

АДАПТАЦІЯ ВИРУСА ЯЩУРА ТИПА О НКР-2007 № 2041 К ПЕРЕВИВАЕМЫМ КЛЕТОЧНЫМ КУЛЬТУРАМ

Саркисян Х.В.

«Научный центр оценки и анализа рисков безопасности пищевых продуктов» ГНКО, г. Ереван, Республика Армения

Вирус ящура, как возбудитель высококонтагиозного заболевания, с тенденцией к широкому распространению и эпизоотическому течению, по-прежнему привлекает самое пристальное внимание. Высокий уровень генетической variability вируса в пределах одного генотипа ежегодно приводит к возникновению новых изолятов, которые отличаются по степени вирулентности и иммуногенности от ранее выделенных. Распространение вируса ящура типа О в 2007 году в Нагорно-Карабахской Республике (НКР-2007), а также в тех странах, где ящур не регистрировался многие годы (Южная Корея, Япония, Монголия, Великобритания, Франция, Нидерланды и др.), дает основание полагать, что вопросы диагностики, борьбы и специфической профилактики все еще остаются актуальными. Тем более, что в последние годы вспышки ящура типа О возникали в сопредельных с НКР государствах [5, 6].

В июне 2005 года очаг ящура был зарегистрирован и в Амурской области Российской Федерации. Лабораторными исследованиями, проведенными в НЦЖИВ в патологическом материале от крупного рогатого скота (КРС) был выявлен вирус ящура типа О (экспертиза N 2041 от 31.07.2007 г. экзотический для НКР). В дальнейшем вспышки ящура, вызванные данным типом вируса возникли и в других районах НКР.

Данные многих авторов [1, 2, 3, 4, 7], показали, что последние вспышки ящура обусловлены антигенно измененными штаммами вируса ящура типов О, Азия и А.

Цель работы. Исследование возможности адаптации изолята НКР-2007 № 2041 к линиям перевиваемых культур.

Признаки адаптации изолята НКР-2007 были установлены в перевиваемой культуре клеток ВНК-21 и ПСГК-30. При изучении адаптационной способности вируса ящура типа О-НКР из афтозных материалов к линиям перевиваемых культур ВНК-21, ПСГК-30 был обнаружен вирус ящура типа О.

Материалы и методы исследований. Для изучения репродукции выделенного изолята в различных культурах клеток (КК) были использованы перевиваемые клеточные линии ВНК-21 (почка сирийского хомячка), ПСГК-30 (почка сибирского горного козерога).

Пассирование изолята проводили во флаконах емкостью 50 см³. Для культивирования вируса использовали питательные среды Игла, 0,5 % ГЛА на растворе Хенкса, с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки КРС.

Посевной материал перевиваемых культур клеток хранили при температуре минус 196 °С (в жидком азоте), при этом в качестве криопротектора добавляли 10 % диметилсульфоксид (ДМСО) и 20 % сыворотку КРС.

Во флаконы со сформировавшимся монослоем вносили свежую порцию поддерживающей среды без сыворотки и 10 % афтозную вирусную суспензию в объеме 0,5 см³. Вирус культивировали при 37 °С до появления признаков цитопатического действия (ЦПД). Максимально проводили не более 5 пассажей. При отсутствии ЦПД в течение 72–96 часов делали «слепые» пассажи. Адаптированным считали вирус, вызывающий 100 % ЦПД в течение 18–36 часов.

Титр вируса определяли в первично-трипсинизированной культуре клеток СП (почка поросенка) и выражали в lg ТЦД₅₀/мл. С этой целью суспензию инфицированных вирусом трипсинизированных клеток вносили в заданных разведениях в питательную среду первичной культуры.

Результаты исследований и их обсуждение. Адаптацию изолята НКР-2007 № 2041 к испытуемым линиям культур клеток производили, используя способ перемежающихся пассажей. С этой целью, после каждого проведенного пассажа, в исследуемых перевиваемых культурах клеток, вирус содержащие клетки снимали со стекла с помощью 0,25 % раствора трипсина и вносили их на монослой первично трипсинизированной культуры клеток СП (контроль). Состояние адаптируемого изолята контролировали, оценивая накопление вируса после пассажей только на СП. При этом размножение и накопление вируса НКР-2007 в перевиваемой культуре оценивали методом титрования на первичных клетках СП. Оценкой степени адаптации вируса считали величину инфекционного титра СП. Результаты изучения репродукции вируса в различных клеточных культурах представлены в таблице.

