

Розділ 9. Короткі та дискусійні повідомлення

УДК 576.858+576.89:616.092.4

КОКУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСА ЯЩУРА СО СВОБОДНОЖИВУЩЕЙ ИНFUЗОРИЕЙ *PARAMECIUM CAUDATUM*

Восканян Г.Е., Восканян А.Г.

Научный центр оценки и анализа рисков безопасности пищевых продуктов ГНКО МСХ РА, Армения

Байрамян Н. В., Каралян З.А.

Институт Молекулярной Биологии НАН РА, лаборатория клеточной биологии, Армения

Различные типы вируса ящура (ВЯ) являются одними из наиболее широко распространенных пикорнавирусов. Высокая восприимчивость диких и домашних животных к инфекции вирусом, обусловила их важное экономическое значение для человека. Однако, несмотря на значимость этого явления, вплоть до настоящего времени некоторые аспекты экологии вируса остаются не выясненными. В частности мало изученным является вопрос о выживании вируса в водной среде, не исследованы аспекты взаимодействия ВЯ со свободноживущими простейшими пресных вод [1, 2].

С учетом вышесказанного целью нашей работы было изучение экологии ВЯ в системе простейшее-вирус. В качестве модели простейшего мы использовали *Paramecium caudatum*, как одну из наиболее распространенных инфузорий пресных вод.

Материалы и методы. В работе использовался ВЯ типа О (штамм НКР 2007). Культивация и титрование вируса проводилось на чувствительной культуре клеток – ВНК-21. Вирусный титр рассчитывался по общепринятой методике. Исходная доза вируса во всех опытах составила $5.0 \text{ ТЦД}_{50/\text{мл}}$. Изучение всех параметров проводилось в сроки 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 часов после заражения инфузорий вирусом.

Клетки культивировались в среде Eagle MEM с добавлением 10 % бычьей сыворотки. Посевная доза 1×10^6 клеток/мл.

В качестве модели простейшего были выбраны инфузории вида *Paramecium caudatum*, взятые из бассейна реки Гетар (Ереван). При этом инфузории содержались на солевой среде Лозина-Лозинского с добавлением дрожжевого отвара, по методике полунепрерывного культивирования с ежедневной заменой части среды, при температуре 22 ± 1 eC в стеклянных колбах объемом 200 и 300 мл. Инфузории отмывались в чистой солевой среде и с помощью микропипетки по 10 особей помещались в лунки планшета для культуры тканей с минимальным количеством отмывочной среды. Затем в лунки вносилось по 0,9 мл культуральной среды и 0,1 мл исследуемого вируса в стандартной концентрации [3].

Помимо живого вируса параллельно использовался инактивированный вирус с целью возможного определения вирусных частиц в качестве пищевого продукта.

Для исследования возможного влияния протеолитических ферментов инфузорий на ВЯ, одновременно титровался ВЯ, кокультивируемый с разрушенными трехкратным замораживанием и оттаиванием инфузориями.

Для определения влияния инактивированного вируса на пролиферативную активность инфузорий использовался термически инактивированный вирус, которая проводилась путем 40 минутной инкубации вируса при температуре 60 °C.

Опыты повторялись 3 раза, затем суммировались, статистически обрабатывались и их усредненные значения были представлены в статье.

Результаты исследований. На рисунке 1 изображен рост числа особей *P. caudatum* в течение 9 дней. В определенный момент возможность роста культуры инфузорий оказывается исчерпанной и устанавливается некоторое равновесие при непрерывно сохраняемом уровне пищевых ресурсов. Колебания популяции около этого положения равновесия незакономерны и зависят от разнообразных случайных причин (колебания температуры, небольшая изменчивость в составе синтетической среды и т.д.). В нашем случае это равновесие наступает примерно к 96 часам после начала опыта. Под действием ВЯ происходит резкое увеличение числа инфузорий. Разница с контролем становится достоверной ($p < 0.05$) уже к 48 часам от начала опыта, и достигает максимума к 96 часам, когда число инфузорий в опытной группе более чем в четыре раза превосходит число инфузорий в контроле. Одновременное кокультивирование *P. caudatum* с инактивированным вирусом не вызывало изменения в числе инфузорий по сравнению с контролем (рис. 1).

