

УДК 619:616.988.27.; 619:612.017.003.12

ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСУ ЧУМИ М'ЯСОЇДНИХ В ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ

О.С. Ташута,* аспірант, В.Г. Скибіцький, доктор ветеринарних наук,
С.Г. Ташута, кандидат ветеринарних наук

Встановлено, що вірус чуми м'ясоїдних репродукуючись у курячих ембріонах та первинно-трипсинізованій культурі клітин фібробластів курячих ембріонів спричиняє їх загибель і патолого-анатомічні зміни та проявляє цитопатичну дію в заражених культурах клітин. Урожаї вірусу чуми м'ясоїдних сягають значень $10^{6,61}$ ТЦД_{50/мл}.

Чума м'ясоїдних, трансфер-фактор, вірус, курячі ембріони, культура клітин, фібробласти курячих ембріонів, цитопатична дія.

Чума м'ясоїдних (ЧМ) залишається актуальною проблемою для ветеринарної науки і практики в багатьох країнах світу. Захворювання завдає звірівницьким господарствам, розплідникам службового собаківництва та власникам собак величезних економічних збитків. Для специфічної профілактики цього захворювання використовують живі культуральні вакцини (моно- та полівалентні) із аттенуйованих штамів збудника. Ефективність вакцинації при чумі м'ясоїдних багато в чому залежить від схеми імунізації щенят, якості вакцини та імунологічного статусу щеплених тварин. Використання вакцинних препаратів для профілактики чуми не завжди призводить до очікуваного ефекту. Незважаючи на інтенсивну терапію, тварини нерідко гинуть. Тому необхідно знаходити надійніші засоби профілактики та терапії при чумі м'ясоїдних. Співробітники кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології

*Науковий керівник – доктор ветеринарних наук В.Г. Скибіцький

© О.С. Ташута, В.Г. Скибіцький, С.Г. Ташута, 2008

Національного аграрного університету мають певний досвід в отриманні ефективних зразків трансфер-фактору специфічного, зокрема проти збудника сказу, ротавірусної та коронавірусної інфекції великої рогатої худоби і деяких інших. Препаратів на основі згаданого фактора при чумі м'ясоїдних поки що не розроблено. У зв'язку з цим нами запропоновано ряд досліджень щодо його отримання. На першому етапі досліджень здійснили оптимізацію культивування двох штамів збудника ЧМ (шт. 668-КФ і ізолят ТС-2) з метою отримання препаративної кількості вірусної сировини.

Як свідчать дані літератури, виділення та культивування вірусу чуми м'ясоїдних у лабораторних умовах особливо в культурі клітин (КК) викликає певні труднощі [1, 2, 4, 5]. Загальновизнаними нині є методики з адаптації і тривалого культивування вірусу чуми в курячих ембріонах (КЕ) [2, 3, 5]. Для отримання високих урожаїв вірусу на курячих ембріонах, їх, як правило, заражають у хоріонантоїсну оболонку, де вірус спричиняє патологічні зміни [5, 9]. Культивувати вірус ЧМ вдається також при зараженні курячих ембріонів в алантоїсну порожнину і жовтковий мішок. Різні штами вірусу чуми, адаптовані до курячих ембріонів, спричиняють однакові за характером, але різні за інтенсивністю зміни. Титр вірусу на курячих ембріонах досягає 10^5 – 10^7 ЕІД_{50/мл} [2, 4, 5, 8].

Репродукуючись в культурі клітин, вірус чуми м'ясоїдних спричиняє ураження інфікованого моношару — цитопатичний ефект (ЦПЕ), який характеризується двома типами клітинної дегенерації. Перший тип проявляється появою зернистих клітин, збільшенням рефрактильності і заокругленням клітин з подальшим відокремленням їх від моношару [2, 4, 6] і характерний для адаптованих до культури клітин штамів вірусу чуми. Другий характеризується утворенням симпластів і спостерігається у перших пасажах при адаптації [10].

Мета дослідження – оптимізувати умови культивування вірусу чуми м'ясоїдних у культурі клітин та в курячих ембріонах для отримання великої кількості вірусної маси і максимального титру біологічної активності.