Таблица – Результаты исследования адаптации вируса ящура О НКР-2007 № 2041 к перевиваемым культурам клеток

№ п/п	Наименование культуры клеток	Количество пассажей	Время проведения ЦПД(час)	Титр вируса (lg ТЦД ₅₀ /мл)	Активность в РСК
1	ВНК-21	5	24	10 ^{-6,75}	1:4
2	ПСГК-30	4	24	10 ^{-6,5}	1:4
3	СП контроль	3	18	10 ^{-5,0}	1:2

Из представленной таблицы можно сделать вывод, что в культурах клеток ВНК-21 и ПСГК-30 на 5 и 4 пассажах, соответственно, изолят вируса ящура НКР-2007 через 24 часа культивирования вызывал образование идиопатических изменений. Контрольное заражение этим вирусным материалом культуры СП сопровождалось образованием ЦПД, характерных для ящура. Количество пассажей в культурах клеток ВНК-21 способствовало росту титра инфекционного вируса. Накопление вируса в 5 пассаже соответствовало 6,75 lg ТЦД₅₀/мл.

Выводы. В результате проведенных работ, получены данные о возможности адаптации вируса ящура НКР-2007 к перевиваемой культуре клеток ВНК-21, ПСГК-30.

Указанные линии культур клеток могут представлять интерес при выборе чувствительных систем для культивирования данного изолята.

Список литературы

1. Изучение чувствительности культур клеток и восприимчивых животных к изоляту вируса ящура типа Азия-1 №1987 /Амурский/ 2005 [Текст] / М.В. Жильцова [и др.] // Тр. ФЦОЗЖ. – Владимир, 2006. –Т. IV. – С. 71–80.
2. Иммунобиологические свойства эпизоотического штамма вируса ящура типа О № 1964 /Монголия/ 2004 [Текст] / В.В. Никифоров [и др.] // Тр. ФЦОЗЖ. – Владимир, 2005. – Т. 3. – С. 94–104.
3. Некоторые характеристики эпизоотических штаммов вируса ящура, изолированных в СССР [Текст] / Ж.А. Шажко [и др.] // Ящур (к новой стратегии борьбы с ящуром) : материалы Междунар. научн. конф. – Владимир, 1992. – С. 82–96.
4. Studies of quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs

and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus [Text] / S. Alexandersen [et al.] // J. Comp. Path. – 2003. – Vol. 129. – P. 268–282. 5. Annual OIE/FAO FMD Reference laboratory network, January-December 2009 [Electronic resource]. – Access mode : URL : http://www.foot-and-mouth.org. – Title from the screen. 6. OIE. World Animal Health in 2007 [Text]. – Paris, 2008. – 603 p. 7. Kitching, R.P. Identification of food-and-mouth disease virus carrier and cub clinically infected animals and different action from vaccinated animals [Text] / R.P. Kitching // Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. – 2002. – Vol. 21, № 3. – P. 531–538.

THE ADAPTATION OF THE FMD VIRUS TYPE O STRAIN NKR-2007 N 2041 TO CONTINUOUS CELL CULTURES

Sarkisyan Kh.V.

«Scientific Centre for Risk Assessment and Analysis in Food Safety Area», SNCO, Yerevan, Republic of Armenia

The possibility of adaptation of the FMD virus type O strain NKR-2007 N 2014 for transferring cell cultures BHK-21, ПСГК-30 have been studied. Signs for adaptation have been established for transferring cell cultures BHK-21 and ПСГК-30. This cell cultures can be interesting models for selection of the sensitive biological systems for cultivation of the above mentioned virus.

The adaptation of the virus O NKR-2007 N2041 at the investigated cell cultures have been done through intermittent passages. For this purpose after each passage the cells containing viruses have been removing from the glasses by using of the 0.25 % solution of trypsin and transferred to the monolayer primary trypsin cell culture of СП (cell culture from kidney of piglets). The condition of adaptive virus has been controlled through evaluation of the virus in the СП after passages. The replication and accumulation of the virus O NKR-2007 in the transferring cell culture have been evaluated by the method of titration in the primary cell culture СП.

УДК 636.09:615.371:636.2:636.4

ПАТО- ТА ГЕНОТИП ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ, ВИДІЛЕНИХ В УКРАЇНІ В 1992-2011 рр.