Как следует из рисунка 2, при кокультивировании с инфузорией, титр вируса в среде падает со скоростью намного превышающей контрольные показатели. Если в контроле в течение опыта титры ВЯ снизились на $1,5 \log_{10}$, то при кокультивировании с живыми инфузориями титры снизились примерно на $3,0 \log_{10}$. Снижение титров начинается после 24 часов от начала кокультивирования и продолжается вплоть до 8-х суток. Содержание ВЯ с разрушенными *P. caudatum* не вызывало отличных от контроля изменений в инфекционности вируса (рис. 3). При разрушении инфузорий, кокультивируемых с ВЯ, продемонстрировано высвобождение вируса, однако в очень низких титрах – около $1 \log_{10}$ (рис. 3).

Известно, что парамеции являются универсальными фильтрующими организмами, способными собирать взвешенные частицы из водной среды. Этим можно объяснить резкое снижение содержания вируса в культуральной среде при кокультивировании с инфузориями. О том, что вирусы могут являться дополнительным пищевым источником для инфузорий свидетельствуют данные [4] об использовании бактериофагов инфузорией *Tetrahymena* в качестве дополнительного пищевого ресурса. Вирусы являются источником белков и нуклеиновых кислот, которые могут быть усвоены инфузориями и служить дополнительным источником пищевых ресурсов. Возможно этим объясняется показанная нами ускоренная инактивация ВЯ в присутствии живых инфузорий, с одновременным ростом численности последних в присутствии живого вируса.

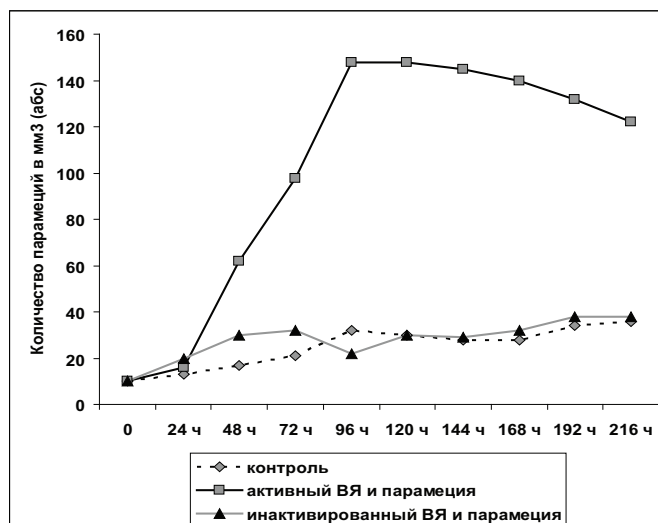


Рис. 1 Количество *Paramecium caudatum* в 1 мл среды в контроле и при коинкубации с инактивированным и живым вирусом ящура

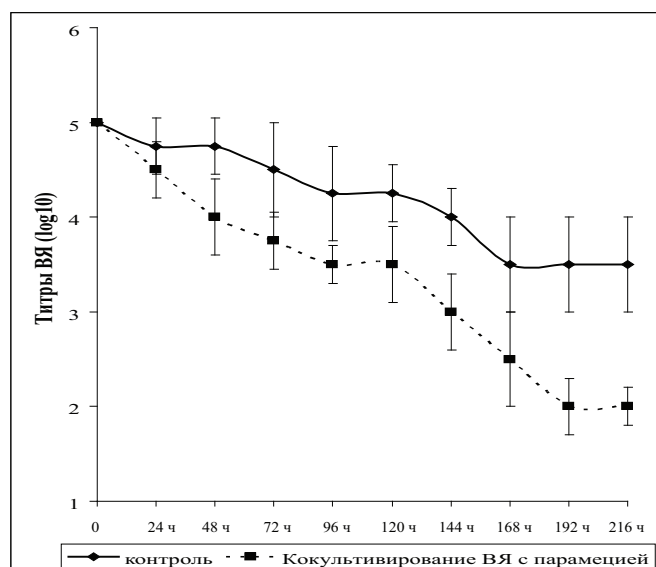


Рис. 2 Титры живого вируса ящура в контроле и при кокультивировании с *Paramecium caudatum*