Матеріали та методи. В своїх дослідах ми використовували вірус чуми м'ясоїдних: ізолят ТС-2[5] та вакцинний штам 668-КФ, люб'язно наданий нам колегами ДНКІБШМ. Було проведено сім пасажів ТС-2 та чотири пасажі 668-КФ. Їх здійснювали, використовуючи різні методи зараження КЕ (в алантоїсну порожнину, на хоріоналантоїсну оболонку та одночасно вводили матеріал на ХАО і в алантоїсну порожнину). Залежно від методу зараження вік КЕ коливався від 8 до 10 днів. Для кожного пасажу вірусу використовували не менше 6 КЕ. Ідентифікацію адаптованого до КЕ вірусу ізоляту ТС-2 здійснювали за допомогою діагностичного набору для виявлення антигену чуми м'ясоїдних імуноферментним аналізом виготовленим НВО "Нарвак" Росія ТУ 9388-016-044525703-2000.

Загальновідомо, що найбільш вдалою біологічною системою для виділення та культивування вірусів є культура клітин (КК). Використання її виключає видові обмеження культивування вірусів, оскільки *in vitro* можна вирощувати практично будь-які клітини різних видів тварин. В лабораторній практиці найуживанішими є первинні культури клітин та постійні клітинні лінії (перещеплювані КК). Первинні культури є високочутливими до вірусів і їх, як правило, використовують для виділення вірусів, які погано адаптуються до лабораторних умов культивування. Поряд із цією перевагою, первинні культури мають і суттєвий недолік – вимагають багато часу для їх приготування та можуть містити латентні віруси.

Фібробласти курячих ембріонів (ФКЕ) отримували із зародків 9-11 денних КЕ за відомою методикою [7] з деякими нашими модифікаціями [6]. Суспензію трипсинізованих клітин на ростовому середовищі (RPMI + 10% сироватки крові ВРХ) висівали в одноразові полістиролові матраци фірми Sarstedt, США, об'ємом 25 та 75 см³. Клітинний

моношар ФКЕ формувався, як правило, через 20-36 годин після висіву. Для оптимізації процесу приготування фібробластів курячого ембріону ми дещо скорегували загально визнані методики приготування, таким чином, щоб не знижуючи якості культури виграти в часі та спростити сам процес приготування. В досліджах випробовували різні концентрації трипсину, визначали оптимальний час дії його на тканини ембріону та визначали при якому температурному режимі процес трипсинізації є найбільш ніжним по відношенню до клітин, а вихід їх був би максимальним.

Для визначення титру вірусу клітини ФКЕ висівали у спеціальні одноразові полістиролові 96-лункові планшети із плоским дном фірми Sarstedt, США. Після формування клітинного моношару заражали 10-ти кратними розведеннями відповідного вірусу (10^{-2} - 10^{-9}). Кожним розведенням вірусу заражали по 8 лунок з клітинним моношаром. Інкубацію полістиринових планшет здійснювали при температурі 37°C та в атмосфері із підвищеною концентрацією CO_2 . Через 120 годин після зараження ФКЕ враховували результати титрування під малим ($\times 56$) збільшенням мікроскопу. Для визначення оптимального часу культивування вірусу в культурі клітин ФКЕ проводили визначення інфекційних титрів вірусу ЧМ перевіряючи їх значення через 24, 48, 60, 72, 84, 96 та 120 годин після зараження культури клітин вірусом. Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за методом Ріда і Менча (1934 р.).

Наявність гемаглютиніну в алантоїсній та амніотичній рідині, суспензії зародків КЕ, ХАО, культуральній рідині визначали в РГА з 1%-ною суспензією еритроцитів півня чи курчати.

Результати досліджень. Проведені дослідження показали, що найбільш вдалою концентрацією 0,25%-ного трипсину є його розведення живильним середовищем 1:10, причому до подрібнених шматочків ембріона спочатку необхідно додати 9 частин живильного середовища і лише потім 0,25%-ний розчин трипсину. При такому розведенні трипсину

та при температурі навколишнього середовища в межах $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ за 50-60 хв. відбувається максимальний вихід життєздатних клітин. Після цього дію трипсину слід призупинити внесенням у суспензію клітин 10% сироватки крові великої рогатої худоби. Потім колбу ставлять під кутом на 2-3 хв., так, щоб на дно її осіли великі часточки, після цього обережно зливають надосадову рідину в матрац та ретельно розмішують шляхом піпетування. Найбільшу кількість живих фібробластів вдається отримати при температурі $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ за умови вмісту трипсину в розчині у концентрації 0,025% (50-60 хв. трипсинізації) (табл.1). Проведені дослідження показали, що оптимальною посівною концентрацією клітин є 450000 ± 120000 клітин/см³. Клітинний моношар фібробластів курячих ембріонів формується через 20-36 год. інкубації матраців при температурі 37°C (Рис.1).

