

Згировская А.А., кандидат биологических наук

Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук, доцент

Дубаневич О.В., старший научный сотрудник

Зуйкевич Т.А., кандидат сельскохозяйственных наук

Костюк Н.И., кандидат ветеринарных наук

Герасименко В.И., ведущий технолог

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск

ВЫДЕЛЕНИЕ РОТАВИРУСА ОТ БОЛЬНОГО ТЕЛЕНКА И ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ЕГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Резюме

Статья посвящена выделению ротавируса от больного теленка и оптимизации параметров его культивирования в перевиваемых линиях гомологичных и гетерологичных культур клеток. Выделен изолят ротавируса в культуре клеток MDBK из фекалий больного теленка, что подтверждено в полимеразной цепной реакции и реакции нейтрализации. Отработан способ культивирования выделенного изолята в гомологичной (MDBK) и гетерологичной (СПЭВ) культуре клеток. Культивирование ротавируса в щелочной среде и обработка его трипсином в концентрации 20 мкг/мл и внесение трипсина в поддерживающую среду (15 мкг/мл) приводили к увеличению титра вируса до 8,0–8,25 lg ТЦД_{50/мл}.

Установлено, что накопление выделенного ротавируса в роллерах приводило к увеличению выхода вируса и повышению его титра до 8,5 lg ТЦД_{50/мл}. Выделенный изолят ротавируса обладает антигенными свойствами и приводит к формированию иммунного ответа при внутримышечном введении кроликам.

Ключевые слова: выделение, ротавирус, культура клеток, питательная среда, очистка и концентрация вируса.

Summary

The article is devoted to the isolation of rotavirus from a sick calf and optimization of its cultivation parameters in the transplanted lines of homologous and heterologous cell cultures. Rotavirus isolate was isolated in MDBK cell culture, which was confirmed in polymerase chain reaction and neutralization reaction, from the faeces of a sick calf. A method of culturing the isolated isolate in homologous (MDBK) and heterologous (SPEV) cell culture has been worked out. The cultivation of rotavirus in an alkaline medium and its treatment with trypsin at a concentration of 20 mcg/ml and the introduction of trypsin into a supportive medium (15 mcg/ml) led to an increase in the titer of the virus to 8.0–8.25 lg TCD_{50/ml}. It was found that the accumulation of isolated rotavirus in the rollers led to an increase in the yield of the virus and an increase in its titer to 8.5 lg TCD_{50/ml}. The isolated rotavirus isolate has antigenic properties and leads to the formation of an immune response when administered intramuscularly to rabbits.

Keywords: isolation, rotavirus, cell culture, nutrient medium, purification and concentration of the virus.

Поступила в редакцию 22.10.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Ротавирусная инфекция КРС (ротавирусный энтерит, диарея неонатальных телят) – остро протекающая контагиозная болезнь новорожденных телят, характеризующаяся поражением желудочно-кишечного тракта.

Болезнь широко распространена во всех странах мира и наносит большой экономический ущерб промышленному животноводству за счет высокого уровня заболе-

ваемости телят (50–78 %), смертности до 25–53 % в результате диареи, потери массы животных и снижения сопротивляемости другим инфекциям.

Чрезвычайно широкое распространение возбудителя заболевания, его приспособленность к паразитированию в организме некоторых видов животных, тенденция вызывать длительную персистенцию, антигенная полиморфность и относительная устойчивость к воздействию разнооб-

разных факторов обуславливают энзоотическое течение болезни в хозяйствах с неблагоприятными условиями содержания животных.

Стационарность болезни поддерживается за счет длительной персистенции возбудителя в организме животных-реконвалесцентов.

Важные условия успешной борьбы с этим заболеванием – своевременная и правильная его диагностика, проведение мер специфической профилактики, что в свою очередь предполагает получение в достаточном количестве активного вирусного антигена.

Для специфической профилактики ротавирусного энтерита применяют живые и инактивированные вакцины, которыми прививают глубокостельных коров. При этом практическое значение для профилактики ротавирусной диареи новорожденных телят имеет колостральный иммунитет, обусловленный поступлением с молозивом в организм новорожденных телят специфических антител, нейтрализующих возбудитель в просвете тонкого кишечника, а также иммунокомпетентные клетки и другие протективные факторы [2, 4].