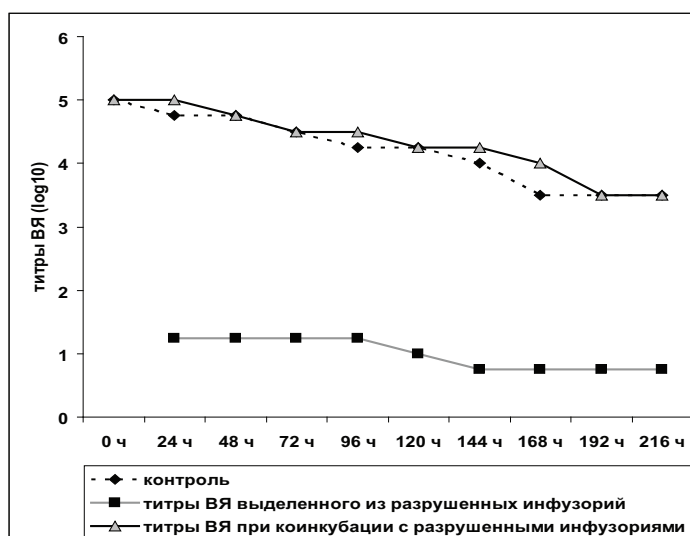


Рис. 3 Уровень инфекционных титров ВЯ при коинкубации с разрушенными инфузориями, с выделенным ВЯ из разрушенных инфузорий и без инфузорий (контроль)

Однако объяснение подобного эффекта только тем, что инфузория использует вирус в качестве пищевого ресурса сложно и прежде всего потому что инактивированный вирус не вызывает подобного эффекта – численность инфузорий в данной группе практически не отличалась от контрольной. Следовательно только наличие активного ВЯ может приводить к ускоренной пролиферации инфузорий.

Одновременно с этим нами показано сравнительно длительное (не менее 9-10 суток) освобождение инфекционных частиц ВЯ из разрушенных инфузорий. Эти данные говорят в пользу устойчивости ВЯ к пищеварительным ферментам парамеций.

Все вышесказанное демонстрирует необходимость дальнейших исследований взаимодействия пикорнавирусов со свободноживущими инфузориями пресных вод.

Список литературы

1. Kim, T. D., and H. Unno. The roles of microbes in the removal and inactivation of viruses in a biological wastewater treatment system. *Water Sci. Technol.* 1996; 33:243-250. 2. Di Nardo A, Knowles NJ, Paton DJ. Combining livestock trade patterns with phylogenetics to help understand the spread of foot and mouth disease in sub-Saharan Africa, the Middle East and Southeast Asia. *Rev Sci Tech.* 2011; 30(1):63-85. 3. Мамаева, Н.В. Инфузории бассейна р. Волги. Экологический очерк/ Н. В. Мамаева. – Л.: Наука, 1979. – 150 с. 4. Hennemuth W, Rhoads LS, Eichelberger H, Watanabe M, Van Bell KM, Ke L, Kim H, Nguyen G, Jonas JD, Veith D, Van Bell CT. Ingestion and inactivation of bacteriophages by Tetrahymena. *J Eukaryot Microbiol.* 2008; 55(1):44-50.

COCULTIVATION OF FMDV WITH FREE LIVING CILIATA PARAMECIUM CAUDATUM

Voskanyan H.E., Voskanyan A.H.

Scientific Center for Assessment and Analysis of Risks of Food safety, Yerevan, Armenia

Bairamyan N.V., Karalyan Z.A.

Institute of Molecular Biology NAS RA, Yerevan, Armenia

In our paper there has been investigated the relationship between foot-and-mouth disease virus (FMDV) and Paramecium caudatum during cocultivation. We show that the number of Paramecium in medium sharply increased during coincubation with active FMDV within 2-4 days. At the same time the titer of viruses harshly decreased whereas in the control group, which is free from Paramecium, the fall of titer was insignificant. Picornaviruses were eliminated from medium with alive Parameciums. All above mentioned cannot be explained only by the fact that viruses were nutrient source for Paramecium because in case of inactivated viruses the number of infusorians in medium increased a little.

