

5. Hosoi, T. A food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto) / T. Hosoi, K. Kiuchi // Handbook of Fermented Functional Foods / Farnworth E.R. (editor). – Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2003. – 227-245 p.
6. Stamati, S. Probiotics in sows by administration of *Bacillus toyoi* spores during late pregnancy and lactation: effect on their status/performance and on litter characteristics / S. Stamati, C. Alexopoulos, A. Siochu, K. Saoulidis, S.C. Kyriakis // Int. J. Probiotics and Prebiotics. – 2006. – Vol. 1, N 1. – 33-40 p.
- УДК 619:616.98:578.821.21:615.371:636.32/.38

ПОДБОР КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К ВИРУСУ ОСПЫ ОВЕЦ

И.А. Пунтус, В.А. Бабак, А.А. Згировская, А.А. Силицкая

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

(Поступила в редакцию 01.07.2014 г.)

Аннотация. В статье представлены результаты исследования по методике получения первично-трипсинизированных культур клеток почки овцы и тестикул ягненка, их культивированию, а также опыты по подбору наиболее оптимальных условий культивирования перевиваемых линий клеток 3-KГ, ПО и ЯДК, чувствительных, по литературным данным, к вирусу оспы овец.

Summary The article presents the results of research on a procedure of reception primarily-trypsinogen cultures of cells of a kidney of sheep and testicles of lamb, their cultivation as well as experiences on selection of the optimal cultivation conditions of intertwined cell lines of 3-KG, KL and ODG, sensitive to a virus of sheep variola.

Введение. Оспа овец (Sheep pox) – высоко контагиозная особо опасная болезнь, характеризующаяся лихорадкой и образованием в эпителии кожи и слизистых оболочек папулезно-пустулезных поражений. Болезнь широко распространена в Турции, Иране, Пакистане, РФ, Афганистане, Индии, Марокко, Алжире, Тунисе, Ливии, Кувейте и мн. др. странах Азии и Африки.

Согласно решению МЭБ оспа овец и коз отнесена к группе А – быстро распространяющаяся болезнь животных. Болезнь наносит овцеводству огромный ущерб, включающий потери от гибели и вынужденного убоя больных животных, снижения продуктивности, обострением вторичных инфекций, затрат на проведение ветеринарно-санитарных и охранно-карантинных мероприятий [5].

В Республике Беларусь аналогов инактивированных и живых вирусвакцин для профилактики оспы овец не производится. Использование вакцин, завозимых из стран дальнего и ближнего зарубежья, экономически не оправдано из-за высокой себестоимости. Вступление

Республики в Таможенный Союз повысило риск заноса высококонтагиозных инфекций из Средней Азии, в том числе и оспы овец [6]. В связи с этим в Республике Беларусь идет разработка отечественной вакцины для профилактики оспы овец.

Цель работы – отработать методику получения и культивирования первично-трипсинизированных клеточных культур почки овцы (ПО) и тестикул ягненка (ТЯ), а также совершенствовать системы культивирования перевиваемых культур клеток 3-КГ (гонады козы), ЯДК (яичники домашней козы) и почки овцы (ПО), чувствительных к вирусу оспы овец.

Для достижения поставленной цели в наших исследованиях были поставлены задачи:

1. Отработать методику получения первично-трипсинизированных клеточных культур ПО и ТЯ;
2. Подобрать оптимальные среды культивирования для первично-перевиваемых и перевиваемых клеточных линий, чувствительных к вирусу оспы;
3. Определить оптимальные режимы культивирования клеток для пассажирования и заражения вирусом в матрасах и роллерах.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в отделе культур клеток и питательных сред и лаборатории биотехнологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

В опытах использовались первичная культура клеток тестикул ягненка (ТЯ) и первично-трипсинизированная культура клеток почки овцы (ПО), а также три перевиваемые линии – 3-КГ (гонады козы), ЯДК (яичников домашней козы) и ПО (почки овцы).

Первичную культуру клеток тестикул ягненка получали от ягнят 1-2 месячного возраста [3]. С этой целью после убоя мошонку перевязывали у основания и отрезали. В лаборатории кожу мошонки обжигали спиртовыми тампонами, после чего ножницами срезали кусочек кожи мошонки и извлекали тестикул. В стерильной чашке Петри разрезали белочную оболочку и вылушивали паренхиму тестикула в новую стерильную чашку. Ткань промывали раствором Хенкса с добавлением раствора антибиотиков (бензилпенициллина натриевая соль и стрептомицина сульфат по 300 ЕД/мл). Измельченную ткань промывали до просветления раствора. Отмытые клетки, находящиеся в растворе Хенкса, сливали стерильно и центрифугировали при 1000 об/мин 10 мин. К отмытым кусочкам тестикул добавляли раствор трипсина в соотношении 1:10 и трипсинизировали ткань при +37⁰С дробно по 5-7 минут (первую экстракцию проводили раствором трипсина, вторую –

раствором Хенкса и далее, продолжая чередовать до полного истощения тканей). После центрифугирования отмытой суспензии, надосадочную жидкость сливали, а осадок ресуспензировали в ростовой питательной среде.

