

М.Л. Радзиховський
аспірант
Державний агроекологічний університет

КУЛЬТИВУВАННЯ НА КУЛЬТУРАХ КЛІТИН ПІДТИПІВ LR-10 ТА LR-43.
ГЕРПЕСВІРУСА КОНЕЙ ДРУГОГО ТИПУ

Встановлено збільшення концентрації гемаглютининів підтипів LR-10 та LR-43 герпесвірусу другого типу після адаптації і пасажах на культурі трахеї телят. Герпесвіруси двох підтипів другого типу проявляли цитопатогенну (ЦПД) дію на 8-9 добу, а аглютинацію клітин на 2-3 добу. Концентрування вірусомісного матеріалу в 10-50 разів дозволяє отримати антиген придатний для постановки РЗГА.

Постановка проблеми. На сьогоднішній день ідентифіковано 9 типів герпесвірусів. Згідно сучасної класифікації і номенклатури конячі герпесвіруси відносяться до ДНК-вмісних

вірусів родини Herpesviridae [1,5]. Другий тип вірусу проявляє латентну дію. В нашій країні зустрічаються обидва типи герпесвірусів коней. Вивчення культуральних властивостей доцільно проводити для розробки чутливих спецефічних діагностичних тест-систем, які необхідні для виявлення латентних форм ринопневмонії коней [2]. Створені тест-системи дадуть можливість вивчити особливості латентного перебігу хвороби. Зважаючи на те, що з другим типом вірусу в Україні не проводилась наукова робота, то тема є досить актуальна і цікава з наукової та практичної точки зору.

Матеріали і методи. В дослідях використовувались два підтипи другого типу вірусу LR-10 і LR-43. Культивування вірусів проводили на перещеплюваній культурі трахеї теляти. Для культивування культури трахеї теляти використовували ростове середовище такого складу: ГЛА + середовище 199 + 10% сироватки великої рогатої худоби та гентаміцин [3,4].

Маточні культури пересівали з інтервалом 3-4 доби. Для культивування використовували матраси на 200 см³. Для пересіву культури застосовували розчин трипсин + версен і антибіотик. Коли матрас мав не менш 80%-ний шар проводили зараження. Для зараження використовували два підтипи герпесвірусу другого типу: LR-10 і LR-43, адаптованих до фібробластів шкіри коня. Для переадаптації до культури трахеї телят проводили три пасажа, кожне з яких досліджувалось на виявлення титрів антигена в реакції гемаглютинації.

Зараження проводили наступним чином: зливали ростове середовище, вносили 4-5 мл вірусного матеріалу і ставили в термостат на годину при температурі 37,5°C. При цьому кожних 15 хвилин 4-5 раз повільно омивали моношар клітин вірусним матеріалом. Потім інокулянт зливали і в матрас вносили підтримуюче середовище (аналогічно як ростове, але без сироватки).

Заражену культуру витримували 10 днів в термостаті при температурі 37,5°C, контролюючи кожен день зміни не озброєним оком і під мікроскопом при малому збільшенні (8x15). Після 10-денного терміну заражену культуру 3 рази переморожували (заморожували при -18° С, а розігрівали при кімнатній температурі) і після цього проводили постановку реакції гемаглютинації (РГА). Для постановки РГА використовували 0,2% - ну суспензію еритроцитів коня.

Результати досліджень. В результаті проведених досліджень ми відмічали через 48 годин аглютинацію клітин. Прояв цитопатогенної дії на 8-9 добу окремими осередками і в окремих частках матрасу. При цьому LR-10 та LR-43 проявляли не однакову дію. В матрасах заражених LR-10 більш чітко проявлялась аглютинація, але не відмічали ЦПД, а LR-43 проявляв аглютинацію на 3-4 добу, а ЦПД на 8-9 добу. На 10 день в матрасах не повністю проявлялась цитопатогенна дія, відмічали руйнування лише 10% шару клітин. Після 10 днів культивування проводили перемороження культури і пробували постановку РГА. В нативному вірусомістному матеріалі титрів антигена в реакції не виявляли. Після концентрування вірусного матеріалу в 10-50 раз отримали наступні результати, які представлені в таблиці.

