

УДК 619.6:578.825.1:576.535:578.24

Е.А. Яснева

ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ ПОЛНОЦЕННОГО ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ МАРКИРОВАННОГО ШТАММА «ВК» В ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК ВНК-21

Введение

Болезнь Ауески является острым контагиозным заболеванием различных диких и сельскохозяйственных животных, в основном свиней [4] и наносит значительный ущерб странам с развитым свиноводством, в том числе и России.

Для профилактики болезни Ауески широко используют вакцинацию, которая существенно снижает клиническое проявление заболевания и достаточно эффективно препятствует распространению инфекции. Однако ни одна из существующих в настоящее время вакцин не предотвращает инфицирование животных, установление латентной инфекции и реактивацию вируса. Многолетний опыт применения вакцин показал, что одна вакцинация не способна решить проблемы искоренения заболевания [3].

В ряде стран искоренение болезни Ауески было проведено посредством выявления инфицированных животных среди невакцинированного поголовья и их выбраковки [6]. Выявление инфицированных животных в настоящее время осуществляется в основном с помощью серологической диагностики, которая позволяет обнаруживать в том числе и латентно-инфицированных животных, т.к. после инфицирования вирусспецифические антитела сохраняются в крови животных в течение ряда лет [5].

Создание новых эффективных средств серологической диагностики и специфической профилактики болезни Ауески остается в настоящее время актуальной задачей.

Одним из основных условий получения маркированных вакцин против болезни Ауески и соответствующих диагностических тест-систем, позволяющих дифференцировать инфицированных животных среди иммунизированного поголовья, является фактор накопления полноценного вируса в определенной биологической системе.

По данным некоторых публикаций [1, 2] наиболее активную биомассу вируса болезни Ауески из маркированного штам-

ма «ВК» ($8,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и выше) можно получить в культуре клеток ВНК-21 при культивировании в течение 40–48 ч.

Целью наших исследований было изучение динамики накопления полноценного вируса болезни Ауески штамм «ВК» в перевиваемой линии клеток ВНК-21 для его возможного использования при получении иммунобиологических препаратов.

Материалы и методы

Для культивирования вируса болезни Ауески штамма «ВК» использовали перевиваемую линию культуры клеток ВНК-21, выращенную в клинских матрасах с хорошо сформировавшимся монослоем. Вирус болезни Ауески штамм «ВК» инокулировали в матрасы после удаления ростовой среды и трехкратного промывания монослоя раствором Хенкса. Одновременно в матрасы вносили по 200 см^3 поддерживающей питательной среды ПСП, т.е. культивирование осуществляли без предварительного контакта вируса с клетками. Инкубирование инфицированной культуры клеток ВНК-21 проводили при $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Контролем служили матрасы с незараженными клетками.

Учет результатов проводили начиная с 17-го часа после заражения культуры клеток по наличию или отсутствию цитопатического действия вируса. Для освобождения вируса из клеток с цитопатическим эффектом матрасы замораживали при температуре -40°C и оттаивали при 25°C . Исследованию подлежал вирусный материал после одно- и двукратного замораживания-оттаивания вирусной суспензии, снятой через 19, 24, 30, 35, 44, 49, 54, 59, 70, 73, 76 и 94 ч после инокуляции вируса в культуру клеток.

Инфекционную активность полученного вируса болезни Ауески штамма «ВК» определяли на культуре клеток гонад козы (Ch-91) методом десятикратных разведений по общепринятой методике, которую выражали в логарифмах с основанием 10.

