

УДК 619:616.98:578.835.2:616-076

Абишов А.А.

ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт»,
АО «КазАгроИнновация», г. Алматы, Райымбека 223^А

ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ПОЛЕВОГО ШТАММА ВИРУСА ЯЩУРА СЕРОТИПА АЗИЯ-1 НА ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ВНК-21/13

Аннотация В статье представлены результаты изучения сроков и динамики накопления комплементсвязывающих, преципитирующих и вируснейтрализующих антигенов штамма вируса ящура серотипа Азия-1 на перевиваемой линии культур клеток ВНК-21/13.

Ключевые слова: комплементсвязывающий, преципитирующий и вируснейтрализующий антигены, вирус ящура, культуры клеток, цитопатогенные изменения.

Введение В настоящее время ящур остается одной из наиболее опасных болезней парнокопытных из-за высокой контагиозности, быстрого распространения и восприимчивости многих видов домашних и диких животных (1). Данная инфекция наносит значительный экономический ущерб хозяйствующим субъектам, который складывается от потери животноводческой продукции, расходов на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий, а также от ограничений коммерческой и хозяйственной деятельности, что приводит к социально-экономическим последствиям [2, 3].

Анализ официальных данных МЭБ свидетельствует о довольно напряженной ситуации в мире по данной инфекции. Так, в 2004 -2005 гг. неблагополучными по ящуру были 59 стран, в том числе 27 азиатских, 26 африканских и 5 южноамериканских [3, 4, 7].

Возбудитель инфекции относится к мелким вирусам, обладающим высокой антигенной вариабельностью из-за изменения аминокислотной последовательности в полипептидах вирусных белков. Такие антигенные изменения могут выражаться от незначительных отличий между штаммами, улавливаемых только с помощью точных методов молекулярного анализа, до появления совершенно отличающихся штаммов, требующих применения новых средств серологической диагностики и специфической профилактики инфекции, вызываемой этими штаммами [1,3,4,5]. В этой связи появление новых вспышек ящура в Казахстане, а также в странах ближнего и дальнего зарубежья должно сопровождаться своевременным выделением возбудителя, изучением его иммунобиологических свойств.

Настоящая работа посвящена изучению динамики накопления комплементсвязывающих, преципитирующих и вируснейтрализующих антигенов полевого штамма вируса ящура серотипа Азия-1 на первиваемой линии культур клеток.

Материалы и методы исследований При выполнении научно-исследовательской работы использован выделенный на территории Казахстана и адаптированный к перевиваемой линии культур клеток ВНК-21/13 штамм «№13/КазНИВИ» типа Азия-1.

Для получения биологической массы полевого штамма вируса ящура использовалась перевиваемая культура клеток ВНК-21/13. Штамм вируса репродуцировали стационарным методом в 50 см³ пластиковых матрасах. Культивирование вируса проводили на питательной среде Игла-МЕМ без добавления сыворотки крови животных при температуре 37 °С. Пораженные матрасы замораживали при температуре минус 20 °С и размораживали при комнатной температуре, затем брали пробы для определения комплементсвязывающей, преципитирующей, вируснейтрализующей и биологической активности вируса, а также для определения стерильности на бактериальную и грибковую обсемененности. Инфекционность вируса выражали в Ig ТЦД_{50/мл} и рассчитывали по Риду и Менча.

Очистку биологической массы полевого штамма вируса ящура проводили 2% хлороформом с последующим центрифугированием при 7000 об/мин в течение 45 мин.

Инактивацию вирусной суспензии вируса ящура серотипа Азия-1 проводили при температуре 25 °С димером этиленмина в конечной концентрации 0,02% течение 30 часов.

Постановку и учет результатов реакций связывания комплемента (РСК), преципитации (РДП) и нейтрализации (РН) проводили согласно методическим указаниям с использованием типоспецифических сывороток против серотипов А, Азия-1 и О.

Результаты исследований их обсуждение Изучение и определение времени накопления комплементсвязывающих, преципитирующих и вируснейтрализующих антигенов на клеточной системе имеет практическое значение при разработке технологии изготовления профилактических препаратов и диагностических тест-систем, используемых при индикации и идентификации полевых штаммов возбудителя ящура.

Адаптированным к культуре клеток штаммом вируса ящура «№13/КазНИВИ» серотипа Азия-1 инфицировали культуру клеток ВНК-21/13 суточного возраста, без каких-либо деструктивных изменений в монослое. Инфицирование проводили культуральной вирусодержащей суспензией в дозе 0,1ТЦД_{кл}. Инфицированные культуры клеток инкубировали при температуре 37 °С. Для определения динамики накопления комплементсвязывающих, преципитирующих, вируснейтрализующих антигенов полевого штамма проводили микроскопирование монослоя инфицированных клеток и через каждые 3 часа после их заражения замораживали при температуре минус 20 °С, а также в период максимального развития цитопатогенных изменений, характеризующихся появлением округлых, блестящих, преломляющий световой поток клеток с последующим отторжением от поверхности субстрата и образованием пустот на площади 70-80% монослоя, сосуды замораживали при вышеуказанном отрицательном температурном режиме в течение 24 часов и размораживали при 22 °С. Клеточные детриты из вирусной суспензии удаляли путем обработки хлороформом и центрифугированием. Далее полученную вирусную массу использовали в качестве антигена при постановке серологических реакций. Результаты оценки активности и специфичности предлагаемого антигена для серологических реакций при диагностике ящура типа Азия-1 представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Комплемент связывающая активность антигена ящура типа Азия-1 в РСК

