

Список литературы

1. Клинико-эпидемиологическая характеристика заболеваний, вызванных галофильными вибрионами на побережье Азовского моря [Текст] / Шиколов А.В. [и др.] // ЖМЭИ. — 1987. — № 7. — С. 14–15.
2. Гурина, Л.М. Бактеріологічний моніторинг щодо вібрионів та аеромонад серед морських риб та інших гідробіонтів Азово-Чорноморського басейну [Текст] // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. — X., 2008. — Вип. 90. — С. 147–151.
3. Мониторинг выделения культур галофильных вибрионов у морских гидробионтов Азово-Черноморского бассейна [Текст] / Болдырев А.Д., Коляда Н.И., Гурина Л.М., Болдырев Д.А. // Наук. праці Південного філіалу «КАТУ» НАУ. — 2007. — № 101. — С. 107–108.
4. Галофильные вибрионы Черного моря и их роль в патологии человека [Текст] / Либинзон А.Б., Брудный Р.А., Нагорная А.Ф. [и др.] // ЖМЭИ. — 1987. — № 2. — С. 97.

ROLE OF HALOPHILIC VIBRIOS IN THE DETECTION OF INFECTIOUS DISEASES OF MARINE HYDROCOLES IN THE AZOV-BLACK SEA BASIN

Gurina L.M.

Crimean Experimental Station of the National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine»

Data concerning bacteriological monitoring of isolated cultures of halophilic vibrios and their role in the origin of infectious diseases of marketable fish and other hydrocoles are presented in the paper. Results of bacteriological investigations of 15 species of marketable fish, 1 species of the Black Sea mussel, 2 species of Rapana are presented in the paper. 108 cultures of microorganisms have been isolated.

УДК 619:576.535

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СУСПЕНЗИОННОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК ВНК–21 (С–13)

Гусев А.А., Бабак В.А., Желиховская З.Л.

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

В статье приведено описание роллерно-сuspensionного метода культивирования клеток ВНК–21(с–13) и опыт использования кондиционированных питательных сред. Разработанный метод эффективнее базового варианта в 2,7 раза и может быть использован при накоплении клеток ВНК–21 (с–13) для заправки биореактора на первом этапе культивирования.

Введение. При производстве живых и инактивированных вирусных вакцин применяются различные методы культивирования клеток для накопления вирусной биомассы. До недавнего времени методы тканевых культур применялись в вирусологии преимущественно в виде однослойных стационарных культур клеток — стационарный метод культивирования. Роллерный метод культивирования означает процесс, при котором клеточный монослой располагается по всей цилиндрической поверхности горизонтально вращающихся сосудов и периодически омывается питательной средой. Перспективным является разработка и внедрение глубинного метода культивирования в биореакторах для получения биоматериала в полупромышленных объемах [1, 2, 4, 5].

При роллерном культивировании суспензионных линий клеток некоторое их количество остается взвешенным в культуральной среде. В подобном варианте культуру клеток условно называют роллерно-сuspensionной [1, 5].

При накоплении суспензионной линии клеток ВНК–21 (с–13) роллерным методом для заправки лабораторного биореактора на первом этапе культивирования наблюдался незначительный рост клеток в питательной среде.

Нами была поставлена задача изучить это явление с целью увеличения выхода клеток с роллера при одновременном их росте в монослое и в суспензии, а так же

внедрить опыт использования кондиционированных питательных сред, полученных после выращивания гомологичных клеток.

Материалы и методы. Для проведения серии экспериментов в нашей работе мы использовали суспензионную линию клеток ВНК–21 (с–13) (почка сирийского хомячка). Работу с культурой клеток проводили на питательных средах DMEM (HyClone) и ферментативном гидролизате мышечных белков (ФГМ-С) (Щелковский биокомбинат) с добавлением сыворотки крови КРС и L-глутамина.

Линию клеток ВНК–21 (с–13) культивировали роллерным способом и суспензионным — в лабораторном биореакторе BioFlo110 с рабочим объемом до 5-ти литров. Оценку результатов при роллерном и суспензионном методе культивирования проводили по выходу клеток и индексу пролиферации, жизнеспособности клеток и степени пролиферативной активности в следующем пассаже.

С целью увеличения выхода клеток в суспензию при культивировании роллерным способом мы увеличили скорость вращения роллеров до 1,0–2,5 об./мин, довели объем питательной среды до 200 и 400 см³, а посевную концентрацию клеток до 100 тыс./см³, что стало основой двух опытных групп. При базовом варианте культивирования скорость вращения роллеров составляла 0,4–0,7 об./мин, объем питательной среды — 100 см³, посевная концентрация клеток — 50–60 тыс./см³. Контролем служили роллеры с заполнением на 200 и 400 см³, скоростью вращения 0,4–0,7 об./мин и посевной концентрацией клеток 100 тыс./см³.

Базовый вариант культивирования используется нами при накоплении клеток ВНК–21 (с–13) для заправки в биореактор 5-ти литров суспензии клеток, при этом требуется снять монослой клеток с 15–20 роллеров.

Результаты исследований и обсуждение. Данные экспериментальных групп и результаты культивирования клеток ВНК–21 (с–13) роллерным способом представлены в таблице.

