

розплодки аденовірусу людини (*Adenovirus type 3*) була виявлена ДНК аденовірусу людини 3 типу в достатній кількості для гель-детекції. У пробах №№ 1-6, 8, 11, 12 амплікони з довжиною 462 пар нуклеотидів не знайдено.

Отже, зберігання Ade 3 упродовж 12 років за температури мінус 20 °С призводить до значної деструкції ДНК, на що вказує відсутність ампліконів довжиною 462 пар нуклеотидів у 9 пробах з 12 досліджених культуральних зразків аденовірусу людини. Отримані результати свідчать, що довгострокове зберігання досліджених вірусів у вищенаведених умовах не є оптимальним.

**Висновки.** Кріоконсервування вірусу грипу птахів штаму «А/курка/Сиваш/02/05(Н5N1)» в умовах помірно-низької температури мінус 20 °С, мінус 70 °С і за температури рідкого азоту мінус 196 °С протягом 25 діб дозволяє зберігати такі біологічні властивості як інфекційна активність та аглютинуючі властивості на вихідному рівні. Зниження інфекційної активності на 0,8 lg спостерігалось в зразках, кріоконсервованих при мінус 20 °С, що зберігалися в даних умовах протягом 115 та 210 діб. Після зберігання вірусу протягом 7 місяців за температури мінус 70 °С та у рідкому азоті інфекційні властивості не змінилися в порівнянні з вихідними.

Результати молекулярно-генетичних та електронно-мікроскопічних досліджень кріоконсервованих зразків РВ мавп, подібно до людського, які зберігалися за мінус 20 °С упродовж 18 років показали, що в процесі тривалого зберігання в умовах помірно-низької температури відбувається руйнування віріонів і концентрація вірусу у суспензії зменшилась нижче інфікуючої дози.

Зберігання кріоконсервованого аденовірусу (Ade 3) людини протягом 12 років в умовах температури мінус 20 °С призводить до деструкції компонентів вірусних часток, з втратою ними інфекційної активності, значної деструкції ДНК, на що вказує відсутність ампліконів довжиною 462 пар нуклеотидів у 9 пробах з 12 досліджених культуральних зразків аденовірусу людини. Отримані результати свідчать, що довгострокове зберігання досліджених вірусів РВ та Ade 3 у вищенаведених умовах не є оптимальним.

Електронно-мікроскопічні дослідження вірусу ньюкаслської хвороби ізоляту «ІФ-07», показали пошкодження ліпопротеїдної оболонки віріонів кріоконсервованих в умовах мінус 20 °С протягом 30 діб. Тому оптимальним режимом тривалого кріоконсервування вірусів є їх кріоконсервування та збереження за температури рідкого азоту (мінус 196 °С).

### Список літератури

1. Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных методом полимеразной цепной реакции. /Под ред. А.А.Гусева, А.Н.Панина. – Владимир: ОК НИИ и МС ВНИИЖЗ, 1998. – 519 с.
2. Микробиологические и микроскопические методы исследований в ветеринарной медицине. Справочное пособие. / А.Н. Головкин, В.А. Ушкалов, В.Г. Скрыпник, Б.Т. Стегний и др.; Под ред. А.Н. Головкин. – Харьков. «НТМТ», 2007. – 512 с.
3. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ. /Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с.
4. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals //Edited by the OIE Biological Standards Commission. Fifth Edition, – 2004. - Vol. 1. – P. 474-485.
5. Стегний, М.Ю., Волянський, Ю.Л., Стегний, Б.Т.. Інфекційні й молекулярно-генетичні властивості кріоконсервованих штамів адено- і ротавірусів // Мікробіологічний журнал. – 2008. – 70, №4. – С. 51-56.

## PROLONGED CONSERVATION OF VIRUSES AT LOW TEMPERATURES IN BIOTECHNOLOGY OF DEVELOPMENT OF IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS

Stegniy M. Yu.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Kharkiv

Conservation of morphology, ultrastructure and biological properties of viruses that are used in development of immunobiological preparations at different conditions of its cryoconservation is studied in the article. It was proved that the cryoconservation at the temperature of liquid nitrogen (minus 196 °C) is the most optimal regime which provides the safety of its ultrastructure and biological properties.

