (ПЯ) и фибробласты куриных эмбрионов (КФ). Перевиваемые линии культуры клеток почки африканской зеленой мартишки (Vero), почки собак (МДСК), почки молодого бычка (МДВК), почки сирийского хомячка (ВНК-21), почки эмбриона свиней (СПЭВ), гонады козы (КГ-91), почки сайги (ПС), почки сирийского горного козерога (ПСГК) и почки поросенка (РК-15).

Монослой культуры клеток инфицировали в дозе 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл и инкубировали при температуре (37,0±0,5)°С в течение 4-6 сут в зависимости от цели исследований и проявления ЦПД.

В качестве питательной среды использовали полусинтетическую пристеночную среду (ПСП), среду Игла МЕМ и полусинтетическую среду (ПСС) с содержанием 2% инактивированной сыворотки КРС. Смену среды проводили через каждые 2 сут. Биологическую активность полученных материалов

определяли путем титрования в соответствующих культурах, титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [5].

**Результаты и обсуждение**

Анализируя литературные данные по чувствительности культур клеток к ВОК, нами были испытаны 13 видов культур клеток для штамма «Казахстанский» ВОК.

При этом чувствительность культур клеток определяли по проявлению ЦПД вируса в монослое клеток, а при его отсутствии проводили слепые пассажи на этой же линии культуры клеток с последующим определением их биологической активности. Результаты проведенных работ представлены в таблице 1.

*Таблица 1*

**Чувствительность культур клеток к штамму «Казахстанский» ВОК**

Культура клеток	Титр вируса lg ТЦД <sub>50</sub> /мл в культуре клеток ПЯ, (X±m)		
	1-пассаж	2-пассаж	3-пассаж
ПЯ	2,91±0,08	5,41±0,08	6,58±0,12
КФ	0,00	0,00	0,00
КГ-91	4,16±0,08	6,33±0,08	7,00±0,08
Vero	0,00	0,00	0,00
ВНК-21	0,00	0,00	0,00
СПЭВ	0,00	0,00	0,00
МДВК	0,00	0,00	0,00
МДСК	0,00	0,00	0,00
РК-15	0,00	0,00	0,00
ПО	0,00	0,00	0,00
ПТ-80	0,00	0,00	0,00
ПС	3,33±0,16	4,16±0,08	6,50±0,12
ПСГК	3,75±0,00	0,00	0,00

Из данных таблицы 1 видно, что из 13 испытанных видов культур клеток наиболее чувствительными к штамму «Казахстанский» оказалось перевиваемые линии клеток КГ-91 и ПС, кроме того высокую чувствительность к вирусу проявила также первично-трипсинизированная культура клеток ПЯ. ЦПД вируса проявляется в виде блестящих светопреломляющих клеток округлой формы (рисунок 1, 2, 3). Вирус накапливается в культуре клеток КГ-91 в титрах 4,16 ÷ 7,00lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, в культуре ПС по мере пассирования отмечена адаптация вируса к данной культуре с повышением биологической активности, при этом титры вируса

составили  $3,33 \div 6,50 \lg$  ТЦД<sub>50</sub>/мл. В культуре ПЯ вирус накапливался в титрах  $2,91 \div 6,58 \lg$  ТЦД<sub>50</sub>/мл. В остальных испытанных культурах клеток репродукция вируса не обнаружена. Культуры

клеток ВНК-21, Vero, СПЭВ, СПЭВ, МДВК, МДСК, ПО, ПТ-80, РК-15, ПСГК и КФ оказались не чувствительными к ВОК.