Для получения первично-трипсинизированной культуры клеток почки овцы (ПО) использовали овец 2-месячного возраста [3]. Почки помещали в эмалированный кювет, поверхность фламбировали спиртовым ватным тампоном, удаляли капсулу, срезали ножницами корковый слой каждой доли почки, в стерильной чашке Петри измельчали до кусочков величиной 1-3 мм. Кусочки отмывали раствором Хенкса с добавлением антибиотиков (бензилпенициллина натриевая соль и стрептомицина сульфат по 300 ЕД/мл). Трипсинизировали ткани растворов трипсина из расчета 1:10 при 37 °С в течение 40-60 мин, затем проводили дезагрегацию тканей на шуттель-аппарате с подогревом дробно: через каждые 15 мин, сливая суспензию клеток. Полученную суспензию клеток центрифугировали при 1000 об/мин 10 мин. Надосадок сливали, а осадок ресуспензировали в ростовой питательной среде.

Перевиваемые клеточные линии – 3-КГ, ЯДК, ПО, использованные в опытах, депонированы в коллекции культур клеток РУП "Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского".

Культура клеток 3-КГ представляет собой фибробластоподобные полигональные клетки с кариологической характеристикой $2n=60$ [4]. На сформированном монослое культура представляет собой веретеновидно переплетенные клетки с округлым ядром. Первично полученная культура клеток 3-КГ культивировалась на полусинтетической питательной среде ПСС и добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

Культура клеток ЯДК представляет собой эпителиоподобные клетки с модальным числом хромосом 57-58 [4]. На сформированном монослое культура представляет собой веретеновидно переплетенные клетки. Среда культивирования по паспорту – ИглаМЕМ

Перевиваемая культура клеток ПО представляет собой эпителиоподобные клетки, кариологическая характеристика $2n=54$, модальное число хромосом 52 [4].

Для адаптации культур клеток использовали синтетические среды МЕМ, 199, ДМЕМ и ферментативные ФГМ-С (ферментативный гидролизат мышечных белков сухой) и ГЛА (гидролизат лактальбумина) в различных сочетаниях компонентов.

Адаптацию к сыворотке крови КРС проводили в течение 4 пассажей, заменяя ЭТС пошагово на 30, 50, 70 и 100%.

Культивирование клеток проводилось по общепринятой методике на пластиковых матрасах ($V=50-200 \text{ см}^3$), стеклянных матрасах ($V=1500 \text{ см}^3$) и стеклянных роллерных флаконах ($V=2000 \text{ см}^3$) [1]. Для определения количества клеток, индекса пролиферации и процента жизнеспособных клеток ежедневно снимали по три матраса в течение 7 дней жизненного цикла и проводили подсчет клеток в камере Горяева, используя 0,5% водный раствор трипанового синего по общепринятым методикам [2]. Каждые 12 ч в течение 5 суток проводили микроскопирование исследуемой линии клеток, оценивая состояние культуры, морфологию, формирование клеточного монослоя.

Результаты исследований и их обсуждение. Для эффективного роста первично-трипсинизированных культур клеток ПО и ТЯ и перевиваемых линий 3-КГ, ЯДК И ПО проводился тщательный подбор синтетических и ферментативных питательных сред, различающихся аминокислотным, витаминным и солевым составом для конкретной производственной линии клеток в условиях определенных схем и методов культивирования [2].

В опытах по подбору и модификации среды использовали ферментативные и синтетические питательные среды: 0,25% гидролизат мышечных белков (ФГМ-С), гидролизат лактальбумина, ИглаМЕМ, среда 199, ДМЕМ. Во всех вариациях питательных сред использовали добавление 10% сыворотки крови КРС, антибиотики – бензилпенициллина натриевая соль и стрептомицина сульфат в дозе 100 ЕД/мл и корректирующий рН 7,57% раствор бикарбоната натрия.