УДК 619:616.98:579.842.11:631

## МЕТОД ГЛИБИННОГО КУЛЬТИВУВАННЯ ЕНТЕРОТОКСИГЕННИХ *ESCHERICHIA COLI*

Сухарєв Ю.С.

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

В основі більшості методів отримання ентеротоксинів лежить здатність бактерій продукувати ці речовини в оточуючий клітинний простір (екзотоксини). У зв'язку з цим, при вирощуванні токсигенних штамів в рідких поживних середовищах ентеротоксини накопичуються в культуральній рідині. Відділяючи центрифугуванням або фільтрацією бактерійні клітини від середовища культивування, отримують безклітинний супернатант що містить нативні ентеротоксини [1].

Було помічено, що штами *Escherichia coli* – продуценти термолабільного (LT) і термостабільного (ST) ентеротоксинів по різному проявляють свою здатність до синтезу того або іншого типу токсинів в рідких поживних середовищах різного складу [2].

У зв'язку з цим була поставлена мета удосконалити метод глибокого культивування токсигенних штамів *E.coli*, шляхом визначення найбільш ефективних поживних середовищ і оптимальних параметрів для токсиноутворення.

**Матеріали і методи досліджень.** Токсигенні штами *E. coli* O9 ST і O26 LT з колекції лабораторії хвороб молодняка ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН України. Поживне середовище Finkelstein [3]. Синтетичне поживне середовище [4].

Глибоке культивування токсигенних штамів *E. coli*, здійснювали в розробленому малогабаритному лабораторному реакторі (МЛР), схема облаштування якого показана на рис. 1.

Ентеротоксигенні штами *E. coli* O26 LT і O9 ST висівали окремо на Синтетичне поживне середовище і середовище Finkelstein, в пробірках по 10 мл і двічі пересівали впродовж 5 годин. Після повторного пасажу культури пересівали в 500 мл флакони, і інкубували при 37 °С впродовж 4-х годин, потім, з дотриманням правил асептики, цим матеріалом засівали бутлі МЛР об'ємом 10 л, причому співвідношення об'єму середовища до об'єму бутля не перевищувало 1/5, а об'єм мікробного матеріалу, що засівався, не менше 1/50 об'єму середовища. Культивування штамів проводили при 37 °С впродовж 18 годин.

Для стерилізації подаваного в культуральне середовище повітря, патрубок подання повітря мікрокомпресора МК-1 (призначеного для аерації повітря в акваріумах) сполучали за допомогою гнучкого гумового шланга, діаметром 6-8 мм, з верхнім патрубком малогабаритного фільтра Зейтца із стерилізуючою пластиною.

МК-1 підключали до джерела електричного струму 220 В, і уся система поміщалася в термостат при 37 °С на 18 годин. Необхідний режим аерації підтримували за допомогою регулятора, що знаходиться на тильній стороні мікрокомпресора. Через зливний патрубок скляної ємності, кожні дві години, відбирали проби мікробної суспензії і визначали рівень накопичення бактерійних клітин за оптичним стандартом каламутності.