Таблица — Схемы экспериментальных групп и результаты роллерного культивирования клеток ВНК–21 (с–13)

<i>Данные экспериментальных групп</i>	<i>Объем заполнения, см³</i>	<i>Скорость вращения, об./мин</i>	<i>Выход клеток в монослое, млн. кл./рол</i>	<i>Выход клеток в суспензии, тыс. кл./см³ *</i>	<i>Всего клеток в отношении к базовому варианту, %</i>
Опытная № 1	200	1,0–2,5	160–280	720–980	140 и >
Опытная № 2	400	1,0–2,5	210–370	870–2100	270 и >
Базовый вариант	100	0,4–0,7	140–250	50–300	100
Контроль № 1	200	0,4–0,7	150–250	550–800	120 и >
Контроль № 2	400	0,4–0,7	180–320	600–1260	200 и >

* приведен выход клеток в логарифмической фазе роста

Из таблицы видно, что максимальный выход клеток отмечался в опытной группе № 2, который минимум в 2,7 раза был выше, чем в базовом варианте, и в 1,35 раза больше идентичной контрольной группы № 2. Максимальное общее количество клеток в этой группе с монослоя и суспензии достигало 975–1210 млн. кл./рол, а в контрольной группе №2 на 260–410 млн. клеток меньше.

Индекс пролиферативной активности составил: в опытных группах № 1 и 2 — от 8,0 до 16,5; в контрольных группах № 1 и № 2 — от 7,5 до 14,0; в базовом варианте — 14,0–25,0 (что связано с наименьшей посевной концентрацией клеток). Жизнеспособность клеток во всех группах составляла 95–99 %.

Кривые роста клеток ВНК–21 (с–13) в суспензии при роллерном культивировании по опытной группе № 2 представлены на рисунке.

По данным изучения роста клеток ВНК–21 (с–13) (рис.) был определен оптимальный срок получения биомассы клеток на пике логарифмического роста, который пришелся на 72 часа культивирования.

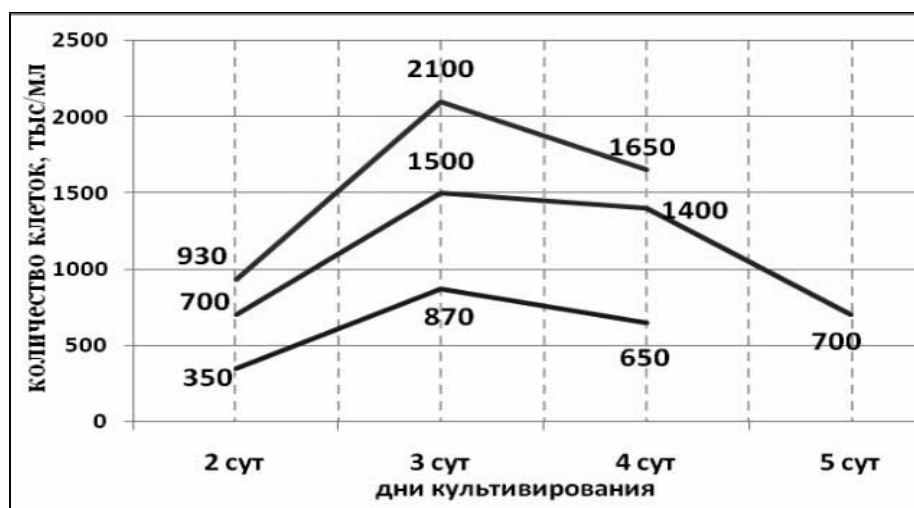


Рис. Кривые роста клеток ВНК–21(с–13) в суспензии в роллере

По отработанной схеме опытной группы № 2 (400 см³ // 1,0–2,5 об./мин // 100 тыс. кл./см³) получали взвесь клеток в логарифмической фазе роста для заправки биореактора BioFlo 110 в объеме 5 литров. Для этого требовалось 4–6 роллерных бутылей, из которых в работу взяли клетки, взвешенные в питательной среде, и клетки, снятые с монослоя, объединив их в одной емкости. Количество кондиционированной питательной среды в опытах составляло от 15 до 30 %.

Рост клеток в биореакторе BioFlo 110, полученных по схеме опыта № 2, соответствовал стандартной кривой роста клеток в биореакторе, что свидетельствует о возможности использования данного способа накопления клеток для заправки биореактора на первом этапе культивирования. Проллиферативная активность клеток, полученных роллерно-суспензионным способом, была высокой в следующих пассажах как при роллерном, так при глубинном выращивании клеток. Индекс пролиферации составил 3,4–5,8.

Решающими факторами, стимулировавшими пролиферативную активность клеток при роллерно-суспензионном культивировании, стала скорость вращения роллера, увеличение объема культуральной жидкости и посевная концентрация клеток. Увеличение оборотов роллера способствовало лучшему газообмену и преимущественному размножению клеток в культуральной среде (в суспензии). Дополнительное количество питательной среды, и увеличение посевной концентрации, также способствовали усиленному росту клеток.