Ротавирусы КРС характеризуются значительным антигенным полиморфизмом и нестабильностью антигенной структуры. Сложная структура генома ротавируса, в том числе его фрагментарность, обуславливают постоянную возможность модификации антигенной структуры. В связи с этим одним из основных требований, предъявляемых к производственным штаммам, является соответствие их антигенных свойств эпизоотическим штаммам возбудителя [5].

Целью нашего исследования являлось выделение ротавируса из патологического материала, поступившего от больного теленка из неблагополучного хозяйства, адаптация его к перевиваемой культуре клеток, оптимизация параметров его культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. Ротавирус выделяли из фекалий, полученных от больного теленка из

хозяйства «Восход-Агро» Молодечненского района Минской области.

Выделение ротавируса. Из фекалий готовили 20%-ную суспензию, тщательно гомогенизировали, выдерживали при температуре плюс 2–4 °С в течение 3 ч, центрифугировали при 2000 об./мин в течение 20 мин. Предварительно материал, отобранный от больного теленка, проверяли в полимеразной цепной реакции (ПЦР) на наличие антигена ротавируса. Надосадочную жидкость отбирали, пропускали через мембранный фильтр Millipore 0,22 мкм. Полученный материал использовали для заражения культур клеток.

Культура клеток. В работе использовали перевиваемые культуры клеток почки эмбриона коровы MDBK, почки африканской зеленой мартышки *Vero*, почки эмбриона макаки-резуса MA-104 и ее клон Mac-145, почки эмбриона свиньи СПЭВ.

Питательные среды. В опытах использовали среды как ростовые, так и поддерживающие согласно паспортам на перевиваемые культуры клеток: ДМЕМ, Игла МЕМ с двойным набором аминокислот и витаминов, 199, обогащенные 10%-ной (ростовая среда) и 2%-ной (поддерживающая среда) сыворотками эмбрионов коров. В работе использовали эмбриональную сыворотку в связи с широким распространением ротавирусов и соответственно высоким уровнем антивирусных тел в сыворотках крови крупного рогатого скота. Уровень рН 7,2 и 8,0 среды регулировали 7,5%-ным раствором натрия двууглекислого. Для отмывки монослоя клеток от сыворотки и продуктов жизнедеятельности использовали раствор Хенкса.

Культивирование вируса. Сформированный монослой отмывали трижды раствором Хенкса после удаления ростовой среды. Вирус, обработанный трипсином в концентрации 20 мкг/мл в течение 30 мин при температуре плюс 37 °С, наносили на монослой клеток и адсорбировали в течение 60 мин при температуре плюс 37 °С, после чего вносили поддер-

живающую среду с добавлением трипсина в концентрации 10 мкг/мл. Обязательно ставили контроли клеток с трипсином и без него. Инкубацию клеток проводили в течение 72 ч или до появления цитопатического действия вируса (ЦПД). В связи с тем, что при выделении ротавируса на начальных этапах отсутствовало цитопатическое действие, проводили 5 «слепых» пассажей.

Титрование вируса. Вирусосодержащий материал титровали на той же культуре клеток, на которой проводили его выделение. В лунки 96-луночного планшета вносили по 150 мкл суспензии клеток в концентрации 300 тыс./мл и по 50 мкл разведений вируса с 10^{-1} до 10^{-8} . В контрольные лунки вместо вирусосодержащего материала вносили питательную среду. Инкубировали планшеты 7 суток при температуре плюс 37 °С и 5,0 % CO_2 . Титр рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина или по Риду и Менчу.