В качестве компонентов обогащения модифицированных питательных сред использовали добавки глюкозы (до 2000 мг/л) и глутамина (100-150 мг/л). Глюкоза является легкодоступным энергетическим материалом для перевиваемых культур клеток. Глутамин, как незаменимая аминокислота, содержится в ферментативных средах в недостаточных количествах и требует обязательной корректировки в питательной среде, используемой для выращивания клеток, т.к. является лимитирующим фактором, который сказывается на ростовых свойствах клеток в длительных пассажах.

Опытным путем для культивирования первично-трипсинизированной почки овцы подобрана среда 0,5% ГЛА+Игла (1:1) с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота, посевная концентрация 600-1000 тыс. кл/мл, монослой формируется на 4-5 сутки, для получения 2-суточного монослоя посевная концентрация составила 1300-1500 тыс. кл/мл.

Для культивирования первичных клеток ТЯ наиболее оптимальной оказалась комбинированная среда 0,3% ФГМ-С+ДМЕМ (3:1) с

добавлением 10% сыворотки крови КРС, посевная концентрация 400-600 тыс. кл/мл, монослой формируется на 3-5 сутки, для получения 2-суточного монослоя посевная концентрация составила 800-1000 тыс. кл/мл.

Результаты исследований роста перевиваемой линии клеток 3-КГ представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, наилучший результат был получен при культивировании линии 3-КГ на комбинированной среде ФГМС+ДМЕМ 3:1. Средний выход с матраса составил $39,03 \pm 5,2$ млн. кл./мат. против базового варианта ИглаМЕМ $33,33 \pm 4,08$ млн. кл./мат., при этом индекс пролиферативной активности составил 2,6 против 2,2 (базовый вариант на среде Игла МЕМ). Ростовые свойства линии на других комбинированных средах были значительно ниже (ИПА составил от 1,7 до 2,1).

Таблица 1 – Данные исследования ростовых свойств клеток 3-КГ при культивировании стационарным способом

Компоненты среды	Проведено пассажей	Выход клеток с матраса, ср. знач., млн.кл.	Индекс пролиферации
Игла МЕМ*	4	$33,33 \pm 4,08$	2,2
199	6	$25,27 \pm 5,48$	1,7
ДМЕМ	6	$31,67 \pm 6,63$	2,1
ФГМ-С	6	$28,33 \pm 5,35$	1,9
ФГМ-С+ДМЕМ	10	$39,03 \pm 5,2$	2,6
ИглаМЕМ+ДМЕМ	8	$30,0 \pm 7,05$	2,0

* – базовый вариант культивирования $P < 0,05$

Оптимальная посевная концентрация при культивировании на модифицированной среде ФГМС+ДМЕМ 3:1 составила 70-110 тыс. кл/мл для проведения 5-7 суточных пассажей (рис. 1).

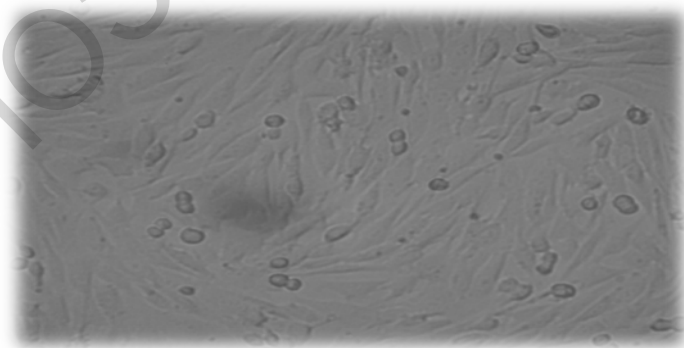


Рисунок 1 – Интактный монослой культуры клеток 3-КГ, 48 ч роста культивирования на среде ФГМ-С+ДМЕМ

В дальнейшем подбиралась посевная концентрация клеток 3-КГ для получения полного монослоя через 48 и 72 часа. Оптимальная посевная концентрация составила 170 и 130 тыс. кл./мл $\pm 15\%$ соответственно. С посеянных матрасов на 2-е и 3-е сутки снимали монослой для определения концентрации выросших клеток, что в последующем учитывалось при расчете дозы заражения вирусом. Так, при 2-суточном цикле культивирования (170 тыс. кл./мл) на вторые сутки в монослое было 30-35 млн. кл./матр, а на третьи сутки (130 тыс. кл./мл) – 34-39 млн. кл./матр.

В ходе дальнейших исследований была подобрана посевная концентрация клеток для культивирования линии 3-КГ роллерным способом.

При выращивании на ростовой среде ФГМ-С+ДМЕМ (3:1) с добавлением 10% сыворотки крови КРС оптимальная посевная концентрация клеток составила 30-35 млн. кл./рол. для проведения пассажей (5-суточный цикл культивирования) и 50-55 млн. кл./рол. для выдачи через 48 ч на заражение.

