

УДК 616:619

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСА ВИСНА-МАЕДИ НА ДИПЛОИДНОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК СИНОВИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ ЯГНЕНКА

*Антошкин П.А., Воротников А.П., студенты 5 курса факультета ветеринарной медицины и биотехнологии*

*Научные руководители – Васильева Ю.Б.<sup>1</sup>, кандидат ветеринарных наук, доцент; Барышникова Е.И.<sup>2</sup>, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией; Колбасова О.Л.<sup>2</sup>, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник*

*ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА<sup>1</sup>*

*ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии<sup>2</sup>*

**Ключевые слова:** *Висна-Маеди, вирус, культура клеток, заражение*

*Статья посвящена исследованиям по культивированию вируса Висна-Маеди на культуре клеток синовиальной мембраны ягненка. Приводятся результаты проявления цитопатического эффекта действия вируса на клетки на 5-7 день культивирования.*

Для выращивания вируса Висна-Маеди, накопления вирусосодержащего материала проводили заражение диплоидной культуры клеток синовиальной мембраны ягненка (СМЯ *Ovis aries*). Научный эксперимент проводился на базе ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии в лаборатории Ретровирусных инфекций животных. Для заражения использовали пластиковые и стеклянные матрасы с 90% клеточным монослоем. Для исследования мы брали сублинию клеток синовиальной мембраны ягненка (СМЯ *Ovisaries*), культивировали на питательной среде ДМЕМ с глутамином, содержащей 10% фетальной сыворотки телят в пластиковых матрасах объемом 25 см<sup>3</sup>, 50 см<sup>3</sup> и 75 см<sup>3</sup>, pH ростовой среды 7,1-7,2 с помощью добавления необходимого количества 7,5% NaHCO<sub>3</sub>.

Культивирование СМЯ Ovisaries проводили при условиях стационарного монослоя при температуре  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

Пассирование клеток осуществляли в следующем порядке: из культуры со сплошным монослоем клеток удаляли ростовую среду и вносили предварительно подогретую до  $37^{\circ}\text{C}$  смесь 0,02%-ного раствора версена и 0,25%-ного раствора трипсина в соотношении 1:1. Количество диспергирующей жидкости зависело от объема культуральной посуды (5, 10 и 20 мл соответственно на  $25\text{ см}^3$ ,  $50\text{ см}^3$  и  $75\text{ см}^3$  матрас).

Культуру клеток СМЯ с 90%-м монослоем, не отличающуюся по морфологическим признакам от исходной популяции, использовали для получения вирусных антигенов. Клетки культивировали в пластиковых матрасах, объемом 0,5 л. Заражение проводили путем контакта 2-3 см вирусосодержащей культуральной жидкости (штамм K796 и штамм M-88 вируса ВМ) с инфекционной активностью  $10^{5,0}$  IgТЦД/50/см<sup>3</sup> с монослоем клеточной культуры в течение 1,5-2 часов при  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Затем добавляли поддерживающую среду ДМЕМ с 2% FBS. Культуру клеток СМЯ культивировали до проявления характерного ЦПД-вируса. После этого проводили 3-кратное замораживание и оттаивание вирусосодержащего материала и культуральную жидкость подвергали низкоскоростному центрифугированию (600 g) для осаждения клеточного детрита.

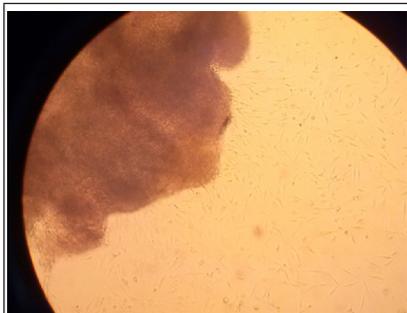
Контролем служила интактная культура клеток. Культуры инкубировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при  $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  с повышенным до 5 %  $\text{CO}_2$ , относительной влажностью 95% до проявления максимально выраженного ЦПЭ в опытных образцах при неизменном контроле. Наблюдение проводили с помощью светового микроскопа под увеличением ( $\times 150$ ) и ( $\times 380$ ).

На 5-е, 7-е и 9-е сутки культивирования после фиксации и окраски гематаксилин-эозином учитывали цитопатическое изменение в инфицированной культуре клеток по сравнению с интактными клетками.

Отмечали интенсивный рост фибробластоподобных клеток. Данные клетки средних размеров с мелкозернистой цитоплазмой и четко очерченными границами. Ядро округлой формы с 1-3 ядрышками (рис. 1).

На 7-8-е сутки образовывался конглоэнтный монослой. При коэффициенте пересева 1:2 монослой формировался на 3-5 сутки и сохранялся без смены среды на пластике – до 3-х недель (рис. 2).

Наиболее характерное цитопатогенное действие было обнаружено при суспензионном методе заражения на 5-7-е сутки культивирования, проявляющееся симпластообразованием. В этот же период культивирования вирусов в стационарных условиях значительных морфологических изменений нами не было отмечено.



**Рисунок 1 - Микроскопия первичной культуры СМЯ.**



**Рисунок 2 - Перевиваемая культура СМЯ.**

На 7-е сутки после заражения культура клеток СМЯ в 1,5-3 раза увеличивались в размере.

Таким образом, при заражении культуры клеток цитопатогенное действие, заключающееся в симпластообразовании, разрушении и гибели клеток, проявлялось на 5-7 сутки.

#### *Библиографический список*

1. Васильева, Ю.Б. Конструирование биопрепаратов для лабораторной диагностики бордетеллёзной инфекции / Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №2 (22). – С. 25-29.
2. Васильева, Ю.Б. Разработка методов детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №3 (23). С. 46-51.
3. Мاستиленко, А.В. Разработка системы дифференциации *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме «Реального времени» / А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев, О.Ю. Борисова, Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сель-

- скохозяйственной академии. – 2014. – №1(25). – С. 50-54.
4. Мاستиленко, А.В. Определение эффективности разработанных зондов в реакции ОТ–ПЦР для повышения специфичности выявления *Bordetella bronchiseptica* / А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Д.Г. Сверкалова // Инфекция и иммунитет. - 2013. - Т. III. - № 2. - С. 152.
  5. Нафеев, А.А. Вопросы эпидемиолого-эпизоотологического надзора за зоонозными инфекциями / А.А. Нафеев, Н.И. Пелевина, Ю.Б. Васильева // Дезинфекционное дело. - 2014. - № 1. - С. 39-43.
  6. Vasylyeva, Yu.B. Selection of the complex of microbiological tests for *Bordetella bronchiseptica* typing / Yu.B. Vasylyeva / Вестник Орловского государственного аграрного университета. - 2013. - Т. 43. - № 4. - С. 44-46.
  7. Vasylyeva, Yu.B. Identification of *Bordetella bronchiseptica* bacteria with the help of polymerase chain reaction in monoand multiplex format / Yu.B. Vasylyeva / Вестник Орловского государственного аграрного университета. - 2013. - Т. 45. - № 6. - С. 81-85.

## THE CULTIVATION OF VISNA VIRUS-MAEDI ON A DIPLOID CELL CULTURE SYNOVIAL MEMBRANE OF A LAMB

*Antoshkin P.A., Vorotnikov A.P.*

**Key words:** *Visna-Maedi, virus, cell culture, contamination*

*Abstract: the article is devoted to research on cultivation of Visna virus-Maedi in cell culture synovial membrane of a lamb. The results of the manifestation of the cytopathic effect of the virus on the cells at 5-7 days of cultivation.*