

контрольных сывороток. Параметры расчета титров антител были внесены в разработанную компьютерную программу «СИНКО-ИФА» для учета, обработки и хранения результатов анализа.

ABSTRACT

ELISA-kits for the antibody quantification in chicken sera tested at the selected working dilutions were developed for serological diagnosis of the seven most significant infectious diseases in commercial poultry. Positive and negative thresholds, acceptable optical density values for negative and positive control sera were determined. Parameters for antibody titre calculation were introduced into the developed "SINKO-ELISA" software for recording, processing and storing of assay results.

Литература

1. Н.С. Мудрак, Т.В. Оковытая, Л.А. Щербакова и др. Оптимизация условий постановки непрямого твердофазного ИФА для выявления антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни // Вирусн. бол. с.-х. ж-ных: Тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф. Владимир, 1995. С. 245.
2. М.А. Волкова, Н.С. Мудрак, В.М. Гуленкин и др. Расчет титра сывороток по одному разведению при иммуноферментной диагностике ССЯ-76 // Пробл. инфекц. патол. с.-х. ж-ных: Тез. докл. конф., посвященной 100-лет. открытия вируса ящура. Владимир, 1997.
3. Н.Н. Луговская, Н.С. Мудрак, В.В. Дрыгин, А.В. Борисов. Иммуноферментная тест-система для определения антител к вирусу инфекционного бронхита кур // Роль вет. науки в развитии жив-ва: Матер. Междунар. науч.-произв. конф. Алматы, 2000. С. 139–140.
4. И.А. Волкова, Н.С. Мудрак, В.В. Дрыгин и др. Разработка тест-системы на основе непрямого варианта ИФА для определения антител к *Mycoplasma gallisepticum* при тестировании сывороток в одном разведении // Уч. зап. Витебск. гос. акад. вет. мед. Витебск, 2001. Т. 37, ч. 2. С. 23–24.
5. И.А. Волкова, М.С. Волков, Н.С. Мудрак и др. Разработка и применение тест-системы на основе непрямого иммуноферментного анализа для определения антител к возбудителю инфекционного синюшита в сыворотках крови кур методом одного разведения // Матер. Междунар. науч. конф., посвященной 45-лет. ФГУ ВНИИЗЖ. Владимир, 2003. С. 260–265.
6. Т.Б. Манин, С.К. Старов, В.В. Дрыгин и др. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления и количественной оценки антител к вирусу ньюкаслской болезни методом одного разведения // Матер. конф. молодых ученых. Владимир, 2000. С. 165–170.
7. А.И. Куприянов, Н.С. Мудрак, С.К. Старов, В.В. Дрыгин. Разработка непрямого варианта ИФА для количественного определения антител к возбудителю ареовирусной инфекции в сыворотках крови кур методом одного разведения // Матер. конф. молодых ученых. Владимир, 2000. С. 173–179.
8. Ю.В. Зинковский, Н.С. Мудрак, С.Н. Колосов, В.В. Дрыгин Зинковский, Ю.В. Компьютерная программа «Иммуноферментный анализ» // Матер. конф. молодых ученых. – Владимир, 2000. С. 173–179.
9. Z. Penzes, J. Meszaros. Comparison of different computational methods for measuring antibodies to avian infectious bronchitis virus in single serum dilution // Acta Vet. Hungar. 1992. V. 40, N 4. P. 311–321.
10. D.B. Snyder. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. 2. Comparison of computational methods for measuring antibody titre in a single serum dilution // Avian Dis. 1983. V. 27. P. 474–484.
11. D.B. Snyder, W.W. Marquardt, E.T. Mallinson et al. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. 3. Simultaneous measurement of antibody titres to infectious bronchitis, infectious bursal disease and Newcastle diseases viruses in a single serum dilution // Avian Dis. 1984. V. 28. P. 12–24.

УДК 619:57082.26.001.8

Н.И. Герасимова, С.К. Старов, В.Н. Герасимов

РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОГО СПОСОБА ПОДДЕРЖАНИЯ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК СПЭВ, GH-91, VERO

Введение

Использование метода непрерывного пассирования клеточных культур, как одного из эффективных способов поддержания их высокой пролиферативной активности, сопряжено с вероятностью контаминации, излишними затратами. Чаще всего используется комбинированный метод поддержания культур. Однако в процессе хранения перевиваемые культуры клеток снижают первоначальную пролиферативную активность, которая может

быть восстановлена в течение 3–4 последовательных пассажей [2, 5, 10, 1]. Известен ряд приемов активизации роста клеток, хранившихся при различных температурах: повышение концентрации в питательной среде сыворотки крови животных, в том числе и от новорожденных плодов [6, 7].