Стегній Б.Т., Болотін В.І., Герілович А.П., Музика Д.В., Стегній А.Б., Рула О.М.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Афонсо К.

Південно-Східна дослідницька лабораторія з вивчення хвороб птиці, м. Атенс, США

Ньюкаслська хвороба (НХ) обумовлює значну ветеринарну проблему у присадибному та промисловому птахівництві. Це небезпечне вірусне захворювання завдає значних економічних збитків за рахунок знищення інфікованої птиці, згорання галузі, значного скорочення товарообміну птахівничою продукцією, витрат на карантинні, моніторингові, прогностичні, профілактичні та санітарно-оздоровчі заходи [1, 2].

На цей час досягнуті значні успіхи в питаннях ранньої діагностики та типування збудника НХ, що є запорукою ефективного контролю інфекції в промисловому птахівництві. Повноцінним компонентом систем діагностики, що раніше базувалась на низці серологічних і вірусологічних тестів, стали методи молекулярної діагностики та епізоотології [3].

У країнах-учасниках МЕБ упродовж останніх десяти років широко застосовується полімеразна ланцюгова реакція, тест з оцінки поліморфізму довжин фрагментів рестрикції та секвенування моніторингові роботи для встановлення особливостей молекулярної епізоотології таких економічно значущих та емерджентних захворювань птиці, як НХ [4]. Одним з основних критеріїв оцінки вірулентності штамів ВНХ є первинна структура сайту розщеплення білку F0. Тому виникає необхідність проведення поглиблених досліджень нуклеотидних послідовностей ізолятів вірусу, виділених на території України, з метою створення вітчизняної системи пато- та генотипування.

Матеріали та методи. Досліджували 21 ізолят ВНХ, які зберігаються в колекції відділу вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» (табл. 1).

Таблиця 1 –Перелік ізолятів, які були використані під час виконання роботи.

№ з/п	Назва ізоляту	Титр активності ГА	Від кого виділений
1.	PMV-1/Dunlin/SaltLake/Crime/2006	1:2048	Побережник
2.	PMV-1/Teal/Krasnooskilyky/5-11/2009	1:512	Чирянка велика
3.	NDV/Chicken/Kharkiv/66/2007	1:256	Курка
4.	NDV/Chicken/Ivano-Frankivsk/58/2007	1:256	Курка
5.	NDV/Chicken/Lyubotin/2003	1:128	Курка
6.	NDV/Chicken/LipovaDolina/2002	1:1024	Курка
7.	PMV-1/Duck/Taranivka/1992	1:2048	Качка
8.	PMV-1/Duck/Korobivka/1992	1:512	Качка
9.	PMV-1/Duck/Dokuchaevskiy/1992	1:512	Качка
10.	PMV-1/Pigeon/Donetsk/3/2007	1:512	Голуб
11.	Ukr/Dniprop/Pigeon-07/2007	1:128	Голуб
12.	PMV-1/Pigeon/Kharkiv/1/2007	1:256	Голуб
13.	PMV-1/Pigeon/Kharkiv/2/2007	1:2048	Голуб
14.	PMV-1/Rook/Izjum/8-15/2007	1:2048	Ворона
15.	Pigeon/Dnipropetrovsk/1-18-11	1:64	Голуб
16.	Pigeon/Simferopol/2-26-11	1:128	Голуб
17.	Pigeon/Ukromne/3-26-11	1:128	Голуб
18.	Mallard/Krasnoperekopsk/18-23-10/10	1:128	Крижень
19.	White-frontedGoose/ANI/48-15-02/11	1:128	Білолоба гуска
20.	RuddyShelduck/AN/37-15-02/11	1:256	Огар
21.	RuddyShelduck/AN/38-15-02/11	1:128	Огар

Екстракцію нуклеїнових кислот здійснювали за допомогою афінної сорбції з використанням суспендованих сорбентів «Рибо-сорб-50» (ФДУН «Центральний науково-дослідний інститут епідеміології Росспоживнагляду», м. Москва, Російська Федерація). Отримані зразки РНК використовували для напрацювання ДНК за допомогою комерційного набору для зворотної транскрипції РНК «Реверта-Л» (ФДУН «Центральний науково-дослідний інститут епідеміології Росспоживнагляду», м. Москва, Російська Федерація) або «RT-Core» (ТОВ «Ізоген», м. Москва, Російська