1. Вихід живих клітин в 1 см³ при приготуванні фібробластів курячого ембріону. $M\pm m$, $n=10$

Концентрація трипсину, %	Температура $^{\circ}\text{C}$	Тривалість дії трипсину на клітини КЕ, хв.				
		30	40	50	60	75
0,125	25 ± 2	420000 ± 29000	270000 ± 33500	140000 ± 12500	120000 ± 17500	87000 ± 9700
	36 ± 1	335000 ± 22700	268000 ± 19500	110000 ± 11200	79000 ± 9750	42000 ± 7700
0,05	25 ± 2	550000 ± 77000	320000 ± 48000	220000 ± 40000	155000 ± 24000	120000 ± 34500
	36 ± 1	320000 ± 26600	290000 ± 21700	220000 ± 19500	187000 ± 12500	144000 ± 9900
0,025	25 ± 2	215000 ± 34000	320000 ± 25000	520000 ± 40000	635000 ± 35000	450000 ± 36000
	36 ± 1	470000 ± 22800	450000 ± 26700	390000 ± 19600	342000 ± 21000	244000 ± 14200

$P < 0,001$ Р (к-д)

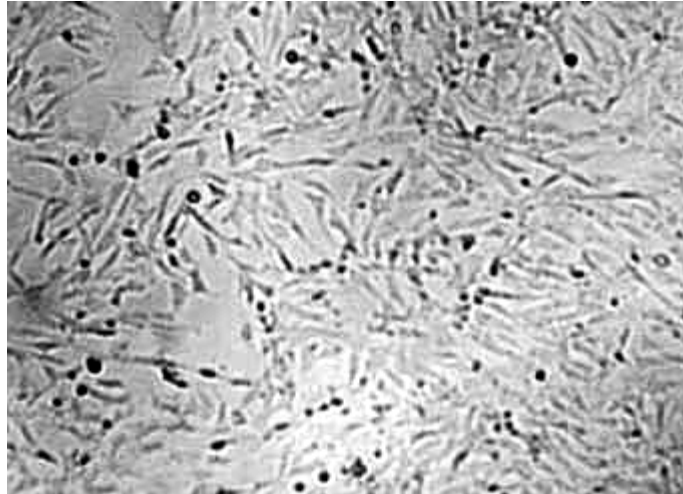


Рис. 1. Фібробласти курячого ембріона (20 год. після висівання) × 90.

2. Титр біологічної активності вірусу чуми м'ясоїдних залежно від часу культивування його в культурі клітин ФКЕ

Час культивування, год	Титр вірусу ТЦД _{50/мл} (lg)	
	Ізолят ТС-2	Шт. 668-КФ
24	2,42	3,59
48	4,57	4,89
60	4,71	5,38
72	4,82	6,38
84	5,19	6,61
96	5,12	6,22
120	4,19	5,29

Таким чином, завдяки вилученню із процесу трипсинізації таких загальноприйнятих маніпуляцій, як центрифугування та фільтрація, нам вдалося суттєво скоротити витрати часу без помітної втрати життєздатних клітин. Отримані нами фібробласти КЕ виявилися чутливими до вірусу чуми м'ясоїдних.

Ознаками ураження КЕ ізолятом ТС-2 та шт. 668-КФ вірусу чуми м'ясоїдних були загибель, патолого-анатомічні зміни, які проявлялися крововиливами головним чином на голові зародка (рис.2), змінами на ХАО – помутнінням, крововиливами (крапчастими і розлитими) та набряком оболонки (рис.3).

