

УДК 616:619

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ РЕПЛИКАЦИИ ШТАММОВ КК-262, ФК-32/135, Ф-32 ВИРУСА АЧС В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА СВИНЕЙ

Антонова В.В.* , студентка 4 курса факультета ветеринарной медицины
Научный руководитель – Бурмакина Г.С.** , кандидат биологических наук

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»
**ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии

Ключевые слова: Африканская чума свиней, ПЦР, культура клеток костного мозга свиней, репродукция вируса.

Аннотация. Работа посвящена изучению динамики репродукции штаммов вируса АЧС в культурах клеток различного происхождения. Для достижения цели необходимо было изучить динамику репродукции штаммов КК-262, ФК-32/135, Ф-32 вируса АЧС в культуре клеток костного мозга свиней (ККМС). Результаты проведенных исследований свидетельствовали о некоторых отличиях в динамике накопления различных штаммов вируса АЧС в культуре клеток костного мозга свиней.

Африканская чума свиней (Pestis africana suum — лат.) - инфекционная болезнь домашних и диких свиней, вызывается вирусом семейства *Asfarviridae*, характеризующаяся лихорадкой, чаще острым течением, цианозом кожи, обширными гемorragиями во внутренних органах и большой летальностью [1]. Независимо от способа распространения поражает 100 % животных всех возрастов. Относится к группе особо опасных болезней животных. Для человека африканская чума свиней опасности не представляет, однако распространение болезни приводит к тяжелым социально-экономическим последствиям для животноводства.

Болезнь была открыта в 1921 году английским исследователем Р. Монтгомери (другое ее название — «Болезнь Монтгомери»). А первые описания АЧС были сделаны незадолго до этого в нескольких областях Южной Африки в период с 1903 по 1905 годы [2].

С 2007 года и по сей день продолжается распространение АЧС среди диких кабанов и домашних свиней на территории европейской части России. Суммарно в России было зафиксировано более 500 вспышек заболевания, экономические потери превысили 30 млрд рублей, уничтожено порядка миллиона животных [3].

Работы ученых в последние годы направлены на детальное изучение молекулярных механизмов патогенеза и иммуногенеза болезни, биохимии и репродукции вируса *in vivo* и *in vitro* с использованием изолятов вируса АЧС, обладающих различными иммунобиологическими характеристиками [4]. При проведении таких исследований широко используют первичные и перевиваемые культуры клеток различного происхождения (гомологичные и гетерологичные). Для вируса АЧС характерен высокий уровень гетерогенности биологических свойств. Штаммы вируса могут существенно отличаться по степени вирулентности, иммуногенности, антигенным, гемадсорбирующим и культуральным свойствам [5]. К культуральным свойствам вируса можно отнести способность к репродукции на различных культурах клеток, динамике репродукции, наличие или отсутствие цитопатического действия (ЦПД) и т.д.

Целью данной работы является изучение динамики репродукции штаммов вируса АЧС в культурах клеток различного происхождения.

Для достижения цели необходимо было изучить динамику репродукции штаммов КК-262, ФК-32/135, Ф-32 вируса АЧС в культуре клеток костного мозга свиней (ККМС).

Материалы и методы

Материалы:

Вирусодержащие материалы. В ходе работы были использованы аттенуированные и вирулентные штаммы вирусов африканской чумы свиней (ФК32/135, КК-262, Ф-32), а также изолят Волгоград-2011 вируса АЧС, адаптированный к культуре клеток COS-1. Материалом для выполнения исследований являлась первичная культура клеток костного мозга свиней, инфицированная вирусом АЧС.

Для выделения нуклеиновых кислот т использовали «Набор для выделения нуклеиновых кислот» (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии) состоящий из:

1. раствор №1;
2. раствор №2;
3. раствор №3.
4. сорбент нуклеиновых кислот (силика);
5. буфер для элюции нуклеиновых кислот.

Для ПЦР в режиме реального времени

- 1) смесь нуклеозидтрифосфатов dNTP mix 25 mM (Fermentas, Латвия);
- 2) магний хлористый (25mM) (Fermentas, Латвия);
- 3) 5x реакционный ОТ-буфер (Интерлабсервис, г. Москва);
- 4) праймеры для амплификации фрагментов геномов вирусов АЧС и флуоресцентный зонд («Евроген», Москва);
- 5) Taq-полимераза (5 ед./мкл) («а-фермент», Москва);

б) деионизированная вода.