Базовым (паспортным) вариантом культивирования перевиваемой культуры клеток ЯДК является синтетическая среда Игла МЕМ. Результаты опытов по подбору наиболее оптимальной среды культивирования для линии ЯДК приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Данные исследования ростовых свойств клеток ЯДК при культивировании стационарным способом

Компоненты среды	Проведено пассажей	Выход клеток с матраса, ср. знач., млн.кл.	Индекс пролиферации, ср. знач.
ИГЛА*	6	39,12 \pm 5,64	2,6
199	6	21,36 \pm 5,34	1,4
ДМЕМ	6	36,78 \pm 4,67	2,4
ФГМ-С	6	22,83 \pm 6,15	1,5
ФГМ-С+ДМЕМ	8	29,2 \pm 6,74	1,9
ИГЛА+ДМЕМ	7	43,65 \pm 4,31	2,9

По результатам исследований, приведенным в таблице 2, наиболее оптимальной средой культивирования оказалась комбинированная среда ИГЛА+ДМЕМ (1:1) с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота.

Средний выход клеток с матраса составил 43,65 \pm 4,31 млн. клеток (средний ИПА - 2,9). Выращивание на монокомпонентных средах обеспечивало выходы не более 39,12 \pm 5,64 млн.кл. при ИПА=2,6 (базовый вариант Игла МЕМ).

С целью культивирования клеток в пассажах 5-ти суточными циклами опытным путем была подобрана оптимальная посевная концентрация, которая составила 100 тыс. кл./мл $\pm 15\%$.

Для получения полного монослоя через 48 и 72 часа культивирования перевиваемой линии клеток ЯДК оптимальная концентрация клеток составила 170 и 130 тыс. кл./мл±15% соответственно. При 2-суточном цикле культивирования на вторые сутки в монослое было 35-38 млн. кл./матр, а при 3-суточном цикле – 37-41 млн. кл./матр.

В ходе дальнейших исследований нами была отработана методика накопления культуральной массы в роллерных сосудах: посевная концентрация на роллер объемом 2 л составила 30-35 млн. кл./рол. (для проведения пассажей 5-ти суточными циклами) и 50-55 млн. кл./рол. для выдачи через 48 ч на заражение.

Для культивирования перевиваемой линии клеток ПО базовым вариантом является среда ИглаМЕМ. Результаты подбора наиболее оптимальной среды культивирования линии приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Данные исследования ростовых свойств клеток ПО при культивировании стационарным способом

Компоненты среды	Проведено пассажей	Выход клеток с матраса, ср. знач., млн.кл.	Индекс пролиферации, ср. знач.
Игла МЕМ*	8	38,71±4,76	3,9
199	8	24,43±5,69	2,4
ДМЕМ	8	36,21±5,28	3,6
ИглаМЕМ+ДМЕМ	8	40,94±5,35	4,1
Игла МЕМ +199	8	30,62±4,29	3,1

Исходя из результатов исследований, приведенных в таблице 3, средний выход клеток с матраса на базовой среде ИглаМЕМ составил 38,71±4,76 млн. кл. (ИПА=3,9). Ростовые свойства на монокомпонентных синтетических среда были хуже базового варианта (ИПА не превысил 3,6). Наилучшие результаты линия показала при культивировании на комбинированной синтетической среде ИглаМЕМ+ДМЕМ: средний выход с матраса составил 40,94±5,35 при ИПА=4,1.

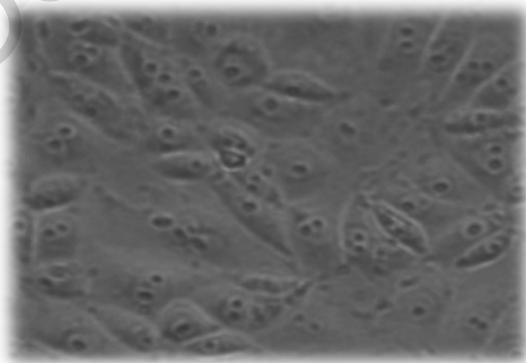


Рисунок 2 – Перевиваемая культура клеток ПО,
48 часов культивирования на среде ИГЛА+ДМЕМ

Оптимальная посевная концентрация для культивирования в культуре клеток ПО на среде ИглаМЕМ+ДМЕМ в пассажах на 1,5-литровых матрасах 5-суточными циклами составила 65 тыс. кл/мл $\pm 15\%$. (рис. 2). Для получения полного монослоя в матрасах через 48 и 72 часа после посева для последующего накопления вируса составила 120 и 100 тыс. кл/мл $\pm 15\%$ соответственно. При 2-суточном цикле культивирования (120 тыс. кл/мл) на вторые сутки в монослое было 35-38 млн. кл./матр, а на третьи сутки (100 тыс. кл/мл) – 40-43 млн. кл./матр.

