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 безсывороточной среды и среды с сывороткой, 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 сыворотки 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. Ситькова. 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. Сыворотки крови различных животных для культивирования линий клеток и вирусов. Питательные среды и сыворотки 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 безсывороточных питательных сред для культивирования клеток млекопитающих. 4. Культивирование в биореакторах перевиваемой линии клеток ВНК-21 на малосывороточных питательных средах // Биотехнология. 1991. № 5. С. 55–58.
11. Под ред. Р.Е. Спирера, 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 сыворотки, 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-

фекционности выделенных изолятов проводили титрованием по цитопатическому действию в монослое клеток Mark-145 и выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Результаты учитывали согласно методу Рида и Менча.

Гипериммунные сыворотки. Гипериммунные сыворотки на выделенные изоляты получали путем 3-кратной гипериммунизации концентрированным и очищенным антигеном лабораторных животных: кроликов и морских свинок. Полученные гипериммунные сыворотки инактивировали прогреванием при 56°C в течение 30 мин.

ИФА. Определение противовирусных антител в сыворотках крови кроликов и морских свинок осуществляли методом непрерывного иммуоферментного анализа.

РН. Реакцию нейтрализации проводили в перевиваемой культуре клеток Mark-145, используя серийные двукратные разведения сыворотки и постоянную дозу вируса ($200 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$).

Результаты и обсуждение

Ранее нами было выявлено, что в РФ преобладают ротавирусы КРС G-типов: G6 — 47%, G8 — 30%, G10 — 19% и P-типов: P5 — 48%, P11 — 33%. Реже встречаются ротавирусы P-типов: P1 и P7. Для разработки диагностических наборов необходимо иметь лабораторные штаммы, чьи характеристики соответствуют полевым изолятам, циркулирующим в хозяйствах. Ранее нами был выделен в культуре клеток МДВК штамм ротавируса КРС “TE87”, относящийся к серотипам G8P7.

При анализе патологического материала, поступившего на исследование из хозяйств Владимирской области, где отмечены вспышки заболеваний с диарейным синдромом, были выявлены два изолята ротавируса КРС, обозначенных Собинка/10/99/В и Юрьев/03/00 и охарактеризованных в ПЦР типами G10P11 и G6P5 соответственно.

Чтобы расширить спектр изолятов, используемых при лабораторной диагностике, решено было выделить данные изоляты в культуре клеток.

Были использованы следующие монослойные перевиваемые культуры клеток: почки эмбриона коровы (МДВК), почки макаки-резус (Mark-145), гонады козы (КГ-91), почки кролика (РК15). После проведения трех последовательных пассажей выявили, что для изолята Юрьев/03/00 более чувствительной культурой клеток является МДВК, а для изолята Собинка/10/99/В — Mark-145.

Всего на данных культурах с каждым изолятом было проведено по 10 пассажей. Первые два пассажа характеризовались отсутствием цитопатического действия. К третьему пассажиру оба изолята вызывали видимое, однако нехарактерное для ротавирусов, ЦПД в культуре клеток. Для доказательств специфичности ЦПД РНК, выделенная из культуральной жидкости, была исследована методом электрофореза геномных сегментов в агарозном геле. На электрофореграмме была видна картина разделения геномных сегментов, характерная для ротавируса.

Время проявления ЦПД уменьшалось от третьего до восьмого пассажа со 168 до 96 ч и оставалось неизменным в девятом и десятом пассажах. На уровне 7-го пассажа изоляты Собинка/10/99/В и Юрьев/03/00 вызывали характерные цитопатические изменения в более 50% клеток, проявляющиеся в виде склеивания клеток, отслоения клеток и разрушения монослоя, и накапливались в титрах более $4,5\text{--}5,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $5,0\text{--}5,3 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. Конечная картина ЦПД выражалась в гибели клеток, отслоении их в культуральную жидкость и наличии на поверхности роста отдельных тяжей и фрагментов. Инфекционная активность изолятов Собинка/10/99/В и Юрьев/03/00 на уровне 10 пассажа составила $6,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно.

Антигенная активность выделенных изолятов в сэндвич-варианте ИФА с использованием сывороток крови, полученных на штамм TE87, составила 1:40 для изолята Собинка/10/99/В и 1:100 для изолята Юрьев/03/00.

На данные изоляты были получены гипериммунные сыворотки на лабораторных животных (кролики и морские свинки).

Титр антител в сыворотках крови кроликов в реакции нейтрализации для изолятов Собинка/10/99/В и Юрьев/03/00 составил $11,6 \log_2$ и $8,3 \log_2$ в ИФА — $13,5 \log_2$ и $10,4 \log_2$ соответственно. Титр сывороток крови морских свинок в реакции нейтрализации для изолятов Собинка/10/99/В и Юрьев/03/00 составил $11,4 \log_2$ и $8,8 \log_2$ соответственно, в ИФА — $12,1 \log_2$ и $10,0 \log_2$ соответственно.

Выделенные изоляты ротавируса КРС в настоящее время используются в качестве положительного контроля в ПЦР на ротавирусы КРС различных серотипов. Предполагается использование данных изолятов в качестве производственных для получения антигенов и специфических сы-

вороток с целью разработки тест-систем на основе ИФА.

Выводы

Таким образом, в культуре клеток были выделены два изолята ротавируса КРС — Юрьев/03/00 и Собинка/10/99/В. Данные изоляты характеризуются высокими титрами инфекционной активности, вызывая характерное для ротавирусов ЦПД в культуре клеток, а также стабильно сохраняют

РЕЗЮМЕ

В перевиваемой культуре клеток из патологического материала выделено 2 полевых изолята ротавируса крупного рогатого скота (КРС). Изучены культуральные свойства изолятов. Получены гипериммунные сыворотки на лабораторных животных.

ABSTRACT

Two field isolates of bovine rotavirus were isolated in a continuous cell culture from pathological samples. Cultural characteristics of the isolates were studied. Hyperimmune sera were obtained from laboratory animals.

Литература

1. Г.Н. Дороненкова, С.А. Чупин, А.М. Тимина и др. Выделение ротавируса крупного рогатого скота в культуре клеток // Биотехнология. 2004. № 4. С. 47–52.
2. Л.Г. Рамишвили, Г.Г. Рухадзе, Е.А. Непоклонов и др. Серийное пассирование ротавируса крупного рогатого скота в гетерологичной культуре клеток // Вопр. вирусол. 1991. № 6. С. 521–523.
3. В.Г. Скибицкий, О.Г. Проценко. Серологическое обследование крупного рогатого скота на наличие противоротавирусных антител // Профилактика и меры борьбы с болезнями молодняка с.-х. животных: тез. докл. науч.-произв. конф. Минск, 1990. С. 10.
4. С.А. Чупин, Г.Н. Дороненкова, В.А. Кудрявцев и др. Выявление ротавирусов крупного рогатого скота группы А и дифференциация их основных G-серотипов с помощью ПЦР // Актуал. пробл. патол. свиней, крупного и мелкого рогатого скота: матер. конф. молодых ученых. Владимир, 2000. С. 184–190.
5. A.Z. Kapikian, R.M. Chanock. Rotaviruses // Fields Virology 3rd – ed. Philadelphia. 1996. P. 1657–1708.