Количественную оценку содержания вирусного антигена в полученном матери-

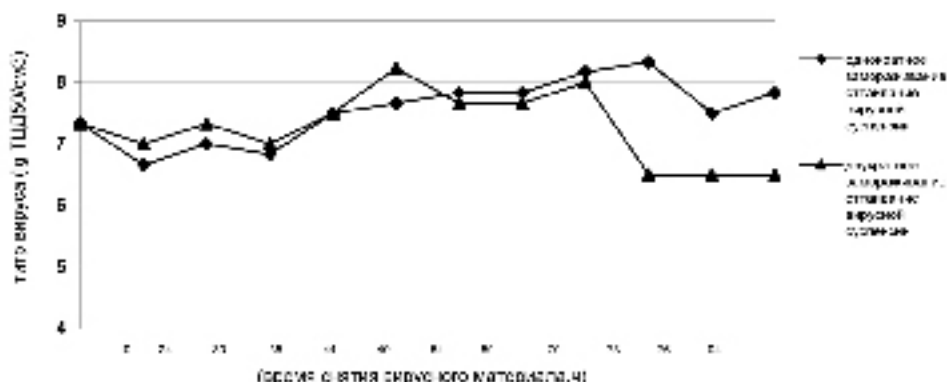


График. Титр вируса болезни Ауески штамм «ВК» в зависимости от времени репродукции в перевиваемой линии клеток ВНК-21

але осуществляли с помощью непрямого иммуноферментного анализа.

Концентрацию вирусных частиц в исследуемом материале и их качественное состояние, по наличию полных вирионов и продуктов их распада, определяли с помощью электронного микроскопа JEM-100 CX. Подготовку вирусных препаратов для электронной микроскопии проводили по общепринятой методике.

Результаты и обсуждение

Ранее было установлено, что титр вируса болезни Ауески штамма «ВК» варьирует, в зависимости от времени его репродукции в перевиваемой линии клеток ВНК-21, в пределах $6,6\text{--}8,33 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Электронно-микроскопический анализ показал, что наибольшее количество полностью сформировавшихся вирионов присутствует в вирусном материале после 70

ч культивирования, концентрация вирусных частиц при этом составляла $10^{8,5}$ частиц/см³. Материал не содержал балластного белка и не был контаминирован микрофлорой.

Результаты, полученные при постановке непрямого иммуноферментного анализа, показали, что титр вирусного антигена в суспензии колебался от $1:1000\text{--}1:1000000$ в зависимости от времени репродукции в культуре клеток ВНК-21.

Результаты проведенных исследований представлены в виде графика.

Выводы

В результате проведенных исследований определены оптимальные сроки культивирования, которые составили 70 ч с наибольшим содержанием полноценных вирионов и концентраций вирусных частиц в исследуемом материале.

РЕЗЮМЕ

Проведены исследования по получению полноценного вируса болезни Ауески штамм «ВК» в культуре клеток ВНК-21.

Определены оптимальные сроки культивирования вируса, которые составили 70 ч с наибольшим содержанием полноценных вирусных частиц ($10^{8,5}$ частиц/см³). Полученный материал может быть использован при изготовлении диагностических и вакцинных препаратов для данного заболевания.

ABSTRACT

The experiments aimed at obtaining of the whole Aujeszky Disease virus strain "BK" on the BHK-21 cell line were carried out.

The optimal time periods for the virus cultivation were defined. They constituted 70 hours with the highest content of the whole viral particles ($10^{8,5}$ particles/cm³). The collected material can be used for the formulation of diagnostic and vaccine preparations against the disease.

Литература

- М.Н. Гусева. Разработка технологии изготовления инактивированной вакцины против болезни Ауески из штамма, делеционного по гликопротеину Е: автореф. дис....канд.биол.наук. Владимир, 1999.
- М.Н. Гусева, В.В. Михалишин, Т.И. Корпусова и др. Изучение динамики культивирования и стабильности при хранении делеционного мутанта по гликопротеину Е вируса болезни Ауески // Достижения молодых ученых в вет. практи.: матер. конф. Владимир, 2000.
- О.С. Моренков, Ю.А. Собко. Маркированные вакцины и дискриминирующие тесты — основа программ искоренения болезни Ауески // Аграрная Россия. 2002. № 2. С. 48–52
- А.В. Сергеев. Вирусные вакцины. Киев: Урожай, 1993.
- F.A. Osorio. Diagnosis of Aujeszky's disease // Proc. OIE Symposium. Tailand, Bangkok, 1994.
- G. Wittmann. Spread and control of Aujeszky's disease // Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 1991. V. 14, № 2. P. 165–173