

15 мин реакцию останавливали добавлением 1% додецилсульфата натрия. Учет производили на спектрофотометре "Униплан" (г Москва) при длине волны 405 нм.

Позитивно-негативный порог определяли по результатам исследований 70 заведомо отрицательных сывороток крови МРС. В результате исследований было установлено, что титр антител в отрицательных сыворотках составлял <1:40.

Для определения специфичности рекомбинантного антигена тестировали гетерологичные сыворотки овец и коз с наличием антител к вирусу ящура и чумы крупного рогатого скота. Уровень антител не превышал фонового.

Для оценки воспроизводимости результатов реакции положительную контрольную сыворотку в разведении 1:20 вносили во все лунки планшета, и после проведения реакции сравнивали оптическую плотность (ОП) в лунках. Коэффициент вариации при постановке реакции на одном планшете составил 3,7%. Данные показатели указывают на хорошую воспроизводимость результатов [3].

РЕЗЮМЕ

Получен рекомбинантный нуклеокапсидный белок вируса чумы мелких жвачных (ЧМЖ). На основе рекомбинантного антигена разработан непрямой вариант ИФА для выявления антител к вирусу ЧМЖ. С использованием разработанного метода исследованы сыворотки крови мелкого рогатого скота из разных регионов России.

ABSTRACT

The recombinant nucleocapsid protein of the peste des petits ruminants virus was obtained. On the basis of the recombinant antigen the indirect ELISA was developed for the detection of the antibodies against the virus of peste des petits ruminants. Using the developed technique the blood sera collected from small ruminants in various regions of Russia were investigated.

Литература

1. О.Г. Грибанов, А.В. Шербаков, Н.А. Перевозчикова и др. Использование аэросила А-300 и фильтров GF/F (GF/C) для очистки фрагментов ДНК, ДНК-плазмид РНК // Биохимия. 1996. Т. 21, № 6. С. 1064–1070.
2. Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сембрук. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
3. И.О. Поляков. Практическое пособие по медицинской статистике. Л.: Медицина, 1975. 150 с.
4. А.С. Яковлева, А.В. Канышина, А.В. Шербаков. Экспрессия в E.coli рекомбинантных белков 3А, 3В и 3АВ вируса ящура // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. Владимир, 2005. Т. 3. С. 105–114.
5. OIE. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines – 5th ed. Paris, 2004. P. 153–162.
6. K.S. Choi, J.J. Nah, Y.J. Ko et al. Rapid competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to peste des petits ruminants virus // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2005. V. 12, N 4. P. 542–547.

УДК 619:578.821.21:636.32/.38:636.39:57.082.26

М.С. Кукушкина

ИЗУЧЕНИЕ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСОВ ОСПЫ ОВЕЦ И КОЗ В ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

Введение

При культивировании вирусов оспы овец (ВОО) и коз (ВОК) используют первичные культуры клеток из органов ягнят,

В непрямом варианте ИФА исследовали свыше 200 сывороток крови от здоровых овец и коз различного возраста из разных областей России (Приморский край, Хабаровский край, Еврейский автономный округ, Новосибирская область, Тверская область). Животные не вакцинировались против чумы мелких жвачных. По результатам ИФА антитела к вирусу ЧМЖ в сыворотках крови животных не обнаружены, что свидетельствует о благополучии этих регионов по данному заболеванию.

Выводы

Экспрессией в E.coli получен рекомбинантный нуклеокапсидный белок вируса чумы мелких жвачных.

На основе рекомбинантного антигена разработан непрямой вариант ИФА для выявления антител к вирусу ЧМЖ

С использованием разработанного метода протестировано свыше 200 сывороток крови мелкого рогатого скота из разных областей России. Антитела к вирусу ЧМЖ не обнаружили, что свидетельствует о благополучии обследуемых регионов по данному заболеванию.

козлят, телят [5]. Немногочисленные литературные источники свидетельствуют о способности вирусов оспы овец и оспы коз репродуцироваться в перевиваемых куль-

турах клеток гонад козы [1], мышц плода крупного рогатого скота [6], почки овцы (ПО) [3] и почки сирийского хомячка (ВНК-21) [7] с титром накопления до 5,0–5,5 lg ТЦД₅₀/см³.

