

КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСУ ГЕРПЕСУ ДРУГОГО ТИПУ, ЙОГО КОНЦЕНТРУВАННЯ ТА КРІОКОНСЕРВУВАННЯ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР

Радзиховський М.Л.

Житомирський національний агроекологічний університет, м. Житомир

Герпесвірусна інфекція поширена серед людей і тварин. До родини герпесвірусів належать віруси, які вражають центральну нервову систему (енцефаліт, мієліт, енцефаломієліт), органи зору (кератит, кератокон'юнктивіт), слизові оболонки ротової порожнини (стоматит) і шкіряний покрив (екзема, везикулярний дерматит). За сучасною класифікацією родина *Herpesviridae* поділяється на підродини α , β та γ *herpesvirinae* [1, 2].

Патогенний потенціал герпесвірусної інфекції коней другого типу ГВК-2 на сьогоднішній день повністю не з'ясований, але результати серологічних досліджень вказують, що більшість коней є вірусоносіями даного типу. Даний вірус зазвичай виявляють в крові клінічно здорових лошат і в секретах дихальних шляхів молодняку з ознаками захворювання дихальних шляхів. Літературні дані свідчать, що найбільш розповсюджена респіраторна форма прояву герпесвірусної інфекції [3, 4].

Культури клітин і тканин отримали в останній час широке розповсюдження майже в усіх галузях біології. Використання культур клітин тварин з суто експериментальної процедури перетворилось в технологічний компонент багатьох біологічних досліджень і виробничих процесів. Виникли нові підходи, які забезпечують розширення галузі застосування та стандартизацію [5, 6].

В Україні лабораторна діагностика ГВК-2 проводиться на досить низькому рівні. Не в повній мірі вивчена епізоотологічна ситуація щодо розповсюдженості даної патології в різних регіонах, відсутні профілактичні заходи [7, 8]. У зв'язку із викладеним, удосконалення лабораторних методів діагностики герпесвірусної інфекції у коней другого типу з використанням культур клітин, які можна використовувати як депо накопичення культурального антигену, є надзвичайно актуальним питанням ветеринарної науки і практики.

Метою роботи було вивчення та визначення оптимального методу кріоконсервування культур клітин, їх використання для культивування й накопичення культуральної вірусмісної рідини її концентрування з визначенням оптимальної концентрації для серо-діагностики.

Результати досліджень. Робота виконувалася на факультеті ветеринарної медицини, у навчально-дослідній лабораторії кафедри мікробіології, вірусології та епізоотології Житомирського національного агроекологічного університету.

Для культивування герпесвірусу другого типу використовували такі культури клітин, як фібробласти шкіри коня та трахеї теляти. Для культивування перещеплюваної культури фібробластів шкіри коня (Рис. 1) використовували ростове середовище, до складу якого входили середовище Ігла або MEM – 90 %, 10 % ембріональної сироватки та антибіотики.

Для культивування культури трахеї теляти (Рис. 2) використовували ростове середовище такого складу: ГЛА + середовище 199 + 10 % сироватки великої рогатої худоби та 4 %-ний гентаміцин з розрахунку 1 см³ на 500 см³ середовища.