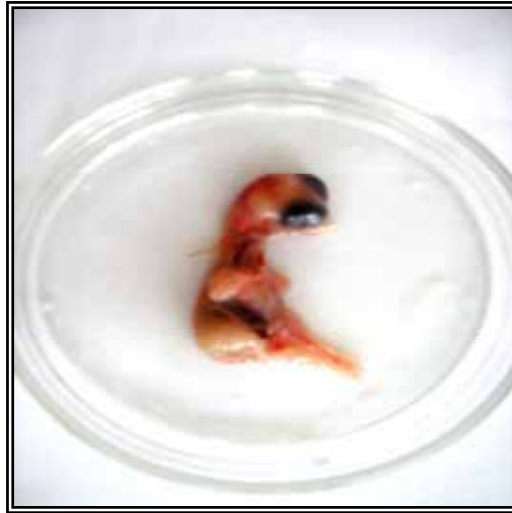


Рис.2. Крововиливи на голові зародка курячого ембріона.



Рис. 3. Патологоанатомічні зміни на ХАО курячих ембріонів заражених вірусом чуми м'ясоїдних
 А – набряк та розлитий крововилив на ХАО
 Б – крапчасті крововиливи на ХАО КЕ
 К – контроль.

Розмножуючись в КЕ вірус не проявляв гемаглютинуючих (ГА) властивостей протягом перших чотирьох пасажів. Тільки з п'ятого пасажу вірус почав проявляти ГА властивості. Гемаглютинін у суміші 10%-ної суспензії, приготовленій із тканин зародка, алантоїсної рідини та ХАО виявлявся в титрі 1:4. Проте накопичення гемаглютиніну в згаданих компонентах КЕ було різним. Так, в алантоїсній рідині він не виявлявся взагалі, а найбільша концентрація відмічалася в суспензії, отриманій із гомогенізованої ХАО. Титр гемаглютиніну вже в п'ятому пасажі становив 1:16. Штам 668-КФ вірусу ЧМ не проявляв гемаглютинаційної

активності. Не встановлено суттєвої різниці в методах зараження КЕ вірусом. Інфекційний титр ізоляту ТС-2 вірусу на рівні сьомого пасажу становив $10^{5,24}$ ЕЛД_{50/мл}. Загибель КЕ відмічали, як правило, через 5-8 діб після їх інфікування.

Реплікація ізоляту ТС-2 і шт. 668-КФ вірусу ЧМ в культурі клітин ФКЕ супроводжувалась чітким цитопатичним ефектом (ЦПЕ), який спостерігали у цій культурі у першому пасажі. Зумовлений вірусом ЦПЕ характеризувався округленням клітин. Клітини ставали рефрактильними та відшаровувались від скла. Протягом 72-96 год. після зараження моношар клітин повністю руйнувався.

Перші ознаки цитопатичної дії (округлення частини клітин) проявлялися через 30-36 год. після зараження (рис. 4), а 50%-на цитопатична дія вірусу в зараженій культурі клітин відмічалася вже через 48-60 год. Максимальна цитопатична дія (ЦПД) вірусу на клітинний моношар відмічалася через 80-96 год. (рис. 5). В цей час спостерігали повну деструкцію всього клітинного моношару, яка проявлялася повним або майже повним відторгненням ушкоджених вірусом клітин від поверхні скла в культуральне середовище.

Культуральна рідина заражених ізолятом ТС-2 вірусу ЧМ культур клітин містила гемаглютинін до еритроцитів півня, але титри його не перевищували значень 1:16. Специфічна сироватка проти ЧМ затримувала гемаглютинацію.

Для визначення оптимальних термінів інкубування заражених вірусом культури клітин фібробластів курячих ембріонів ми припиняли інкубування їх у термостаті і через 24, 48, 60, 72, 84, 96 та 120 год. тричі заморожували, в кожному відібраному матеріалі визначали біологічний титр.