Очистка ротавируса. Очистку вирусосодержащего материала от контаминации другими вирусами осуществляли методом бляшек в однослойной культуре клеток под агаровым покрытием. Культуру клеток МА-104 культивировали в чашках Петри. Готовили десятикратные разведения вируса с 10^{-1} до 10^{-8} на средах 199 и Игла MEM, взятых в соотношении 1:1. Сформировавшийся сплошной монослой клеток отмывали раствором Хенкса, вносили два последних разведения вируса, равномерно распределяя его по поверхности монослоя клеток и обеспечивая контакт вируса с клетками в течение 60 мин при температуре плюс 37 °С, после чего несвязанный вирус удаляли промыванием раствором Хенкса. Затем на слой клеток наносили специальное агаровое покрытие. В его состав входили агар, раствор Эрла, сыворотка эмбрионов коров, нейтральный красный, раствор соды (NaHCO_3), среда, антибиотики. После застывания (30–60 мин) с поверхности агара сливали конденсированную влагу, флаконы переносили в термостат и инкубировали клетками вверх. Время инкубации – 36–48 ч, температура – плюс 37 °С.

В дальнейшем для получения чистой линии вируса (клона), происходящей из одной бляшкообразующей частицы, бляшку вместе с агаром вырезали с поверхности чашки Петри, ресуспендировали в питательной среде и заражали клеточные культуры. Полученную таким образом популяцию вируса проверяли в ПЦР на типовую принадлежность и контаминацию другими вирусами.

В работе использовали еще один метод очистки вируса – метод предельных разведений. Для этого готовили последовательные разведения первого пассажа вируса, дающего выраженное ЦПД и заражали монослойную культуру клеток МА-104, выращенную в планшетах на 24 лунки. Адсорбцию проводили в течение 1 ч при температуре плюс 37 °С, инокулят удаляли, в лунки вносили среды 199 и Игла MEM с 10 мкг/мл трипсина и инкубировали при температуре плюс 37 °С 72 ч. По истечении указанного срока планшеты замораживали, оттаивали, собирали культуральную жидкость из лунок, зараженных вирусом в том разведении, которое дает ЦПД лишь в 5–10 % от площади монослоя в лунке. Вирус из этих лунок разводили и опять высевали на культуру клеток, как описано выше. Данную процедуру повторяли 3 раза.

Концентрация вируса. Для концентрации полученного вируса использовали полиэтиленгликоль (ПЭГ) 6000, которым обрабатывали материал в концентрации 10 % от объема вируса в течение 12 ч при температуре плюс 4 °С. Смесь центрифугировали при 6000 об/мин и температуре плюс 4 °С в течение 30 мин. Надосады удаляли, а осадок ресуспендировали в средах 199 и Игла MEM. Осадок отмывали три раза средой с последующим центрифугированием. Полученный вирус использовали для изучения оптимальных условий накопления в культуре клеток.

Постановка реакции нейтрализации. Вирусосодержащую культуральную жидкость предварительно замораживали и оттаивали, затем освобождали от клеточного детрита центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 мин. Готовили

последовательные десятикратные разведения вирусосодержащего материала, в равных объемах соединяли с инактивированной гипериммунной сывороткой (инактивировали при температуре 56 °С в течение 30 мин) к ротавирусу, выдерживали эту смесь при температуре плюс 37 °С в течение 1 ч. Этой смесью заражали культуру клеток MDBK в объеме 100 мкл, выращенную в 96-луночных планшетах. В каждую лунку вносили по 100 мкл поддерживающей среды. Инкубировали в течение 7 суток при температуре плюс 37 °С и 5,0 % CO₂. Результат идентификации считали положительным, если титр вируса без сыворотки составлял не ниже 3 lg, а во всех лунках, инокулированных смесью вирус+сыворотка, ЦПД не обнаруживалось.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенных исследований нами был выделен штамм ротавируса, что было подтверждено в ПЦР. Выделение ротавируса из фекалий больного теленка проводили на разных линиях культур клеток: MDBK, *Vero*, MA-104 и ее клон Marc-145 и СПЭВ. Из литературных источников известно, что для успешного выделения ротавируса необходимо суспензию патологического материала обрабатывать трипсином [6]. Механизм действия фермента заключается в расщеплении белка наружного капсида Vp4, что является обязательным условием для функциональной активности вириона. В связи с этим суспензию фекалий обрабатывали трипсином в концентрации 30 мкг/мл в течение 30 мин при температуре плюс 37 °С. ЦПД