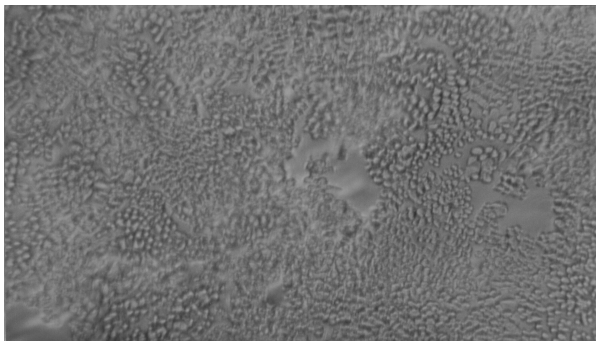


Рис. 1. Стан перещеплюваної культури фібробластів шкіри коня (x120) – 48 годин

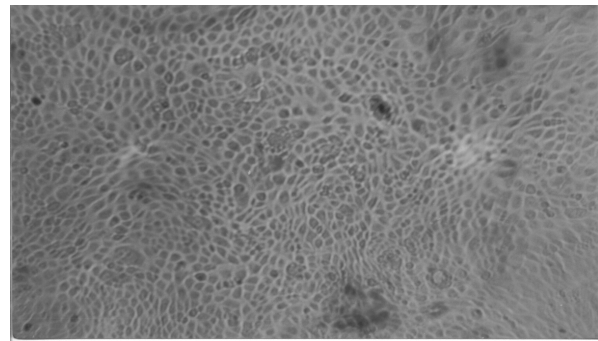


Рис. 2. Стан перещеплюваної культури ТТ (x120) – 72 години

Маточні культури пересівали з інтервалом 3–4 доби. Для культивування використовували матраци об'ємом 100, 250 та 500 см³. При пересіві культури застосовували розчин трипсин-версену у співвідношенні 1:2 та антибіотик. Коли у матраці формувалася моно-

шар клітин на 80–90 % проводили її зараження. На культурі фібробластів шкіри коня під дією ГВК-2 ЦПД проявлялась на 6–7 добу, а на культурі трахеї теляти під дією ГВК-2 ЦПД проявлялась на 7–9 добу, супроводжувалось таким ефектом, який характеризується декількома типами, а саме аглютинація, вакуолізація та руйнація.

Через 10 діб культивування тричі переморожували культуральну вірусовмісну рідину в умовах морозильної камери (-30 °C) і піддавали концентруванню методом зворотного діалізу.

Діалізний мішок з вірусовмісним матеріалом засипали ПЕГом з розрахунку 12 % від об'єму і залишали на 16 год. Після цього вірусовмісний матеріал зливали та визначали ступінь концентрування в РГА для визначення титрів гемаглютининів і подальшого його використання в реакції дифузної преципітації (РДП).

Таблиця 1 – Результати визначення робочої дози (концентрації) антигену для постановки РДП

Концентрування ГВК-2 в	Результат через год.			
	24	48	72	96
1:100	±	±	±	-
1:80	±	±	±	-
1:60	+	+	+	±
1:30	+	+	+	+
1:20	±	+	+	±
1:10	-	-	±	-

Як видно з даних таблиці 1, придатним до постановки РДП є антиген, концентрований від 1:60 до 1:20. З практичної точки зору найраціональніше використовувати антиген, концентрований у 20 разів.

Реакції дифузної преципітації ставили по загально прийнятій методиці.

Культури клітин часто необхідно законсервувати, щоб мати запас клітин із певною біологічною характеристикою.

Для підтримання культур клітин періодично проводили їх кріоконсервування за допомогою морозильної камери – (-30 °C). Процес кріоконсервування здійснювали за урахуванням модифікацій Галатюка О.Є. при власному удосконаленні за такою схемою:

- відбирали матраци з 100 %-ним моношаром клітин;
- ростове середовище зливали, моношар промивали розчином версену з попередньо доданим до нього антибіотиком пролонгованої дії. Потім до матрацу (об'ємом 1500 см³) вносили 30–40 см³ розчину трипсин-версену у співвідношенні 1:3 і матрац ставили у термостат за температури 37,5 °C на 5–10 хвилин. Періодично візуально контролювали процес відставання клітин від стінок матраца. Після цього частину розчину трипсин-версену зливали, лишаючи 15–20 см³ і, інтенсивно струшуючи матрац, одержували суспензію клітин;
- суспензію клітин розливали по 5–7 см³ у стерильні пробірки на 20 см³, куди додавали 5–7 см³ поживного середовища 25 % сироватки ВРХ;
- пробірки центрифугували при 200 g 10 хвилин і надосадову рідину зливали;
- до осаду клітин додавали 1–1,5 см³ кріозахисного середовища такого складу: ДМСО – 10 %, поживне середовище – 40 %, сироватка ВРХ – 50 %;
- суспензію клітин з кріозахисним середовищем розфасовували в стерильні пробірки по 10–15 см³;
- режим заморожування: розфасовану суспензію клітин витримували за температури 4 °C протягом однієї години, потім при – 10 °C також одну годину, при – 18 °C – 30 хвилин, а після цього закладали в морозильну камеру за температури – 30 °C;
- при необхідності пробірки з замороженою суспензією клітин доставали і поміщали до водяної бані за температури 37,5 °C протягом 1–2 хв. При легкому струшуванні. Потім проводили підрахунок, визначали життєздатність клітин, їх концентрацію і засівали у флакони об'ємом 250 см³.