Таблиця

Виявлення наявності антигенів LR-10 та LR-43 в різних розведеннях при концентрації вірусомістного матеріалу

Зараження	Підтип вірусу	Концентрування	Титри в РГА
перше	LR-10	1:10	1:4
	LR-43	1:10	1:2
третє	LR-10	1:10	1:8
	LR-43	1:10	1:4
	LR-10	1:50	1:64
	LR-43	1:40	1:32

З даних таблиці видно, що в результаті проведення першого пасажу гемаглютинуючі антигени LR-10 та LR-43 після концентрування 1:10 зумовлювали аглютинацію еритроцитів в РГА в титрах 1:2-1:4. Після проведення третього пасажу і концентрування 1:10 рівень гемаглютининів зріс в два рази. Концентрація вірусомістних матеріалів до 1:40-1:50 сприяє зростанню рівня гемаглютининів, які виявляєм в РГА до 1:32-1:64.

Таким чином, слабовірулентні підтипи другого типу герпесвірусу коней можна культивувати на перещеплюваній культурі трахеї теляти. Отриманий віросовмістний матеріал після відповідної підготовки можна використовувати як антиген для постановки РЗГА, або можливо і інших серологічних реакціях.

Висновки

1. Герпесвірус другого типу підтипу LR-43 зумовлює ЦПД на 8-9 день.
2. Герпесвірусу другого типу підтип LR-10 зумовлює аглютинацію клітин на 2-3 добу.
3. Після адаптування герпесвірусу 2-го типу до культури трахеї телят поступово зростає його патогенність.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть зосереджені на удосконалюванні технологічних прийомів культивування герпесвірусу другого типу, для отримання антигенів, які будуть використовуватись для розробки сучасних методів діагностики інфекції.

Література

1. Орлянкин Б.Г., Непоклонов Е.А., Алипер Т.П. Классификация и номенклатура вирусов позвоночных//Ветеринария. - 2001. -N. 10. -С. 15-20.
2. Цыбанов С.Ж. Идентификация вируса ринопневмонии лошадей с помощью ПЦ // Ветеринария. -2000. -N.12. -С. 20-23.
3. Антонов Б.И., Борисова В.В., Волкова ИМ. Справочник. Лабораторные исследования в ветеринарии, бактериальные инфекции. Москва. Агропромиздат,1986. -С.279-326.
4. А.И. Собко и А.А. Сюсюкин. Справочник. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных Москва. Агропромиздат,1986. - С. 220-240.
5. T.Dzieciatkowski, A.Chmielewska, ATucholska, M.Banbura. VI Konferencja. Biologia molekularna w diagnostyce chorob zakaźnych i biotechnologii. Warsaw. -2003. -P.66-74.

М. Л. Радзиховський

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НА КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ПОДТИПОВ LR-10 И LR-43. ГЕРПЕСВИРУСА ЛОШАДЕЙ ВТОРОГО ТИПА

Установлены увеличения концентрации гемагглютининов подтипов (LR-10 и LR-43) герпесвирусу второго типа их в после адаптации и пассажах на культуре трахеи телят. Герпесвирусы двух подтипов второго типа проявляли цитопатогенное (ЦПД) действие на 8-9 сутки, а агглютинацию клеток на 2-3 сутки. Концентрирование вирусосодержащего материала в 10-50 раз разрешает получить антиген пригодный для постановки РЗГА.

N. Radsikchovski

CULTIVATION ON CULTURES OF CELLS OF SUBTYPES LR-10 And LR-43. HERPESVIRUSES HORSES OF THE SECOND TYPE

The increases of concentration hemagglutinins subtypes (LR-10 and LR-43) herpesviruses second their type in the ambassador of adaptation and resoring on culture of a trachea couts are established. Herpesviruses two subtypes of the second type showed CCID action for 8-9 day, and agglutination of cells(cages) on 2-3 days Concentrating viruscontents a material at 10-50 time allows to receive an antigene suitable for statement RSGA.