Контроль



ЦПД вируса оспы коз

**Рисунок 1**- Световая микроскопия культуры клеток ПЯ (ув.х600)

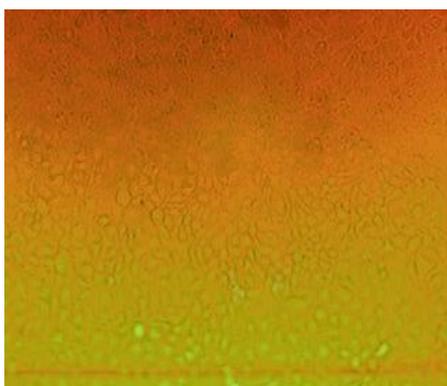


Контроль



ЦПД вируса оспы коз

**Рисунок 2** - Световая микроскопия культуры клеток КГ-91(ув.х600)



Контроль



ЦПД вируса оспы коз

**Рисунок 3**- Световая микроскопия культуры клеток ПС(ув.х600)

С учетом полученных результатов для дальнейших исследований по оптимизации параметров культивирования штамма «Казахстанский» ВОК использовали культуру клеток КГ-91.

Накопление вируса в значительной мере зависит не только от вида используемого клеточного субстрата, степени его чувствительности к данному вирусу и состояния клеточного монослоя, но и от

состава поддерживающей среды, в частности, от содержания в среде сыворотки крови животных и других компонентов [6-8].

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

Таблица 2

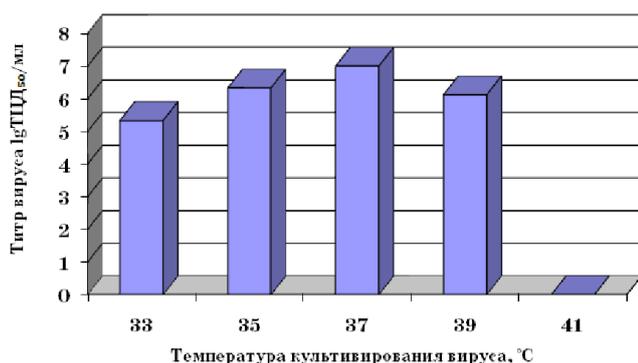
**Влияние сыворотки крови в питательной среде на уровень накопления штамма «Казахстанский» ВОК**

Содержание сыворотки крови в питательной среде, (%)	Активность вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /мл, (X±m)		Срок культивирования вируса, сут
	Нативная	Инактивированная	
без сыворотки	5,25±0,20	5,83±0,22	7
2	6,50±0,16	6,58±0,16	4
5	6,50±0,23	6,83±0,15	3
10	5,75±0,15	6,00±0,17	4

Данные таблицы 2 свидетельствуют, что при использовании в питательной среде нативной и инактивированной сыворотки в концентрациях 2% и 5 % накопление вируса не имело значимого уровня различия. При отсутствии сыворотки и при содержании 10 % в обоих случаях, уровень накопления вируса был ниже.

Исходя из результатов этих опытов, в последующей работе использовали питательную среду ПСП с содержанием инактивированной сыворотки КРС в 2 %-ной концентрации.

Далее были проведены исследования по определению влияния температуры культивирования на уровень накопления ВОК в культуре клеток КГ-91. Результаты проведенных исследований представлены на рисунке 4.



**Рисунок 4** –Динамика накопления штамма «Казахстанский» в культуре клеток от температуры инкубирования

Из рисунка 4 видно, что оптимальной температурой инкубирования является (37,0 ± 0,5) °С. Накопление вируса при других испытанных температурах инкубирования значительно ниже, а при температуре 41°С репродукцию вируса не обна-

ружили, так как культура клеток быстро отслаивалась от поверхности стенки сосуда и рН среды быстро сдвигалась в щелочную сторону.

Уровень накопления вирусов в культурах клеток, выращенных в различных культуральных сосудах, может значительно различаться, вероятно это зависит от химического состава стенок сосудов, соотношения воздушной и жидкой фаз и других особенностей их технико-эксплуатационных характеристик [9-11].