В ходе дальнейших исследований отработана методика накопления перевиваемой линии клеток ПО в роллерных сосудах объемом 2 л: ростовая среда ИГЛА+ДМЕМ (1:1) + 10% сыворотки крови КРС, посевная концентрация на роллер объемом 2 л – 25-30 млн. кл./рол. для проведения пассажей (5-суточными циклами) и 45-50 млн. кл./рол. для выдачи через 48 ч на заражение.

При подборе наиболее оптимальной ростовой питательной среды для каждой из перевиваемой линии культур клеток отрабатывались методики обогащения глюкозой и глутамином в дозировках 0,2 г/л и 100-150 мг/л соответственно.

При обогащении модифицированной питательной среды ФГМ-С+ ДМЕМ (3:1) для культуры клеток 3-КГ, средние выходы увеличились до $41,89 \pm 5,34$ против исходного $39,03 \pm 5,2$ млн. кл./мат. Для остальных линий клеток, обогащение глюкозой и глутамином привело к незначительному снижению пролиферативной активности клеток.

Заключение. Таким образом, опытным путем были отработаны методики получения и культивирования первично-трипсинизированных клеточных культур почки овцы (ПО) и тестикул ягненка (ТЯ), а также усовершенствованы системы культивирования перевиваемых культур клеток 3-КГ (гонады козы), ЯДК (яичники домашней козы) и почки овцы (ПО), чувствительных к вирусу оспы овец.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс, Р. Методы культуры клеток для биохимиков / Р. Адамс. – М.: Мир, 1983. – 263 с.
2. Аттестации перевиваемых клеточных линий – субстратов производства и контроля медицинских и иммунобиологических препаратов: методические указания. – М., 1989. – 33 с.
3. Дьяконов, Л.П. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / Под общ. ред. проф. Дьяконов Л.П. – М.: Издательство «Спутник+», 2009. – 656 с.
4. Российская коллекция клеточных культур позвоночных (РККК П) [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые данные и прогр. (2,33 Мб). – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
5. Особо опасные болезни животных И.А. Бакулов, В.М. Котляров, Т.А. Власова [и др.]. – Покров: ВНИИВВиМ, 2002. – 97-106 с.

6. Хухоров, И.Ю. Оспа овец в странах СНГ / И.Ю. Хухоров // Биологоэколог, проблемы заразных болезней диких жив-х и их роль в патологии сх. жив-х и людей: матер. Междунар. науч.-практ. конф. Покров, 2002. – 206-211 с.

УДК 619:636.4.053:612.3(476)

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТА «ЭНАТИН» ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ПОРОСЯТ

А.П. Свиридова, С.Л. Поплавская, И.М. Лойко, О.В. Копоть

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,

г. Гродно, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 01.07.2014 г.)

Аннотация. Изучалась эффективность использования пробиотического препарата «Энатин» для профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта поросят. Установлено, что применение данного препарата поросётам-отъёмышам в дозе 1,5 мл на голову в течение 30 дней положительно влияет на биохимические процессы, протекающие в организме, что является залогом здоровья и высокой продуктивности животных, способствует профилактике заболеваний желудочно-кишечного тракта и оказывает положительное влияние на интенсивность роста и развития животных.

Summary. The efficiency of the use of probiotic preparation "Enatin" for the prevention of diseases of the gastrointestinal tract of pigs was studied. It is established that application of the preparation to weaned piglets at a dose of 1.5 ml per head for 30 days normalizes hematological and biochemical blood indices of piglets, improves clinical status and more rapid recovery of the animals. Furthermore, the use of probiotic preparation "Enatin" has positive effect on biochemical processes in the body, which is key to health and high productivity of the animal. It helps to prevent diseases of the gastrointestinal tract and has a positive effect on the rate of growth and development of animals.

Введение. На современном этапе ведения животноводства сложились условия, которые позволили комплексно решать вопросы повышения производства продуктов животного происхождения при минимальных затратах труда и средств. Однако эти новые методы ведения животноводства, специфика технологии содержания и кормления животных существенно изменили среду их обитания, т. е. на ограниченных площадях сконцентрировано большое количество разновозрастных животных. В таких условиях практически все возбудители могут приобрести патогенные свойства [2].

По данным многих авторов, массовые желудочно-кишечные болезни молодняка имеют широкое распространение. В отдельных хо-