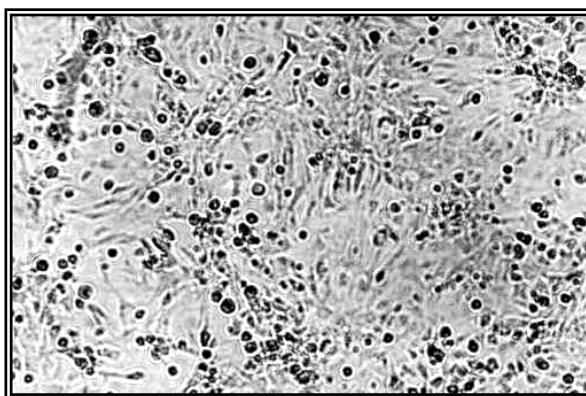


Рис. 4. ЦПД шт. 668–КФ вірусу чуми м'ясоїдних у культурі клітин ФКЕ через 36 год. після зараження. $\times 90$.

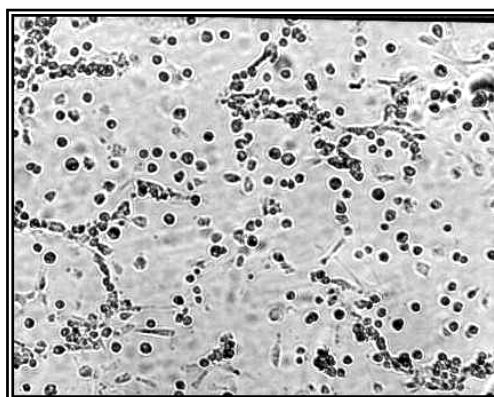


Рис. 5. ЦПД шт. 668–КФ вірусу чуми м'ясоїдних у культурі клітин ФКЕ через 84 год. після зараження. $\times 90$.

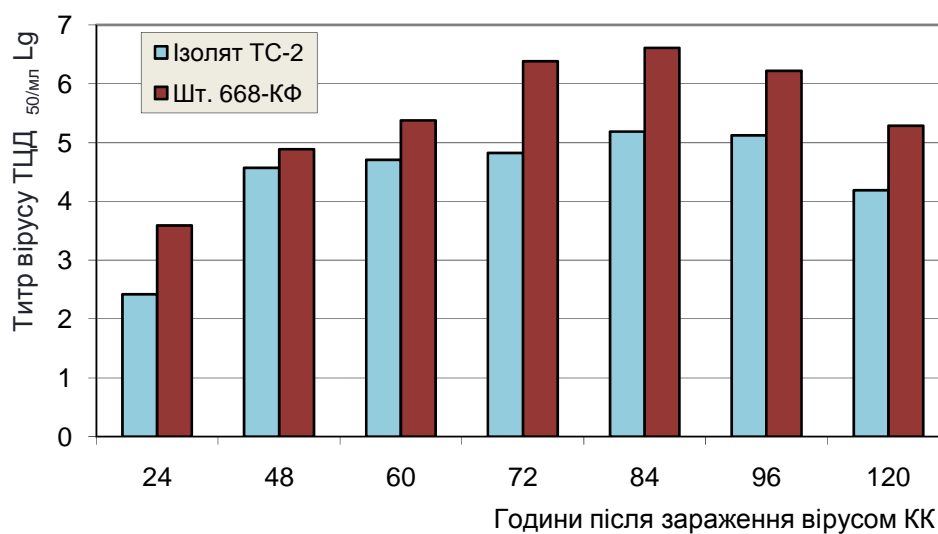


Рис. 6. Титр вірусу чуми м'ясоїдних залежно від тривалості культивування його в культурі клітин ФКЕ

Результати проведених досліджень показують, що вірус ЧМ у найвищих титрах виявляється при культивуванні його протягом 72-84 год. Надалі титр вірусу поступово знижується (табл.2, рис.6). Збільшення строку інкубації призводить до інактивації вірусу під дією температури.

ВИСНОВКИ

1. Оптимізована методика культивування вірусу чуми м'ясоїдних (шт. 668-КФ та ізолят ТС-2) дозволяє отримати в умовах лабораторії вірус у концентрації, достатній для проведення подальших досліджень в плані розробки технології препаратів на основі трансфер-фактора активного імунітету.

2. При розмноженні вірусу в КЕ він спричиняє загибель їх, а також патолого-анатомічні зміни зародка і ХАО.

3. Вірус чуми м'ясоїдних розмножується в КЕ за різних способів інокуляції, але урожайність його збільшується при зараженні КЕ на ХАО або в жовтковий міхур;

4. Оптимальним часом культивування вірусу в культурі клітин фібробластів курячого ембріона є 72-84 год. з моменту зараження клітинного моношару.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белов А.Д., Данилов Е.П. Болезни собак. — М.: Колос, 1995. — С. 259-273.