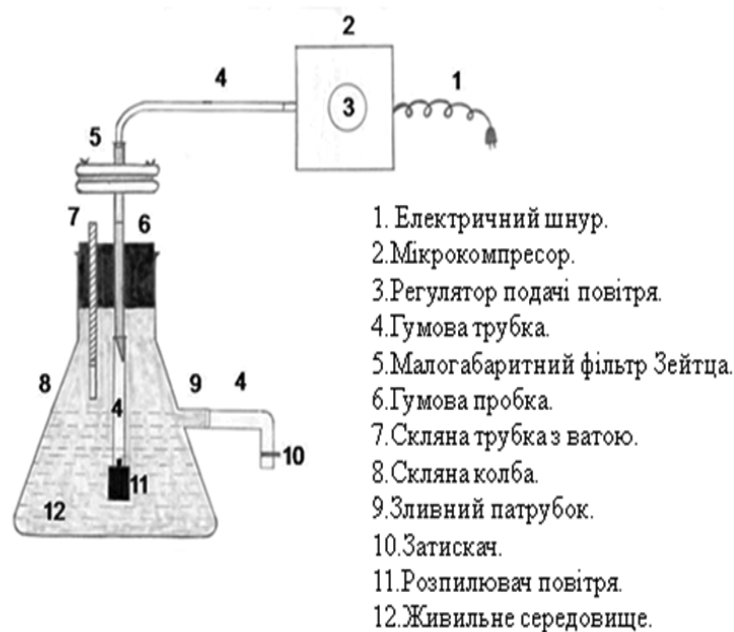


Рис.1 Схема облаштування малогабаритного лабораторного реактора (МЛР) для культивування токсигенних штамів *E.coli*

Рівень рН культуральної рідини контролювали кожні дві години, і підтримували його на рівні 7,0-7,5 за допомогою 10 % розчину NaOH, який вносили ін'єкційним шприцем через зливний патрубок скляної ємкості.

Контрольне культивування токсигенних штамів *E.coli* здійснювали в 10 л скляних ємкостях з Синтетичним поживним середовищем і середовищем Finkelstein, впродовж 18 годин при 37 °С, без аерації, перемішування і корекції рН.

Через 18 годин росту, бакмасу відділяли центрифугуванням на рефрижераторній центрифугі при 5000 g впродовж 30 хвилин. Культуральна рідина позбавлена бакмаси, була токсинівмістним матеріалом.

**Результати досліджень.** Критерієм оцінки поживних середовищ була здатність індукувати максимальний синтез ентеротоксинів, при рівних параметрах культивування токсигенних штамів.

Вивчення динаміки накопичення мікробних клітин показало, що токсигенні штами *E.coli* мали нетривалу лаг-фазу, яка тривала не більше 1 години. Експоненціальна фаза росту тривала до 10 годин. Про закінчення експоненціальної фази свідчило припинення інтенсивного накопичення бактерійних клітин і підвищення рН середовища до 7,6-7,8, після чого наставала стаціонарна фаза, яка закінчувалася через 14 годин культивування.

Визначили, що незалежно від вибору поживного середовища і методу культивування, максимальне накопичення мікробних клітин *E.coli* і ентеротоксинів, відбувалося в період експоненціальної фази росту токсигенних штамів, і досягало максимуму до 10-ої години культивування.

Була встановлена тісна кореляція ( $r=0,992$ ) між кількістю мікробних клітин токсигенних штамів в поживному середовищі при експоненціальному рості і титром ентеротоксинів.

Культивування токсигенних штамів *E.coli* в МЛР, на середовищі Finkelstein на протязі 18 годин, призводило до накопичення мікробних клітин в 5-6, а – ентеротоксинів в 2-4 рази більше, ніж при звичайному культивуванні без аерації і перемішування.

Культивування штамів *E.coli* на Синтетичному поживному середовищі за тих же умов, збільшувало накопичення бактерійних клітин в 2,5-5,8, а титр ентеротоксинів в 2,5-4,0 разів порівняно з контрольним культивуванням.

Порівнюючи показники накопичення бактерійних клітин і титр ентеротоксинів, при контрольному культивуванні штамів *E.coli* на Синтетичному середовищі і середовищі Finkelstein, встановили, що кількість мікробних клітин і титр ST – ентеротоксина через 18 годин росту на Синтетичному середовищі був в 2,3, а кількість мікробних клітин і титр LT –энтеротоксина в 1,6 разів вище, ніж на середовищі Finkelstein (табл.).