Целью наших исследований являлось изучение репродукции вирусов оспы овец и оспы коз при культивировании стационарным, роллерным и суспензионным методами в перевиваемых культурах клеток гонад козы (Ch-91), ее производственном трофоварианте (ГК), полученном в ФГУ ВНИИЗЖ [4], и в производственной линии монослойно-суспензионного варианта культуры ВНК-21.

Материалы и методы

В работе использовали вакцинный штамм вируса оспы овец «ВНИИЗЖ» и вакцинный штамм вируса оспы коз «ВНИИЗЖ 2003», перевиваемую культуру клеток гонад козы (Ch-91), производственный трофовариант ГК и ВНК-21. Культуру клеток выращивали в клинских матрасах и 3 литровых роллерных бутлях в питательной среде Игла с 5–10% нормальной сыворотки КРС, 50 мкг/мл гентамицина, 0,03% глутамина. Для суспензионного культивирования использовали культиваторы КС-40 с рабочим объемом суспензии 10–15 л. Исходная концентрация клеток составляла 1,3–1,7 млн/см³. Культуру клеток инфицировали вирусом в дозе 0,01, 0,1 и 1,0 ТЦД₅₀/кл, рН вирусной суспензии поддерживали в интервале 7,0–7,2. Монослойную и роллерную культуры клеток заражали с адсорбцией и без адсорбции вируса на клетках. При заражении культуры клеток с адсорбцией вирус вносили после удаления ростовой среды, инкубировали при 37° С в течение 1 ч, а затем вносили поддерживающую среду и инкубировали до проявления ЦПД на площади не менее 70% монослоя. При культивировании вируса без адсорбции его вносили одновременно с поддерживающей средой после удаления ростовой среды и инкубировали аналогичным спо-

собом. Для культивирования вируса использовали поддерживающую среду Игла с сывороткой КРС 1–5% и без сыворотки. ЦПД вируса определяли по процентному соотношению живых клеток к общему их количеству в начале культивирования.

Репродуктивную активность вируса оценивали по времени появления ЦПД, интенсивности его развития и титру накопления вируса. Сбор вируса производили при цитопатическом действии (ЦПД) на клетки 70–90% с последующим промораживанием вирусного материала при температуре минус 40° С. Полученный вирус проверяли на стерильность высевами на тиогликолевую среду, МПА, МПБ.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследований изучались особенности репродукции вирусов оспы овец и оспы коз в монослое клеточных культур Ch-91, ГК и ВНК-21, при использовании сред с различным процентным содержанием сыворотки КРС. В процессе отработки технологии было установлено, что для получения активной биомассы вируса необходимо использовать поддерживающую среду без сыворотки КРС или с ее содержанием в 1% концентрации в зависимости от состояния клеток монослоя. При содержании сыворотки в концентрации 5% снижался инфекционный титр вируса и увеличивались сроки его культивирования с 3–4 до 5–7 дней.

Сравнение эффективности заражения культуры клеток гонад козы вирусами оспы овец и оспы коз с предварительной адсорбцией или без таковой, показало, что накопление вируса при обоих способах заражения было практически одинаковым.

На следующем этапе исследований было проведено изучение влияния множественности (дозы) заражения на накопление вируса в культуре клеток гонад козы при стационарном культивировании. Результаты заражения культуры Ch-91 вирусами оспы овец и оспы коз в дозе 0,01, 0,1 и 1,0 ТЦД₅₀/кл представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние дозы заражения на накопление вируса в культуре клеток гонады козы Ch-91 (n=3)

Вирус	Доза заражения, ТЦД ₅₀ /кл	Сроки культивирования, сут.	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³
ВОО	0,01	5–6	6,0±0,25
	0,1	4–5	6,25±0,25
	1,0	4–5	6,18±0,24
ВОК	0,01	3–4	6,0±0,20
	0,1	2–3	6,16±0,14
	1,0	2–3	6,50±0,25

Таблица 2
 Результаты культивирования вирусов оспы овец и оспы коз различными методами (n=5)

Культура клеток	Вирус	Титр вируса при разных способах культивирования, lg ТЦД ₅₀ /см ³		
		стационарный	роллерный	суспензионный
Ch-91	ВОО	5,60±0,28	6,35±0,22	н.и.
	ВОК	5,35±0,33	6,35±0,22	н.и.
ГК	ВОО	6,25±0,22	7,07±0,19	н.и.
	ВОК	5,90±0,37	7,15±0,28	н.и.
ВНК-21	ВОО	3,55±0,37	н.и.	3,75±0,25
	ВОК	3,70±0,20	н.и.	4,30±0,20
Сроки культивирования (сутки)	ВОО	4–5	3–4	3–4
	ВОК	3–4	2–3	2–3