вируса проявилось через 7 пассажей на культуре клеток почки эмбриона коровы MDBK и почки эмбриона макаки-резуса MA-104. Хотя известно, что лучшей линией клеток для выделения ротавируса является MA-104, в нашем случае наиболее выраженное ЦПД проявлялось в культуре клеток MDBK [1, 4]. Идентификацию выделенного вируса проводили в реакции нейтрализации с гипериммунной сывороткой к ротавирусу крупного рогатого скота. Полученный вирусосодержащий материал был проверен на контаминацию другими вирусами в ПЦР. Было установлено, что выделенный вирус содержит антиген вируса диареи крупного рогатого скота и коронавируса крупного рогатого скота. На данном этапе проводили очистку выделенного ротавируса от присутствующих в материале вируса диареи и коронавируса методом предельных разведений и методом бляшек в однослойной культуре клеток под агаровым покрытием. Очищенный таким образом вирус подвергали концентрации.

Следующий этап работы заключался в подборе наиболее оптимальной перевиваемой культуры клеток для накопления ротавируса. Опыт проводили как с гомологичными (MDBK), так и с гетерологичными (*Vero*, MA-104, Marc-145, СПЭВ) культурами клеток, в которых четко проявлялось цитопатическое действие вируса. Клетки заражали одной дозой вируса 0,5 ТЦД₅₀ на клетку. Результаты изучения чувствительности перевиваемых культур клеток к выделенному ротавирусу представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Результаты титрования ротавируса на перевиваемых линиях культур клеток

Культура клеток	Время наступления ЦПД, ч	Инфекционная активность, lg ТЦД ₅₀ /мл
MDBK	20–24	6,0
<i>Vero</i>	48	5,5–5,8
MA-104	28–30	5,5–6,0
СПЭВ	24–30	6,0
Marc-145	40	5,5–6,0

Как видно из таблицы 1, оптимальными культурами клеток для накопления ротавируса являются MDBK, СПЭВ. Титр вируса составлял 6,0 lg ТЦД_{50/мл}, при титровании вируса в других линиях клеток инфекционная активность достигала 5,5–6,0 lg ТЦД_{50/мл}.

Согласно литературным данным в процессе пассирования уровень инфекционности ротавируса постепенно утрачива-

ется [2, 3]. Однако предобработка вируса трипсином и введение фермента в поддерживающую среду при культивировании увеличивает выход инфекционного вируса. В связи с этим следующий этап работы заключался в подборе оптимальной дозы трипсина для обработки вируса и добавления в поддерживающую среду. Результаты этих опытов представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Влияние концентрации трипсина и рН среды на инфекционную активность ротавируса в культуре клеток MDBK и СПЭВ

Культура клеток	Концентрация трипсина, мкг/мл		рН поддерживающей среды	Титр вируса, lg ТЦД _{50/мл}	
	обработка вируса	внесение в поддерживающую среду		без обработки	после обработки
MDBK	15	10	7,2	5,0	6,5
			8,0	5,5	7,0
	20	15	7,2	-	7,0
			8,0	-	8,0
СПЭВ	15	10	7,2	5,0	6,25
			8,0	5,5	7,0
	20	15	7,2	-	7,25
			8,0	-	8,25

Как видно из таблицы 2, рН среды на не обработанный трипсином ротавирус не оказывал значительного влияния. Так, инфекционная активность вируса составляла 5,0–5,5 lg ТЦД_{50/мл} при рН 7,2–8,0 до обработки его трипсином в культуре клеток MDBK и СПЭВ. Однако обработка вирусосодержащего материала трипсином в концентрациях 15–20 мкг/мл и введение его в поддерживающую среду (10–15 мкг/мл) приводили к увеличению титра вируса до 6,25–8,25 lg ТЦД_{50/мл}. Наибольший «урожай» вируса был получен при обработке его трипсином в концентрации 20 мкг/мл и внесении в среду 15 мкг/мл для обеих линий клеток. Известно, что максимальная активность трипсина проявляется при рН 8,0. Это подтверждается результатами, представленными в таблице 2. При культивировании ротавируса в щелочных условиях (рН 8,0) титр его увеличивался до 8,0–8,25 lg ТЦД_{50/мл}. Для получения таких результатов важное значение имеет отмывка монослоя клеток (не менее 3 раз) от сыво-

ротки в ростовой среде, так как она ингибирует энзиматическую активность.