В связи с вышеизложенным, нами изучена зависимость накопления ВОК штамма "Казахстанский" в культуре клеток КГ-91, выращенной в различных культуральных сосудах: 0,5, 1,0, 1,5 литровых матрасах и в 3,0 литровых (с шероховатой и гладкой внутренней поверхностью) круговых флаконах. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 5

**Накопление ВОК в разных культуральных сосудах**

Типы и виды сосудов	Технико-эксплуатационная характеристика			T <sub>итр</sub> вируса lg ТЦД <sub>50</sub> /мл, (X±m)
	Способ культивирования	Общий объём сосуда, л	Объём поддерживающей среды в сосуде, мл	
Матрас	Стационарный	0,5	50-60	6,08±0,04
Матрас	Стационарный	1,0	100-110	6,83±0,12
Матрас	Стационарный	1,5	150-170	6,12±0,04
Флакон (шероховатостенный)	Роллерный	3,0	300	6,08±0,12
Флакон (гладкостенный)	Роллерный	3,0	300	6,00±0,00

Как видно из данных таблицы 3 вирус накапливается примерно в одинаковой степени как при использовании сосудов меньшего объема (0,5, 1,0, 1,5 л), так и при использовании сосудов большего объема (3,0 л), независимо от объёма культурального сосуда и способа выращивания.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о том, что для получения сравнительно больших объемов вирусосодержащего материала с достаточно высокой биологической активностью можно использовать как 1,5 л сосуды для стационарного и 3,0 л сосуды для роллерного способа культивирования.

**Выводы**

В результате проведенных исследований определены клеточные субстраты (ПС, КГ-91и ПЯ), а также установлены оптимальные параметры культивирования штамма «Казахстанский» ВОК

позволяющие получать вирусосодержащую суспензию с высокой биологической активностью. Установленные параметры культивирования позволяют использовать штамм ВОК и указанные клеточные линии при наработке высокоактивного вирусосодержащего материала, пригодного для изготовления диагностических и профилактических препаратов.

**Литература:**

1. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных // М. ВНИТИБП 1998. С. 27
2. Кодекс здоровья наземных животных МЭБ, Том 1, Двадцать первое издание, 2012 г. -С.11
3. Сюрин В.Н. и др. Лабораторная диагностика вирусных болезней животных. М.: Колос, 1992, -С. 181-183.
4. Зиновьева М.С., Хлебопашникова С.В., Ковалишина Н.И. Патогенность и иммуногенность вируса оспы овец и оспы коз на гетеровидных животных. //Ветеринарная медицина. – Харьков, 2002, вып. 80.
5. Reed, L.J.; Muench, H. (1938). "A simple method of estimating fifty percent endpoints". The American Journal of Hygiene 27: -P. 493–497.
6. Кореба О.А. Биологические свойства штаммов вируса оспы овец //Дисс. на соиск.степ.канд. Биол. наук. пгт. Гвардейский. 1984.
7. Сейткасымов Б.К., Курченко Ф.П.и др Изучение влияние различных факторов на накопление штамма "НИСХИ"вируса оспы овец в культуре клеток // Вопросы защиты сельско хозяйственных растений и животных от болезней Ч.2. Алма-Ата . 1989. –С 18.
8. Мамадалиев С.М., Тройцкий Е.Н. и др. Инструкция по изготовлению и контролю вирусвакцины сухой культуральной против оспы овец из штамма "НИСХИ". Утв. Департаментом ветеринарного надзора РК от 04.12.1999.
9. Блинова М.И., Лысенок Л.Н. Культуральная посуда и способы ее обработки // В кн.: Методы культивирования клеток. Под ред. Г.П.Пинаева, Л., Наука. 1988. – С.29-44.
10. Дягтеренко Н.Л. Обработка лабораторной посуды применяемой для культур тканей // Вопр. вет. вирусол. Т.1. 1964. М.: Колос. – С.92-94.
11. Лысенок Л.Н., Блинова М.И., Горюнов Л.Б. и др. Разработка и исследование стекол, используемых при монослойном культивировании клеток // В сб.: Культивирование клеток животных и человека, Пушкино 1985. – С.142.

**Рецензент: к.б.н. Кендирбаева С.К.**