Примечание: ВОО — вирус оспы овец; ВОК — вирус оспы коз; н.и. — не исследовано

Как видно из табл. 1, заражение культуры клеток Ch-91 вирусом оспы овец в дозе 0,01–1,0 ТЦД₅₀/кл существенно не влияло на величину титра вируса. Однако при уменьшении заражающей дозы до 0,01 ТЦД₅₀/кл отмечено увеличение сроков культивирования вируса до 5–6 суток, тогда как при заражении в дозе 0,1 или 1,0 ТЦД₅₀/кл сроки культивирования вируса составляли 4–5 суток. Титр вируса был в пределах 6,0±0,25–6,18±0,24 lg ТЦД₅₀/см³.

Аналогичные результаты по накоплению вируса оспы коз получены при его культивировании с использованием различных доз указанного штамма. Однако сроки максимального накопления вируса были, соответственно, в пределах 3–4 и 2–3 дней с момента заражения. Исходя из полученных результатов, для дальнейшей работы за рабочую дозу вируса была принята множественность инфицирования культуры клеток 0,1 ТЦД₅₀/кл.

После изучения способов и множественности заражения культуры клеток вирусами оспы овец и оспы коз, было проведено сравнение различных методов культивирования этих вирусов. Результаты культивирования вирусов оспы овец и оспы коз стационарным, роллерным и суспензионным методами представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, при использовании перевиваемой культуры клеток Ch-91 при стационарном способе культивирования вирусы оспы овец и оспы коз накапливались в средних титрах 5,35–5,6 lg ТЦД₅₀/см³, а при роллерном культивировании — 6,35 lg ТЦД₅₀/см³. В трофоварианте культуры кле-

ток гонад козы ГК накопление вируса в среднем было выше на 0,75–1,25 lg по сравнению с культурой Ch-91 при обоих способах культивирования. Несмотря на то, что накопление вируса в культуре клеток ВНК-21 оказалось всего 3,55–4,3 lg ТЦД₅₀/см³, это дает возможность использовать ее в качестве перспективной репродуцирующей системы суспензионного культивирования.

При суспензионном культивировании вирусов оспы овец и оспы коз в производственной линии клеток ВНК-21 средний титр был на 0,2–0,6 lg ТЦД₅₀/см³ выше, чем при стационарном способе культивирования. При стационарном способе максимальные сроки культивирования составляли 4–5 суток, а при использовании роллерного и суспензионного методов сокращались до 3–4 суток.

Полученные в этом исследовании результаты вполне согласуются с данными других авторов. Так, по данным Л.Б. Кутумбетова и соавторов [2], при роллерном культивировании вируса оспы овец штамм «НИСХИ» в перевиваемой культуре клеток почки эмбриона овцы удавалось получить титр вируса 6,5–6,75 lg ТЦД₅₀/см³.

Выводы

Результаты исследований показали, что для получения вирусов оспы овец и оспы коз пригодны перевиваемые культуры клеток гонад козы Ch-91, трофовариант культуры клеток гонад козы ГК, а также производственная линия клеток ВНК-21. Более выраженное накопление вирусов отмечено в культурах клеток Ch-91 и ГК при использовании роллерного культивирования.

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты изучения репродукции вирусов оспы овец и оспы коз при культивировании стационарным, роллерным и суспензионным методами в перевиваемых культурах клеток гонад козы (Ch-91), ее производственном трофоварианте (ГК), полученном в ФГУ ВНИИЗЖ, и в ВНК-21. Все использованные культуры пригодны для культивирования вирусов оспы овец и коз.

Более выраженное накопление вирусов отмечено в культурах клеток Ch-91 и ГК при использовании роллерного культивирования.

SUMMARY

The paper demonstrates the data obtained from the studies of sheep pox and goat pox virus reproduction during their cultivation in the following passaged cultures: BHK-21, goat gonad (Ch-91) and its production Ch tropho-variant obtained in the FGI ARRIAH. The reference, roller and suspension techniques were used. All cultures used in the studies are suitable for sheep pox and goat pox virus cultivation. The most expressed virus accumulation was registered in the Ch-19 and Ch cell cultures using roller cultivation technique.