Полученные нами результаты свидетельствуют о возможности внедрения в практику роллерно-суспензионного культивирования для накопления клеток ВНК–21 (с–13). Данный метод культивирования позволяет сократить объем работ по накоплению клеток для заправки биореактора с 15–20 роллеров до 4–6, снижает расход питательных сред и реактивов, а также дополняет свежеприготовленную питательную среду культуральной жидкостью, полученной после выращивания гомологичных клеток, получая тем самым кондиционированную питательную среду. Практика использования кондиционированных сред показала, что культуральная жидкость, полученная после выращивания клеток определенного типа, содержит метаболиты, являющиеся факторами роста для гомологичных и гетерологичных клеток [3].

Выводы. 1. Предложенный роллерно-суспензионный метод культивирования клеток ВНК–21 (с–13) позволяет получить выход клеток минимум в 2,7 раза выше, чем в базовом варианте культивирования, и может быть использован для накопления биомассы указанных клеток.

2. Максимальное количество клеток полученных с одного роллера с монослоя и суспензии достигало 975–1210 млн. кл./бут.

3. Клетки, накопленные роллерно-суспензионным методом и снятые в логарифмической фазе роста, сохраняют пролиферативную активность при заправке их в биореактор для глубинного культивирования.

4. В практику успешно культивированных клеток ВНК-И внедрен опыт использования кондиционированной питательной среды, которая положительно влияет на ростовые свойства клеток.

Список литературы

1. Адамс, Р. Методы культуры клеток для биохимиков [Текст] / Р. Адамс. — М. : Мир, 1983. — 263 с.
2. Дьяконов, Л.П. Культивирование клеток и тканей животных [Текст] / Л.П. Дьяконов [и др.]; под общ. ред. Л.П. Дьяконова. — Ставрополь: Ставроп. Правда, 1988. — Ч. 2. — 91 с.
3. Дьяконов, Л.П. Животная клетка в культуре [Текст] / Л.П. Дьяконов, В.И. Ситков. — М. : Компания Спутник+, 2000. — 154 с.
4. Фрешни, Р. Культура животных клеток. Методы [Текст] / Р. Фрешни. — М. : Мир, 1989. — 318 с.
5. Jakoby, W.B. Cell Culture [Text] / Jakoby W.B., Pastan I.H. — 2004. — Р. 639.

DEVELOPMENT OF CULTIVATION METHOD OF SUSPENSION LINE OF CELLS BHK-21(C-13)

Babak V.A., Gusev A.A., Zhalikhovskaya Z.L.

Institute of Experimental Veterinary Medicine, Minsk, Belarus

This article gives the description of roller-suspension method of cultivation of cells BHK-21 (c-13), and experience of use of the conditioned nutrient mediums. The developed method is more effective than the basic variant minimum in 2.7 times, and can be used for accumulation of cells BHK-21 (c-13) for a bioreactor batch at the first stage of cultivation.

УДК 619:616-07:578.5:578.835.11

СУЧАСНІ АСПЕКТИ ДІАГНОСТИКИ ТЕШОВІРУСНИХ ХВОРОБ СВИНЕЙ З ВИКОРИСТАННЯМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕТОДІВ

Дерев'янка С.В., Бова Т.О., Сорока В.І.

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН, м. Чернігів

Тешо-, ентеровіруси свиней можуть бути причиною ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней [1-3], гастроентериту [4], пневмоній [5, 6], патології репродуктивної системи [7] та везикулярної хвороби свиней [8]. За фізико-хімічними, біологічними властивостями та типом цитопатичної дії в культурах клітин ссавців ентеровіруси свиней було розділено на три групи [9, 10]. До I групи були віднесені штами 1-7 та 11-14 серотипів, до II групи — 8-й серотип, III групи — 9-й, 10-й серотипи. На основі секвенування геномів [11] та філогенетичного аналізу [12, 13] ентеровіруси свиней I групи віднесено до виду *Porcine teschovirus* і винесено в окремий рід *Teschovirus*, ентеровіруси свиней II групи рекласифіковано як *Porcine enterovirus A* та III групи — *Porcine enterovirus B*, які віднесені до роду *Enterovirus* [14, 15].

Геном тешо- й ентеровірусів свиней представлений одноланцюговою (+) РНК, яка виконує функцію матричної. Довжина РНК тешовірусів становить від 7006 до 7111 нуклеотидів [12], ентеровірусів А — 7412-7491 [16], ентеровірусів В — 7351-7401 [16].

На рис. 1. представлена структура геному тешо-, ентеровірусів. На кінцях відкритих для зчитування структур, знаходяться ділянки, що не транслюються (NTR-Non-translated region). 3-й кінець є поліаденільованим, а до 5-го кінця ковалентно приєднаний низькомолекулярний білок VPg. Геноми тешовірусів і ентеровірусів свиней А кодують лідерний протеїн, функція якого поки що невідома [15].

Трансляція відбувається за допомогою механізму кеп-незалежної внутрішньої ініціації, ключову роль у цьому процесі відіграє IRES (Internal Ribosome Entry Site) — місце внутрішнього приєднання рибосоми [17]. IRES-елементи тешо-, ентеровірусів