Через 30– 45 діб пробірки із замороженою суспензією клітин розморожували, засівали у матраци об'ємом 250 см³ і відмічали їх життєздатність після консервування (дані представлені в таблиці 2.).

Таблиця 2 – Залежність формування 100 % моношару клітин ТТ від тривалості їх консервування

Перебування у кріоконсервованому стані (діб)	Час формування 100 % моношару (годин)
30	48 – 72
45	48 – 72
60	96 – 120
75	96 – 120
90	120 – 144
105	Клітини моношару не формували

З даних таблиці 2 видно, що життєздатність клітин при їх кріоконсервуванні зберігалась впродовж 3-х місяців.

Застосування таких методичних підходів дозволяло нам у літній період зберігати суспензію клітин трахеї теляти в кріоконсервованому стані протягом 3-ох місяців.

Висновки. Для культивування вірусу герпесу другого типу з метою одержання максимальної його кількості краще застосовувати перещеплювану культуру клітин трахеї теляти.

Оптимальним методом концентрації культурального антигену з вмістом вірусу герпесу другого типу є метод зворотного діалізу.

При використанні представленого методу кріоконсервування життєздатність клітин зберігалась впродовж 3-х місяців

Перспективи досліджень. Подальша робота буде направлена на проведення моніторингових досліджень щодо розповсюдження герпесвірусної інфекції другого типу на території України, удосконалення існуючих і розробку нових методів діагностики даної патології.

Список літератури

1. Сюрин, В.Н. Диагностика вирусных болезней животных [Текст] : справ. / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. – М. : Агропромиздат, 1991. – С. 197–209.
2. Алексеенкова, С.В. Лабораторная модель для оценки иммуногенности вакцин против ринопневмонии лошадей [Текст] : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 16.00.03 / С.В. Алексеенкова. – М., 2007. – 29 с.
3. Browning, F. Equine herpesvirus 2 and 5 (equine gammaherpesviruses) and asinine herpesvirus 2 infections [Text] / F. Browning, C.T. Agius // Chapter 4, in Virus Infections of Equines / ed. M.J. Studdert. – Amsterdam : Elsevier, 1996. – P. 44–47.
4. Distribution and relevance of equine herpesvirus type 2 (EHV2) infections [Text] / K. Borchers [at al.] // Arch. Virol. – 1997. – Vol. 142. – P. 917–928.
5. Official site of O.I.E. [Electronic resource]. – Access mode : http://www.oie.int/eng/en_index.htm. – Title from the screen.
6. Культивування клітин і тканин тварин [Текст] / Л.П. Дьяконов [та ін.]. – Ставрополь, 1986. – 95 с.
7. Галатюк, О.Є. Заразні хвороби коней [Текст] / О.Є. Галатюк. – Житомир : Волинь, 2003. – 273 с.
8. Герпесвирусные инфекции [Текст] // Болезни лошадей, современные методы лечения / Э. Робинсон. – М., 2007. – С. 66–70.

CULTIVATION OF HERPESVIRUS THE SECOND TYPE HIS CONCENTRATION AND CRYOPRESERVATION CULTURES CELL

Radzikhovskiy M.L.

Zhytomyr National Agroecological University, Zhytomyr

In the article information is presented about the use of cultures of cages for cultivation of herpesviridae infection of horse of the second type, methods of his concentration for the use last in serum reactions. The method of cryopreservation of cultures of cages is described with the maintainance of their cell properties.