

## ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ДЛЯ РЕПРОДУКЦИИ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Матвеева И.Н., Кочиш И.И., Кочиш Т.Ю., Самуйленко А.Я., Еремец В.И.,  
Еремец Н.К., Киш Л.К., Беро И.Л.

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт  
биологической промышленности РАСХН, г. Шелково, Московская обл., Россия

*Несмотря на пригодность первично-трипсинизированной культуры клеток почки, легкого и трахеи эмбриона коровы для репродукции РС-вируса, использование перевиваемой культуры клеток ПТ-80 наиболее предпочтительно, ввиду доступности и более низкой себестоимости.*

**Актуальность.** Респираторно-синцитиальная инфекция крупного рогатого скота – контагиозная болезнь, клинически проявляющаяся повышением температуры, снижением аппетита, затрудненным дыханием, одышкой, истечением из носа, сильным кашлем с последующим развитием бронхопневмоний и интерстициальных эмфизем. Наиболее важным условием промышленного изготовления препаратов и средств специфической профилактики является получение активного вирусного сырья. Трудности разрешения этой задачи связаны с особенностями биологии данного вируса. К ним можно отнести низкую репродуктивную способность респираторно-синцитиального вируса (РС-вируса) вне организма, высокую требовательность к качеству тканевых культур, высокую чувствительность к условиям культивирования, чувствительность к термоинактивации, неспособность размножаться в организме лабораторных животных и др.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящих опытов явилось определение потенциальных возможностей применения перевиваемой культуры клеток ПТ-80 и первично-трипсинизированной культуры клеток почки, легкого, трахеи эмбриона коровы для репродукции вируса.

В связи с этим решались следующие задачи:

- готовили первично-трипсинизированную культуру клеток почки, легкого и трахеи коровы для репродукции РС-вируса;
- изучали инфекционную активность и активность в ИФА РС-вируса, репродуцированного в перевиваемой культуре клеток почки теленка (ПТ-80), первично-трипсинизированных культурах клеток легкого (ЛЭК), трахеи (ТЭК) и почки эмбриона ( на уроне 30 субпассажа).

**Материалы и методы.** В качестве исходного материала использовали штамм вируса «Randall», с титром инфекционности  $3,5-3,9 \lg T_{50}$ /мл. Для репродукции вируса использовали перевиваемую культуру клеток почки теленка (ПТ-80), первично-трипсинизированную культуру клеток легкого, трахеи, почки эмбриона коровы (ПЭК).

**Инфекционность вируса.** Определение титра инфекционности РС-вируса проводили в 24-луночных панелях по  $T_{50}$ /мл на культуре клеток ПТ-80. Результаты оценивали по цитопатическому действию через двое суток после заражения клеток и рассчитывали титр вируса по методу И.П. Ашмарина и др.

**Морфологию вируса** изучали методом электронной микроскопии. Электронную микроскопию препаратов РС-вируса проводили методом просвечивающей микроскопии с использованием электронного микроскопа JEM-100В при ускоряющем напряжении 80 кВ и инструментальных увеличениях от 40 до 100 тысяч раз. Препараты, диализованные методом прямой адсорбции, суспензий вируса наносили на пленки из формвара или парлодиона. Контрастировали препараты 4% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК) при рН 7,2 или 2% водным раствором уранилацетата (УА). Фотодокументирование осуществлялось на фотопластинки типа «ядерные» МР с последующим переносом изображения на контрастную фотобумагу.

Первично-трипсинизированную культуру клеток готовили по общепринятой методике из почки, легкого и трахеи эмбриона коровы. Клетки выращивали в 1,5 – литровых матрасах с посевой концентрацией 120-250 тыс.мл на среде Игла 199, содержащей 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота. Монослой первичных клеток отмывали от сыворотки и инфицировали вирусом РС, множественность заражения составила 1-2 ТЦД<sub>50/клетку</sub>. Через каждые 12 ч отбирали пробы культуральной жидкости и исследовали инфекционную активность (ИА) и активность, содержащегося в них вируса, в ИФА.

**Результаты.** Респираторно-синцитиальный вирус, штамм «Randall», репродуцировали в перевиваемой культуре клеток телянка ( ПТ-80), первично-трипсинизированной культуре клеток легкого, трахеи, почки эмбриона коровы (ПЭК).

Клетки выращивали на культуральной среде, содержащей половину среды Игла, половину среды 199, 2мМ глутамина, 1мМ пирувата натрия и 40 единиц гентамицина на литр среды.

После образования монослоя клеток его трижды отмывали раствором Хенкса и инокулировали РС-вирус, штамм «Randall», в течение часа при 36°С, из расчета 1-2 ТЦД<sub>50</sub> на клетку. Затем добавляли бессывороточную среду ГЛАХ (гидролизат лактальбумина на растворе Хенкса), содержащую 40 единиц гентамицина на литр среды.

После проявления 80% ЦПД клетки разрушали однократным замораживанием – оттаиванием, культуральные матрасы встряхивали и осаждали клеточный детрит центрифугированием при 5000 об/мин в течение часа.

Надосадочную вируссодержащую среду исследовали на инфекционную активность и активность в ИФА.

Как видно, из результатов, представленных в таблице, вирус, выращенный в перевиваемой культуре ПТ-80, культурах ЛЭК и ПЭК, проявляется в ИФА в титрах 1:32-1:64 и обладает инфекционностью на уровне 3,9-4,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. На культуре ТЭК цитопатическое действие вируса не обнаружено, однако, при титровании вируса, репродуцированного в культуре ПТ-80, он обладал инфекционной активностью на уровне 3,8-3,9 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Активность в ИФА составляла 1:16-1:32.