2. Л.Є. Корнієнко. В.В. Власенко, Б.М. Ярчук, Л.М. Корнієнко. Чума м'ясоїдних. — Біла Церква, 2000. — 129 с.

3. Л.І. Пархоменко, О.В. Ільїна. Первинна ізоляція вірусу чуми м'ясоїдних від собак. Науково-теоретичний збірник Вісник ДАУ. — 2007. — №2(19), т.1. — С. 141-145.

4. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомин Н.В. Вирусные болезни животных. — М.: ВНИТИБП, 1998. — 928 с.

5. Ташута О.С., Ташута С.Г. Адаптація вірусу чуми м'ясоїдних до курячих ембріонів. / Тез. допов. конф. професорсько-викладацького складу і аспірантів ННІВМЯіБ АПК НАУ. — К.: Видавничий центр НАУ. —2005. —С. 82.

6. Ташута О.С., Ташута С.Г. Прискорений метод приготування первинно-трипсинізованої культури клітин фібробластів курячого ембріона та використання цієї культури для культивування вірусу чуми м'ясоїдних. / Тез. допов. конф. професорсько-викладацького складу і аспірантів ННІВМЯіБ АПК, НАУ. — К.: Видавничий центр НАУ. —2005. —С. 83.

7. Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. — М.: Колос, 1999. — 270 с.

8. Pardo, I. D. R., Johnson, G. C., Kleiboeker, S. B. Phylogenetic Characterization of Canine Distemper Viruses Detected in Naturally Infected Dogs in North America. //J. Clin. Microbiol. — 2005. —№43. — P. 5009-5017.

9. Robert H. Bussell and David T. Karzon. Canine distemper virus in chick embryo cell culture: Plaque assay, growth, and stability. //Virology. — 1962. —Vol.18, Issue 4, — P.589-600.

10. Seki, F., Ono, N., Yamaguchi, R., Yanagi, Y. Efficient Isolation of Wild Strains of Canine Distemper Virus in Vero Cells Expressing Canine SLAM (CD150) and Their Adaptability to Marmoset B95a Cells. //J. Virol. — 2003. —№77. — P. 9943-9950.

11. Suter, S.E., Chein, M.B., von Messling, V., Yip, B., Cattaneo, R., Vernau, W., Madewell, B.R., London, C.A. In vitro Canine Distemper Virus Infection of Canine Lymphoid Cells: A Prelude to Oncolytic Therapy for Lymphoma. //Clin. Cancer Res. —2005. —№11. — P. 1579-1587.

Оптимизация параметров культивирования вируса чумы плотоядных в лабораторных условиях

A.C. Tashuta, аспирант, В.Г. Скибицкий, доктор ветеринарных наук,

С.Г. Ташута, кандидат ветеринарных наук

Установлено, что вирус чумы плотоядных репродуцируясь в куриных эмбрионах и первично-трипсинизированой культуре клеток их фибробластов приводит к их гибели и патолого-анатомическим изменениям, проявляет цитопатическое действие в зараженных культурах клеток. Урожайи вируса чумы плотоядных достигают значений $10^{6,61}$ ТЦД_{50/мл}.

Чума плотоядных, трансфер-фактор, вирус, куриные эмбрионы, культура клеток, фибробласты куриных эмбрионов, цитопатическое действие.

Optimization of Parameters of Scultivation of Virus Plagues Carnivorous in Laboratory Terms

A.S. Tashuta, graduate student, V.G. Skibickiy, doctor of veterinary sciences

S.G. Tashuta, candidate of veterinary sciences

The results of researches are resulted on cultivation of virus plagues carnivorous in chicken embryos and fibroblast-like cells culture of cages of fibroblastes of chicken embryos. Virus replication in these biological systems draws death and pathologic changes in CE and shows cytopathic action in the infected cultures of cages. The harvests of virus of CHM arrive at values $10^{6,61}$ TCD_{50/ml}.

Plague of carnivorous, transfer-factor, virus, chicken embryos, culture of cages, fibroblastes of chicken embryos, cytopathic action.