№ п/п	Сроки исследования, час	Разведения антигена					
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
1	Через 3 часа после заражения	++++	—	—	—	—	—
2	6	++++	—	—	—	—	—
3	9	++++	++—	—	—	—	—
4	12	++++	++++	—	—	—	—
5	15	++++	++++	++—	—	—	—
6	18	++++	++++	++++	—	—	—
7	21	++++	++++	++++	+++—	—	—
8	24	++++	++++	++++	++++	—	—
9	27	++++	++++	++++	++++	—	—
10	30	++++	++++	++++	++++	++++	—
11	33	++++	++++	++++	++++	++++	—
12	36	++++	++++	++++	++++	++—	—
13	39	++++	++++	++++	++++	—	—
14	42	++++	++++	++++	—	—	—
15	45	++++	++++	—	—	—	—
16	Специф-ая сыворотка к типу А	—	—	—	—	—	—
17	Специф-ая сыворотка к типу О	—	—	—	—	—	—
Примечания: «—» – отсутствие лизиса эритроцитов «+» – положительная реакция							

Из таблицы 1 видны, что начало накопления комплементсвязывающего антигена отмечено через 3 часа после инфицирования культуры клеток. В данном периоде титр антигена составил 1:2, но в монослое культуры клеток ВНК-21/13 каких либо цитопатогенных изменений, обусловленных возбудителем инфекции, не удалось установить. С увеличением срока культивирования титр комплементсвязывающего антигена прогрессировал и достигал максимума 1:32 через 30-33 часа после инокуляции вируса. В данный период в монослое наблюдали ЦПД, которое охватило около 50-60% клеток монослоя. Изменения характеризовались появлением в монослое блестящих, преломляющих световой поток клеток, которые в последующем отторгались от поверхности стекла, образуя обширные пустоты. После указанного срока культивирования наблюдалось постепенное снижение уровня накопления антигена, достигшего минимального титра к 45 ч. репродукции вируса, хотя в эти сроки цитопатическое действие возбудителя в монослое клеток проявлялось в геометрической прогрессии и характеризовалось появлением округлых, светящихся клеток, преломляющих световой поток с последующим отторжением от поверхности субстрата (стекла).

На следующем этапе экспериментов изучали преципитиногенную активность культурального антигена возбудителя ящура типа Азия-1 в РДП, результаты которой представлены в таблице 2.

Таблица 2– Преципитирующая активность антигена ящура типа Азия-1 в РДП

№п/п	Сроки исследования	Разведения антигена					
		Ц	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
1	Через 3 часа после заражения	–	–	–	–	–	–
2	6	+	–	–	–	–	–
3	9	+	+	–	–	–	–
4	12	+	+	–	–	–	–
5	15	+	+	–	–	–	–
6	18	+	+	–	–	–	–
7	21	+	+	–	–	–	–
8	24	+	+	+	–	–	–
9	27	+	+	+	–	–	–
10	30	+	+	+	–	–	–
11	33	+	+	+	–	–	–
12	36	+	+	+	+	–	–
13	39	+	+	+	+	–	–
14	42	+	+	+	+	–	–
15	45	+	+	+	–	–	–
16	48	+	+	–	–	–	–
17	51	+	+	–	–	–	–
18	54	+	–	–	–	–	–
Примечания: «–» – отсутствие линии преципитации «+» – положительная реакция							

Как видно из таблицы 2, накопление преципитирующего антигена возбудителя ящура типа Азия-1 начиналось через 6 часов после заражения культуры клеток ВНК-21/13, достигая максимального титра 1:8 через 30 часов. Из таблицы также видно, что максимальный титр антигена удерживался в течении 6 часов, после чего происходило снижение титра преципитирующего антигена, и к 54 часам культивирования антиген удалось обнаружить только цельном варианте.

На следующем этапе исследований изучена динамика накопления вируснейтрализующего антигена на культуре клеток. Реакцию нейтрализации ставили согласно методическим указаниям с использованием постоянной дозы специфической сыворотки (титр сыворотки 1:8) и перевиваемой линии культуры клеток ВНК-21/13. Результаты экспериментов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Вируснейтрализующая активность антигена ящура типа Азия-1 в РН

№ п/п	Сроки исследования	Разведения антигена				
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
1	Через 3 часа после заражения	—	—	—	—	—
2	6	—	—	—	—	—
3	9	—	—	—	—	—
4	12	—	—	—	+—	—
5	15	—	—	—	++—	—
6	18	—	—	—	++++	—
7	21	—	—	—	++++	—
8	24	—	—	—	++++	—
9	27	—	—	—	++++	—
10	30	—	—	—	++++	—
11	33	—	—	—	++++	—
12	36	—	—	—	++++	—
13	39	—	—	—	++++	—
14	42	—	—	—	++—	—
15	45	—	—	—	+—	—
16	48	—	—	—	—	—
17	51	—	—	—	—	—
18	54	—	—	—	—	—