Таблиця – Кількість мікробних клітин *E.coli* і титр ентеротоксинів в поживному середовищі Finkelstein і Синтетичному поживному середовищі, після 18 годин культивування токсигенних штамів O26 LT і O9 ST

| Штам <i>E.coli</i>  | Поживне середовище | Спосіб культивування | КУО×10 <sup>9</sup> /мл | log, токсинів (X± s); n=4 | P≤   |
|---------------------|--------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|------|
| O26 LT <sup>+</sup> | Finkelstein        | без реактора         | 1,5 ± 0,15              | 0,85 ± 0,02               | 0,05 |
|                     |                    | в реакторі           | 8,5 ± 0,20              | 2,25 ± 0,03               |      |
|                     | Синтетическая      | без реактора         | 2,5 ± 0,20              | 1,40 ± 0,02               | 0,05 |
|                     |                    | в реакторі           | 21,5 ± 0,35             | 5,75 ± 0,05               |      |
| O9 ST <sup>+</sup>  | Finkelstein        | без реактора         | 1,5 ± 0,20              | 0,65 ± 0,01               | 0,05 |
|                     |                    | в реакторі           | 9,0 ± 0,25              | 2,65 ± 0,03               |      |
|                     | Синтетичне         | без реактора         | 3,5 ± 0,25              | 1,55 ± 0,03               | 0,05 |
|                     |                    | в реакторі           | 20,5 ± 0,35             | 6,00 ± 0,05               |      |

**Висновки.** досконалий метод глибинного культивування токсигенних штамів *E.coli* є найбільш ефективним, економічним, легко відтворним і доступним для будь-якого дослідника. Високий рівень накопичення бактерійних клітин і ентеротоксинів до-

сягався в результаті використання розробленого МЛР. Це дозволяє контролювати і корегувати параметри культивування токсигенних штамів, а також синтетичного поживного середовища. До його складу, в якості джерела азотного живлення входять вільні амінокислоти, які швидше засвоюються бактеріями *E. coli*. Надалі це полегшує процес очищення ентеротоксинів від баластних речовин, що виявляються при культивуванні кишкової палички в інших поживних середовищах.

### Список літератури

1. Караев, Я.М. Протективные и иммуногенные свойства эшерихиозного анатоксина /Я.М. Караев //Автореферат диссер.на соиск. уч ст. к. вет н.-16.00.03.-Краснодар.-2008.-25 с. 2. Зелютков, Ю.Г., Эффективность двухкомпонентной питательной среды при культивировании микроорганизмов /Ю.Г. Зелютков, В.И. Зайцев //Зооантро-поноз.болезни, меры профилактики и борьбы.-Минск.-1997. – С.132-134. 3. Finkelstein R. Enterotoxins: brief historical overview and introduction / R. Finkelstein //Progr.Food and Nutr. Sei.-1983.-7.-№3-4-P.133-138. 4. Сухарев, Ю.С. Энтеротоксины *Escherichia coli* (методы получения, очистки, изготовление иммунизирующих препаратов, антитоксических сывороток и диагностических тест-систем на их основе) /Ю.С.Сухарев; Харьков.- Коллегиум.- 2009.-92 с.

### METHOD OF DEEP CULTIVATION OF ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI*

Sukharev Yu.S.

Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv

*The method of deep cultivation of toxigenic strains of Escherichia coli is improved. The high level of accumulation of bacterial cells and enterotoxins was arrived in result of use of the developed small-scale laboratory reactor allowing to control and korrekt the parameters of height of toxigenic strains, and Synthetic nourient medium.*

УДК 576.32/36: 57.085.2

### РЕАКЦИЯ КЛЕТОК ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ MDBK И ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ПОЧЕК ПЛОДА КОРОВЫ НА НАГРУЗКУ ДВУОКИСЬЮ УГЛЕРОДА

Хамзина Е.Ю., Плотникова Э.М., Гудин В.А.,\* Кириллова Ю.М., Глаголева И.С.

ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных ВНИВИ», г. Казань

\* ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана», г. Казань

Двуокись углерода важный компонент процессов жизнедеятельности организма, одна из физиологических основ метаболизма. Она участвует в процессах проницаемости клеточных мембран, распределения ионов натрия в тканях, возбуждения нервных клеток, влияет на активность многих ферментов, синтез гормонов, их физиологические эффекты, биосинтез белков, связывание их с ионами кальция и железа, карбоксилирование аминокислот, участвует в поддержании кислотно-щелочного равновесия. В клетках животных и человека *in vivo* содержание двуокиси углерода составляет (6-8) %, кислорода – (1-2) %.

Клетки животных, растущие в условиях *in vitro*, чрезвычайно чувствительны к сдвигам внешних химических и физических факторов. Для роста клеток большинства клеточных культур необходимо 5 % содержание CO<sub>2</sub> в инкубационной среде. Содержание двуокиси углерода в инкубационной среде выше 12 % при выращивании культур клеток сопровождается нарастанием количества неправильных митозов [4].

В этой связи потребности в CO<sub>2</sub> клеток постоянных клеточных линий и первичных культур, из которых они получены, могут различаться, т.к. появление постоянной линии клеток происходит в результате трансформаций, связанных с гетеро- и анеуплоидностью. Однако нормальные клетки, спонтанно трансформируясь в постоянную линию, не становятся при этом злокачественными (несмотря на некоторые черты сходства) [2].

Характер и степень реакции клеток перевиваемой линии MDBK и первичной культуры клеток почек плода коровы (ППК) на физиологическую, 5-7 % концентрацию двуокиси углерода в среде инкубации не определены.

**Цель работы** – изучить реакцию клеток перевиваемой линии MDBK и первичной культуры ППК на 5 и 7 % содержание CO<sub>2</sub> в среде инкубации.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проводились в лаборатории культур клеток и гибридной технологии Федерального центра токсикологической и радиационной безопасности животных. Материалом для первичной культуры ППК служили почки 4-5-ти месячных плодов, взятых у клинически здоровых коров в условиях мясокомбината. Первично-трипсинизированную культуру клеток ППК получали по методу Л.П. Дьяконова [1]. В качестве постоянной клеточной линии использовали перевиваемую линию клеток MDBK (почка крупного рогатого скота), полученную в 1957г Madin S.H. [3]. Для роста клеток первичной и перевиваемой культур использовали смеси сред ГЛА, MEM, 199 в соотношении 1:1:1 с добавлением 10 % сыворотки КРС и ципрофлоксацина в концентрации 10 мкг/мл. Культивирование опытных культур проводили в стеклянной посуде, закрытой притертыми крышками с фильтрами в условиях 5 % и 7 % содержания CO<sub>2</sub> в среде инкубации. Контролем служили клетки аналогичных культур, выращенных в термостате в плотно закупоренной посуде без доступа воздуха. Определяли индекс пролиферации (ИП) клеток по Л.П. Дьяконову [1] и их размер через каждые 24 ч. в течение 3 суток. О реакции клеток перевиваемой и первичной культуры на 5 % и 7 % содержание CO<sub>2</sub> в среде инкубации судили по характеру и степени сдвигов ИП, и размеру клеток. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью критерия Вилькоксона.

**Результаты исследований.** Серией опытов было установлено, что клетки перевиваемой линии MDBK и первичной культуры ППК отвечают на направленное, физиологическое увеличение, на 5-7 %, содержания двуокиси углерода в инкубационной среде отчетливой закономерной реакцией, проявляющейся значительным подъемом, на 15-45 % ( $p \leq 0,005$ ), ИП к 72-му часу инкубации (табл. 1).

Степень реакции клеток перевиваемой линии MDBK и первичной культуры ППК на направленное, физиологическое увеличение, содержания двуокиси углерода до 5 % и 7 % в инкубационной среде неодинакова, выше она у клеток перевиваемой линии MDBK, ниже у клеток первичной культуры ППК, у последней выше при 7 % и ниже при 5 % содержании двуокиси углерода в среде инкубации.

В этих условиях размер клеток перевиваемой линии MDBK и первичной культуры ППК не менялся (табл. 2).