ІННОВАЦІЙНІ НАУКОВІ РОЗРОБКИ НАЦІОНАЛЬНОГО НАУКОВОГО ЦЕНТРУ «ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ» ДЛЯ ПРАКТИКИ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

Вовк С.І.,

директор ТОВ «Науково-дослідне підприємство «Ветеринарна медицина», м. Харків

Товариство з обмеженою відповідальністю «Науково-дослідне підприємство «Ветеринарна медицина» здійснює виробництво та реалізацію оригінальних засобів захисту тварин, розроблених науковцями Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини».

ТОВ «Науково-дослідне підприємство «Ветеринарна медицина» створене у 2008 році. Підприємство виготовляє понад 60 найменувань лікувально-профілактичних та діагностичних препаратів, з яких 15 надходить до лабораторій ветеринарної медицини за замовленням Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України.

Не залишаються поза увагою й дрібні приватні підприємства, власники присадибних господарств. Товариство співпрацює з господарствами всіх форм власності та фізичними особами. Ветеринарні препарати, що випускаються на його базі, сприятимуть утриманню стійкого епізоотичного благополуччя й заповненню ринку діагностичними та лікувально-профілактичними засобами вітчизняного виробництва, які не поступаються за своїми показниками зарубіжним аналогам і широко використовуються у ветеринарії всіх регіонів України.

Серед препаратів, які традиційно користуються попитом у виробників сільськогосподарської продукції, можна назвати вакцини для курей проти хвороб Гамборо, Марека та Ньюкасла, високопатогенного грипу птиці; а також інноваційний продукт, створений за новітніми технологіями у відповідності до найкращих існуючих аналогів і світових біопромислових досягнень вакцину інактивовану проти інфекційного ринотрахеїту, парагрипу-3 та вірусної діареї ВРХ, вакцину інактивовану концентровану проти інфекційного ринотрахеїту та вірусної діареї великої рогатої худоби, вакцину інактивовану проти інфекційного ринотрахеїту та парагрипу-3 ВРХ «Рипавак-3», вакцину інактивовану проти ротавірусної і коронавірусної інфекцій ВРХ «Рокоген», вакцину «Сальколі», лікувально-профілактичну сироватку проти колібактеріозу (сальмонельозу) молодняку тварин, засіб для діагностики хвороби Ауєскі свиней «Аулергін», препарати проти інфекційних та інвазійних хвороб бджіл, дезінфекції та знезараження бджоло знряддя та реманенту та інші.

Для біотехнологічного виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна Медицина» пропонує сироватку великої рогатої худоби, живильні середовища Ігла модифіковане (ДМЕМ) та 199, розчини версена та трипсину.

Враховуючи сучасні методи у діагностиці захворювань пропонуються нові розробки: тест-система для виявлення РНК вірусу високопатогенного грипу птиці субтипу H5N1 методом полімеразної ланцюгової реакції, тест-система для детекції провірусної ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби методом полімеразної ланцюгової реакції «BLV-provirus DNA-тест», «Тест-система для виявлення РНК вірусу ньюкаслської хвороби «Poul RNA test-NDV», «Тест-система для виявлення ДНК вірусу IPT ВРХ «Bovi DNA test IRT», «Тест-система для детекції провірусної ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби методом ПЦР «BLV-PROVIRUS DNA-ТЕСТ», «Тест-система для виявлення РНК вірусу діареї ВРХ «Bovi RNA test BVDV», «Набір компонентів для визначення антитіл до вірусу інфекційної бурсальної хвороби ІФА», «Набір компонентів для визначення антитіл до вірусу хвороби Ньюкасла ІФА», «Набір компонентів для визначення антитіл до вірусу інфекційного бронхіту курей ІФА».

Багато уваги на підприємстві приділяється підвищенню якості препаратів, оновленню матеріально технічної бази, створенню