В образцах перевиваемой культуры ПТ-80, инфицированных дозой 1-2 ТЦД<sub>50</sub>/клетку, вирусные частицы с типичной для РС вируса морфологией обнаруживаются через 24 ч, достигая максимума к 120 ч культивирования.

**Таблица 1** – Результаты исследования инфекционной активности и активности в ИФА РС вируса, репродуцированного в культуре клеток ПТ-80, ЛЭК, ТЭК и ПЭК. (n=9).

Культура клеток	Время до появления 80% ЦПД (Ч)	Титр инфекционности в lg ТЦД <sub>50</sub> /мл	Титр в ИФА*
ПТ-80	120	4,0-4,5	32-64
ЛЭК	96	4,2-4,8	32-64
ТЭК	-	3,8-3,9	16-32
ПЭК	120	3,9-4,2	32-64

\* Указаны обратные значения титров в ИФА.

**Выводы.** Изложенное выше позволяет утверждать, что, несмотря на пригодность первично-трипсинизированной культуры клеток почки, легкого и трахеи эмбриона коровы для репродукции РС-вируса, использование перевиваемой культуры клеток ПТ-80 наиболее предпочтительно, ввиду доступности и более низкой себестоимости.

**Перспективы дальнейших исследований.** На основании полученных результатов при промышленном изготовлении препаратов и средств специфической профилактики необходимо получение более активного и доступного по себестоимости вирусного сырья.

## Список литературы

1. Кочиш, Т.Ю. Разработка набора реагентов для определения уровня антител к респираторно-синцитиальному вирусу крупного рогатого скота в иммуноферментном анализе. Автореф. дис... канд. биол. наук. – Ш., 2004. – с.2-19. 2. Животная клетка в культуре: Учебно-методическое пособие / Дьяконов Л.П., Ситков В.И. – М.: Компания Спутник, 2000. – 400 С. 3. Биотехнология: Под ред. Е.С.Воронина. – СПб, ГИОРД, 2005. – с. 160. 4. Сюрин, В.Н., Самуйленко, А.Я., Соловьев, Б.В., Фомина, Н.В. Вирусные болезни животных М, ВНИТИБП. – 1998. – с. 285. 5. Испытание перевиваемой культуры клеток Таурус-1 в диагностике аденовирусной инфекции КРС: Тез. докл. научно-производственной конф. – Омск: Изд. ФГОУ ВПО ИВМ ОМГАУ, 2004. – С.395-400. Лобова Т.П., Белоусова Р.В., Третьякова И.В.

### APPLICATION OF VARIOUS CELL CULTURES FOR REPRODUCTION OF BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

Matveeva I.N., Cochish I.I., Cochish T.Yu., Samuylenko A. Ya., Eremets V.I., Eremets N.K., Kish L.K., Bero I.L.

All-Russian Federal Research and Technological Institute of Biological Industry, Schelkovo, Moscow Region, Russia

*Despite on suitability of primarily culture of cow embryo kidney, lung and trachea cells for reproduction of the reproduction respiratory syncytial virus, use of intertwined cell culture PT-80 is the most preferable, in view of availability and lower cost price.*

УДК 619:617.54:615.015.4:612.115:636.4

### СТАН СУДИННО-ТРОМБОЦИТАРНОГО ГЕМОСТАЗУ У СВИНЕЙ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ АЦЕЛІЗИНУ ПІСЛЯ АБДОМІНАЛЬНИХ ОПЕРАЦІЙ

Матвієнко С.Г.<sup>1</sup>

Білоцерківський національний аграрний університет

*У статті представлена динаміка клінічних і гемостазіологічних показників (СІАТ, ШАТ та ІДТ) за асептичного запально-регенеративного процесу у свиней. Встановлено, що його розвиток після оваріоектомії характеризується підвищенням агрегаційних властивостей тромбоцитів. Застосування нестероїдного протизапального препарату ацелізину сприяє помірному перебігу запального процесу та скороченню загоєння лапаротомних ран.*

Актуальність теми. Для підвищення ефективності відгодівлі свиней поряд із загальноприйнятими схемами утримання та годівлі досить важливим елементом є кастрація не лише самців, а й самок. Це зумовлено тим, що самка під час охоти втрачає від 2 до 5 кг живої маси, а за час відгодівлі величина недоотриманого приросту може досягати 70 кг [1-3]. Тобто кастрація є одним із способів підвищення м'ясної продуктивності свиней.

За будь-якого способу кастрації свиней різних статевих груп виникає загроза інфікування тканин черевної порожнини, безпосереднього у самок чи висхідного у самців, тому частота післякастраційних ускладнень у цього виду сільськогосподарських тварин досить велика і досягає у структурі хірургічної патології 4,5 18,5 %. Кастрація ж свинок є суто абдомінальною операцією, яка супроводжується травмою не тільки м'яких тканин, а й серозних оболонок з подальшою їх адгезією та можливим розвитком ускладнень у вигляді спайкової хвороби чи перитоніту [4].

Поряд з цим досить поширеною є гризова патологія, яка за даними різних авторів [5-6] складає від 2 до 12 % усього поголів'я свиней. У її структурі найбільшу частку складають абдомінальні та пахвинно-мошонкові грижі – 3 та 50 %, відповідно [7]. У зв'язку з негативним впливом такої патології на кількісні та якісні показники м'ясної продуктивності свиней це зумовлює її оперативне лікування.

Крім того, при видаленні статевих залоз травмуються крупні судини, що зумовлює локальне порушення гемоциркуляції з активацією гемокоагуляції.

<sup>1</sup> Науковий керівник Рубленко М.В.