Литература

1. Д.К. Басова, В.И. Диев, Г.А. Блотова. Специфическая активность аттенуированного вируса оспы овец штамма ВНИИЗЖ в процессе культивирования на культуре клеток гонад козы (Ch-91) // Междунар. научно-произв. конф., посвящен. 100-лет. со дня рождения чл.-корр. ВАСХНИЛ В.Т. Котова. Воронеж, 1999. С. 91–92.
2. Л.Б. Кутумбетов, К.Т. Майхин, К.Р. Кульбаева. Репродукция вируса оспы овец в культуре клеток перевиваемой линии почки эмбриона овцы // Роль вет. науки в развитии жив-ва: матер. междунар. науч.-произв. конф., посвящен. 75-летию Казах. НИВИ. Алматы, 2000. С. 126–128.
3. А.В. Машнин. Разработка и усовершенствование средств и методов лабораторной диагностики оспы овец и оспы коз: автореф. дис....канд. вет. Наук. Покров, 2001. 23 с.
4. Т.И. Корпусова, Б.Л. Манин, Л.Б. Кутумбетов и др. Получение и использование стабильного трофo-варианта клеток гонад козы для вирусологических исследований // Биол.-экол. пробл. заразных бол. диких ж-ных и их роль в патол. с.-х. ж-ных и людей.: матер. науч.-практ. конф. Покров, 2002. С. 290–293.
5. C. Altinel, F. Ozyoruk, F. Uyanik. Studies on the productin of a prototype sheep and goat pox vaccine in lamb testes cellculture // Pendik Vet. Mikrob. Der-gisi. 1993. V. 24, № 1. P. 47–55.
6. F.G. Davies, G. Mbugwa. The alterations in patho-genicity and immunogenicity of a Kenya sheep and goat pox virus on serial passage in bovine foetal muscle cell cultures // J. Comp. Pathol. 1985. V. 95, № 4. P. 565–572.
7. M. Pathiban, K. Kumanan, V.D. Padmanaban. Usefulness of BHK 21 (Razi) cell line in evolving a cell-line adapted sheep-pox virus for vaccine production // Indian J. Anim. Sci. 1993. V. 63, № 5. P. 515–517.

УДК 619:616.98:578.821.21:636.32/.38:616-097.3

А.В. Гарькин

ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСПЕ КОЗ

Введение

Периферическая кровь является гибкой и динамичной системой гомеостаза и претерпевает количественные и качественные изменения как при физиологических, так и при патологических состояниях, в частности при инфекционных заболеваниях. В данной работе приводятся результаты исследования крови и сывороток крови коз, зараженных вирулентным штаммом «Приморский 2003» вируса оспы коз, изолированном из патматериала козы при вспышке оспы коз в Еврейской автономной области в 2003 году.

Материалы и методы

Исследования проводили на 10 козак местных грубошерстных пород в возрасте 2–3 лет, которых подвергали экспериментальному заражению вирусом оспы коз при использовании лиофилизированного тканевого вируса штамма «Приморский 2003» с исходным титром $10^{7.11}$ ИД₅₀/0,5 см³ интрадермально в подкожную складку в количестве 1000; 500 и 100 ИД₅₀/0,5 см³. Патогенность возбудителя в зависимости

от введенной заражающей дозы оценивали по продолжительности инкубационного периода, проявлению, течению болезни и ее исходу. Гематологические исследования проводили согласно общепринятым методам с окраской мазков крови по Романовскому и Май-Грюнвальду. Токсическую зернистость в нейтрофилах выявляли окраской по Фрейдлю. Гемоглобин определяли по Сали, скорость оседания эритроцитов по методу Панченкова. Сыворотки крови животных на наличие антител исследовали в РДП и в реакции нейтрализации с постоянной дозой вируса на 3-х суточной перевиваемой культуре клеток Ch-91 с учетом результатов по Риду-Менчу.

Результаты и обсуждение

Независимо от количества инфекционных единиц введенного вируса, заболевание всегда заканчивалось летально, что указывает на исключительную патогенность данного штамма. Инкубационный период в среднем составлял 3–6 дней, лихорадочный период начинался в среднем с 3–7 дня и продолжался от 2 до 10 дней. Ге-