Важное значение для накопления ротавируса в высоких титрах имеет множественность инфицирования культуры клеток [5, 7]. В наших исследованиях мы заражали культуру клеток MDBK выделенным ротавирусом в дозе 0,1, 0,5 и 1,0 ТЦД₅₀ на клетку. Установлено, что наибольшую инфекционную активность ротавирус проявлял при заражении культуры клеток MDBK в дозе 0,5 и 1,0 ТЦД₅₀ на клетку. При этом титр составлял 8,0–8,25 lg ТЦД_{50/мл}.

Следующий этап работы заключался в изучении антигенных свойств выделенного ротавируса. Кроликам вводили выделенный ротавирус внутримышечно дважды с интервалом 14 суток в объеме 2 мл. Через 21 сутки после повторной иммунизации производили отбор крови для проверки в реакции нейтрализации наличия антител к ротавирусу. Результаты изучения антигенных свойств выделенного изолята представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Изучение антигенных свойств выделенного изолята ротавируса на кроликах

Способ введения	Средний титр антител в сыворотках крови в реакции нейтрализации, log ₂		
	до введения	через 14 суток после введения	через 21 сутки после повторного введения
Внутримышечный	2,0±0,52	4,0±0,43	6,0±0,33

Как видно из таблицы 3, выделенный изолят ротавируса обладает антигенными свойствами. В организме кроликов на введение ротавируса образуются антитела, титр которых составляет $6,0 \pm 0,33 \log_2$ в реакции нейтрализации.

В процессе работы установлено, что накопление выделенного ротавируса в роллерах приводило к увеличению выхода вируса и повышению его титра до $8,5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выделен изолят ротавируса в культуре клеток MDBK, что подтверждено в ПЦР и реакции нейтрализации, из фекалий больного теленка. Оработан способ куль-

тивирования выделенного изолята в гомологичной (MDBK) и гетерологичной (СПЭВ) культуре клеток. Культивирование ротавируса в щелочной среде и обработка его трипсином в концентрации 20 мкг/мл и внесение трипсина в поддерживающую среду (15 мкг/мл) приводили к увеличению титра вируса до $8,0-8,25 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$.

Установлено, что накопление выделенного ротавируса в роллерах приводило к увеличению выхода вируса и повышению его титра до $8,5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$. Выделенный изолят ротавируса обладает антигенными свойствами и приводит к формированию иммунного ответа при внутримышечном введении кроликам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Выделение и характеристика изолятов ротавируса крупного рогатого скота / Г. С. Скитович [и др.] // *Научные основы в области охраны здоровья животных* / ФГУ «ВНИИЗЖ» // *Ветеринарная патология*. – 2006. – № 4. – С. 170–172.
2. Дороненкова, Г. Н. Выделение ротавируса крупного рогатого скота / Г. Н. Дороненкова, С. А. Чупин, А. М. Тимин // *Биотехнология*. – 2004. – № 4. – С. 47–52.
3. Повышение репродукции ротавируса крупного рогатого скота штамм 101 в перевиваемой культуре клеток / О. Н. Окулова [и др.] // *Труды федерального центра охраны здоровья животных*. – Владимир, 2005. – Т. 3. – С. 194–202.
4. Рамиевили, Л. Г. Серийное пассирование ротавируса крупного рогатого скота в гетерологичной культуре клеток / Л. Г. Рамиевили, Г. Г. Рухадзе, Е. А. Непоклонов // *Вопросы вирусологии*. – 1991. – № 6. – С. 521–523.
5. Сергеев, В. А. Ротавирусы. Вирусы и вирусные инфекции / В. А. Сергеев, Е. А. Непоклонов, Т. И. Алипер. – М.: Библионика, 2007. – С. 365–369.
6. Clark, B. *Tripsin enhancement of rotavirus infectivity mechanisms of enhancement* / B. Clark, J. R. Roth, M. L. Clark // *J. Virol.* – 1981. – V. 39. – P. 816–822.
7. *Cell culture propagation of rotaviruses* / L. J. Saif [et al.] // *Tissue culture methods*. – 1988. – V. 11, № 3. – P. 152–153.