Примечания: «—» – отсутствие характерных изменений
«+» – наличие цитопатических изменений в монослое
При постановке реакции нейтрализации была использована постоянная доза специфической сыворотки против возбудителя ящура типа Азия-1 в титре 1:8

Данные таблицы 3 свидетельствуют о том, что в начальной стадии репродукции вируса титр вируснейтрализующего антигена был низким, хотя в этот период в монослое наблюдалось начало цитопатогенных изменений. С возрастанием срока размножения возбудителя титры антигена возрастали, достигая максимальных значений между 18 и 36 часами культивирования, о чем свидетельствуют результаты, представленные в таблице. Далее отмечалось плавное снижение титра антигена и высокой цитопатогенной активности вируса на 70-80% монослоя клеток. Инфекционная активность вирусосодержащей суспензии, замороженной в вышеуказанном периоде, составила $7,25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$.

Выводы Изучение динамики накопления антигенов возбудителя ящура на культуре перевиваемой линии клеток показало, что комплементсвязывающий антиген накапливается через 30-33 часа, преципитирующий – 36-42, а вируснейтрализующий антиген – между 12 и 36 часами после заражения культур клеток в титрах 1:32, 1:8 и 1:16 соответственно. Активность и специфичность антигенов позволяет использовать их в качестве антигена в серологических реакциях при индикации, идентификации и ретроспективной диагностике ящура парнокопытных животных.

Литература

1. Кругликов Б.А., Штефан М.К., Тарасенко Т.Я. Изучение инфекционных свойств штаммов вируса ящура типа О, выделенных в разные периоды эпизоотии / Акт. пробл. вет. вирусол.- Владимир, 1998. - Ч. 1. - С. 77-78.
2. Рёпер Х. Ящур /Пер. с нем. Г.А. Сурковой; Под ред. и с предисл. канд. вет. наук П.В. Малянца,- М.: Колос, 1971.-432 с.
3. Бурдов А.Н., Дудников А.И., Малярец П.В. и др. Ящур /Под ред. Бурдова А.Н. - М.: Агропромиздат, 1990.- 320с.
4. Шажко Ж.А., Фомина Т.А. и др. Некоторые характеристики эпизоотических штаммов вируса ящура, изолированных в СССР /Ящур. (К новой стратегии борьбы с ящуром).- Владимир, 1992,-4.1.-С.82-96.
5. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В. и др. Вирусные болезни животных. -М.: ВНИТИБП, 1998.- С.532-548.
6. Методические указания по выделению и идентификации штаммов вируса ящура,- Владимир,2002,- 27с.
7. Захаров В.М., Рахманов А.М. Разработка программы по борьбе с ящуром в странах СНГ /Акт.пробл. инфекц. патол. ж-ных: Матер. Междунар. науч. конф., посвящён. 45-летию ФГУ ВНИИЗЖ. - Владимир, 2003.- С. 14-18.
8. Муминов Д.М., Фомина Т.А., Егорова А.И. и др. Характеристика изолята вируса ящура типа Азия-1, выявленного в Таджикистане в 2004 году /Пробл. мониторинга и генодиагн. инфекц. болезней ж-ных: Матер. Междунар. науч. конф. молодых учёных, 24-26 марта 2004г. - Владимир, 2004. - С. 8-12.

Абишов А.А.

АУСЫЛДЫҢ ДАЛАЛЫҚ ШТАММЫНЫҢ АЗИЯ-1 СЕРОТИПІНІҢ ҚАЙТА СЕБІЛЕТІН ВНК-21/13 ЖАСУШАЛАР ӨСІНДІЛЕРІНДЕГІ ШОҒЫРЛАНУ ДИНАМИКАСЫ

Мақалада аусылдың далалық штаммының Азия-1 серотипінің комплемент-байланыстыру, преципитациялау және вирус бейтараптау антигендерінің қайта себілетін ВНК-21/13 жасушалар өсінділеріндегі шоғырлануы динамикасы мен мерзімі зерттеу нәтижесі ұсынылды.

Кілт сөздер: комплемент байланыстыру, преципитациялау және вирус бейтараптау антигендері, аусыл вирусы, жасушалар өсіндісі, цитопатогендік өзгеріс.

Abishov A.A.

DYNAMICS OF ACCUMULATION OF ANTIGENS FIELD STRAINS OF FMD VIRUS TYPE ASIA-1 ON A CONTINUOUS CELL CULTURE BHK-21/13

The paper presents the results of studying the timing and dynamics of accumulation of complement, and precipitating viursneytralizuyuschih strain of FMD virus antigens seratipa Asia-1 on a continuous line of cell cultures BHK-21/13.

Keywords: complement-fixing, precipitating and viursneytralizuyuschy antigens, FMD virus, cell culture, cytopathogenic changes.