Из-за риска контаминации используют сыворотки, обработанные полиэтиленгликолем [3], при этом утрату седиментированных компонентов сыворотки до-

полняют синтетическими элементами и препаратами [4, 9, 8].

В задачу исследований входило решение вопросов повышения пролиферативной активности хранившихся культур клеток из коллекции ВНИИЗЖ за счет комбинированного использования сыворотки крови взрослого крупного рогатого скота (КРС) и крови новорожденных телят.

Материалы и методы

Для исследований были взяты перевиваемые линии клеточных культур: почка зеленой мартышки (VERO), гонады козы (GH-91), свиная почка эмбриональная версенезированная (СПЭВ).

Культуры клеток выращивали в стационарных условиях в плоских стеклянных сосудах и во вращающихся 3-литровых круглых бутылках на роллерных установках с использованием питательной среды Игла и 5% сыворотки крови КРС 12 коммерческих серий, полученных из различных предприятий России и Белоруссии.

Наличие живых клеток устанавливали способом окрашивания их трипановым синим и подсчетом в камере Горяева по известной формуле.

Результаты исследований

Клеточные культуры пересеивали с кратностью посева 1:3, плотный монослой формировался к 72 ч после посева клеток с содержанием 300–500 тыс. кл. / см².

В периоды между циклами масштабирования [10–15 суток] культуры сохраняли при +4° С в стеклянных сосудах в объемах 500–2000 см³ в концентрации 500–3000 тыс. кл./мл на среде Игла с 10% сыворотки крови КРС.

В процессе выдерживания при +4° С в культурах сохранялось 80–90% жизнеспособных клеток.

После хранения на этапах восстановления ростовой активности клеточные культуры СПЭВ, GH-91, Vero пересеивали последовательно в течение 3–5 пассажей на аналогичной среде в тех же условиях, как

и до хранения (перерыва серийного пассирования), при этом дополнительно в ростовую среду Игла вносили 2,5 или 5% сыворотки крови плодов КРС.

Ростовую активность клеток оценивали по времени формирования монослоя, по приросту количества клеток на единицу площади при неизменной посевной концентрации (150–200 тыс. кл./мл).

В результате исследований установлена коррелятивная зависимость концентрации дополнительно вносимой сыворотки телят на пролиферативную активность хранившихся перевиваемых культур клеток различных видов животных (свиньи, козы и обезьяны).

Внесение в ростовую среду Игла дополнительно 2,5% сыворотки крови новорожденных телят приводило к увеличению скорости образования монослоя к 60 ч инкубирования при плотности клеток 0,3–0,5 млн/см² на уровне 2–3 пассажей.

Внесение в ростовую среду Игла дополнительно 5% сыворотки крови плодов телят способствовало ускорению формирования плотного монослоя к 60 ч культивирования при плотности клеток 0,4–0,6 млн/см² на уровне 2–3 пассажей.

В контролях клеточные культуры при условии выращивания на среде Игла с 5–10% сыворотки одной из 12 испытанных серий восстанавливали первоначальную ростовую активность к 3–4 пассажу, образовывали монослой к 72 ч инкубирования, обеспечивали прирост клеток до 0,3–0,6 млн/см².

Выводы

В результате проведенных исследований показана возможность прерывания технологии непрерывного масштабирования клеточной биомассы, быстрого восстановления пролиферативной активности перевиваемых клеток СПЭВ, GH-91, Vero, при комбинированном использовании сыворотки крови взрослого крупного рогатого скота и крови новорожденных телят КРС в составе питательной среды Игла.

РЕЗЮМЕ

Показана возможность изменения способа поддержания перевиваемых клеточных культур, проведения прерывания масштабирования клеточной биомассы, быстрого восстановления пролиферативной активности культивируемых клеток почки свиньи, гонад козы, почки зеленой мартышки, повышения их репродуктивной активности после хранения при +4° С продолжительностью до 15 суток за счет комбинированного использования сыворотки крови взрослого крупного рогатого скота и крови новорожденных телят.

SUMMARY

The following opportunities are demonstrated in this work: variation of process of maintaining passaged cell cultures, conducting interruption of cell biomass scaling, fast recovery of proliferative activity of cultured porcine kidney cells, goat gonads, Vero cells, increase of their reproductive activity after storage at +4° C for 15 days by means of combined use of adult cattle blood sera and newborn calves blood.

Литература

1. Р. Адамс. Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир, 1983. 264 с.
2. С.М. Адуева, Р.Я. Подчерняева. Биотехнологические методы культивирования клеток // Актуал. пробл. вирусол.: тез. докл. науч. конф. п. Гвардейский, 1994. Ч. 1. С. 11–12.
3. Л.А. Алиева, Г.Н. Завьялова, А.Ф. Бондаренко и др. Использование безсыывороточной среды и среды с сыывороткой, образованной полиэтиленгликолем для культивирования клеток ВНК-21 // Актуал. пробл. вет. вирусол.: тез. докл. науч. конф. Владимир, 1983. С. 6–7.
4. А.Н. Децина, Т.П. Прошкова, Л.Д. Мартынец, М.А. Андреева. Повышение ростстимулирующей активности сыыворотки КРС, обработанной ПЭГ // Культивирование клеток животных и человека: тез. докл. 3 Всесоюз. совещания, г. Пушкино, М., 1990. С. 21–22.
5. Л.П. Дьяконов, В.Ф. Глухов, А.А. Поздняков и др. Культура клеток и тканей животных: учебно-метод. пособие. Ставрополь, 1980. Ч. 1. 111 с.
6. Под ред. Л.П. Дьяконова, В.И. Ситкова. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии). М.: Компания Спутник, 2000. 400 с.
7. Т.А. Костина, О.П. Аверихин, И.Ф. Радеева, М.Ю. Максимова. Сыыворотки крови различных животных для культивирования линий клеток и вирусов. Питательные среды и сыыворотки для культивирования клеток // Тез. докл. Всесоюз. конф. Новосибирск, 1991. С. 26.
8. В.Т. Ночевный. Оптимизация процессов производства культур клеток и вирусов в суспензии переживающих тканей: дис. д-ра биол. наук в форме доклада. М., 1994. 49 с.
9. Методы культивирования клеток: сб. науч. тр. Л.: Наука, 1988. 296 с.
10. А.С. Пригода, А.И. Коренева, Е.Ю. Коновалова и др. Конструирование безсыывороточных питательных сред для культивирования клеток млекопитающих. 4. Культивирование в биореакторах перевиваемой линии клеток ВНК-21 на малосыывороточных питательных средах // Биотехнология. 1991. № 5. С. 55–58.
11. Под. ред. Р.Е. Спирса, Дж. Б. Гриффитса; пер. с англ. Биотехнология клеток животных. Т. 1–2. М.: Агропромиздат, 1989. 822 с.

УДК 619:578.823.91:636.22/.28.001.8

Г.С. Скитович, Г.Н. Дороненкова, С.А. Чупин, Л.Б. Прохвятилова

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ РОТАВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Введение

Ротавирусы являются наиболее распространенным этиологическим агентом острых гастроэнтеритов крупного рогатого скота (КРС). Ущерб, причиняемый ротавирусами, складывается из отставания в росте и гибели животных. В силу высокой контагиозности ущерб особенно ощутим в животноводческих хозяйствах промышленного типа. Результаты проведенных за последние годы исследований патологического материала на наличие кишечной инфекции свидетельствуют о широкой циркуляции ротавирусов в хозяйствах РФ [1, 2, 3]. Доказана широкая диссеминация ротавирусов КРС среди животных разных видов и наличие антител у грызунов (морских свинок, крыс, хомяков, мышей) [5].

Важным условием успешной борьбы с ротавирусной инфекцией является своевременная и правильная диагностика заболевания, для чего необходимы эффективные диагностические методы, в том числе иммуноферментный анализ (ИФА) [4]. Необходимым условием для разработки тест-систем на основе ИФА является получение соответствующих антигенов, обладающих высокой специфической активностью, что в свою очередь предполагает выделение изолятов в культуре клеток с дальней-

шим изучением их иммунобиологических свойств.

В ходе данной работы было проведено выделение двух изолятов ротавируса КРС в культуре клеток и изучены их биологические свойства.

Материалы и методы

Выделение вируса. Из фекалий готовили 10% суспензию в растворе Хенкса с последующим осветлением путем центрифугирования. Надосадочную жидкость пропускали через фильтры “Миллипор” (США) с диаметром пор 0,22 мкм. К фильтрату добавляли пенициллин (1000 ед/см³), стрептомицин (1000 мкг/см³) и гентамицин (200 мкг/см³). Фильтрат фекалий, предварительно обработанный раствором трипсина в конечной концентрации 10 мкг/см³, вносили во флаконы с монослоем клеток. После адсорбции вируса в течение 60 мин при температуре 37° С монослой клеток двукратно отмывали раствором Хенкса и добавляли поддерживающую среду Игла без сыыворотки, содержащую трипсин в концентрации 1 мкг/см³. Зараженную культуру клеток ежедневно просматривали в световом микроскопе и по истечении 7 дней замораживали. Последующие пассажи проводили подобным образом.

Титрование вируса. Определение ин-