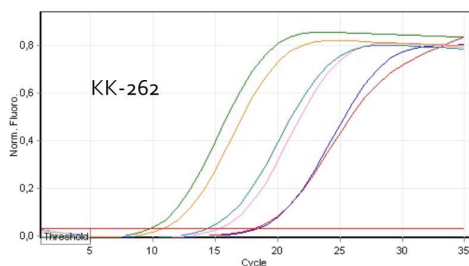
Методы:

Выделение ДНК. Выделение суммарной ДНК проводили методом нуклеосорбции с использованием «Набора для выделения нуклеиновых кислот» (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии), согласно инструкции производителя.

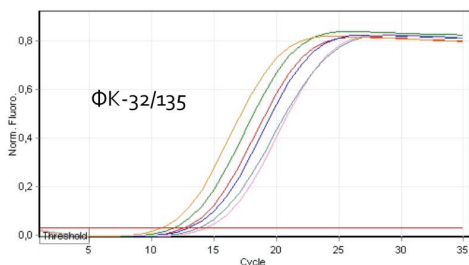
ПЦР в режиме реального времени. Выявление генома вируса АЧС проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров и зонда, фланкирующих фрагмент гена, кодирующего белок р72. Амплификацию и детекцию репортерной флуоресценции проводили в термоциклерах «Rotor-Gene 6000» (Corbett Research, Австралия).

Результаты и обсуждение

В работе использовали культуру клеток костного мозга свиней, инфицированную штаммами КК-262, ФК-32/135, Ф-32 и изолятом Волгоград-2011, адаптированным к культуре клеток COS-1, с множественностью заражения 0, 1 моі. Пробы были отобраны на ранние сроки после заражения (2, 4, 6, 8, 24 ч).



Name	Ct
2	18,03
4	18,33
6	15,26
8	14,36
24	9,81
к-	NEG (R.Eff)
к+	10,82



Name	Ct
2	12,59
4	12,95
6	14,38
8	13,67
24	11,74
к-	NEG (R.Eff)
к+	10,82

Рисунок 1 - Результаты ПЦР в режиме реального времени для выявления ДНК вируса АЧС в образцах ККМС, инфицированной вирусом АЧС штаммами КК-262 (А), ФК-32/135 (Б), Ф-32 (В) и изолятом Волгоград-2011 (Г), через 2, 4, 6, 8, 24 часа после заражения.

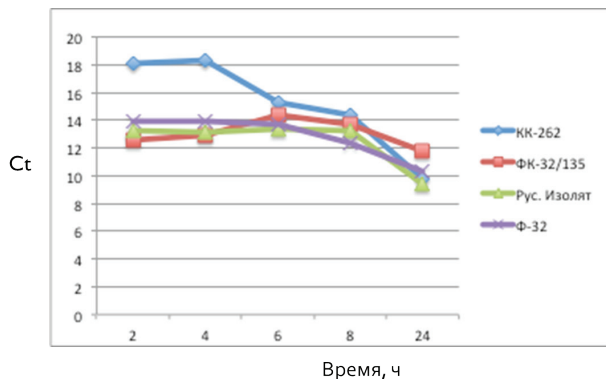


Рисунок 2 - Графики, отображающие динамику репликации вируса АЧС штаммов КК-262, ФК-32/135, Ф-32 и изолята Волгоград-2011 в ККМС.

ДНК, выделенную методом нуклеосорбции, тестировали в ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров и зонда, фланкирующими фрагмент гена, кодирующего белок р72. Отмечали некоторое различие в динамике накопления ДНК вируса АЧС для разных штаммов (рис 1, 2). Так штамм КК-262 вероятно начинает активно реплицироваться уже через 6 часов после заражения, тогда как штамм ФК-32/135 не реплицируется через даже через 24 часа после заражения. Для штамма Ф-32 и русского изолята Волгоград-2011 увеличения количества вирусной ДНК отмечали только через 24 часа.

Выводы. Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствовали о некоторых отличиях в динамике накопления различных штаммов вируса АЧС в культуре клеток костного мозга свиней.

Библиографический список:

1. Коваленко, Я. Р. Африканская чума свиней / Я. Р. Коваленко, М. А. Сидоров, Л. Г. Бурба. — М., 1972.
2. Бакулов, И. А. Проблемы современной эволюции африканской чумы свиней / И. А. Бакулов, В. В. Макаров // Вестник с.-х. Науки. — 1990.
3. Макаров, В. В. Комментарий к современной ситуации по АЧС / В. В. Макаров // Ветеринарный консультант. — 2007.
4. Прудникова Е.Ю. Адаптация вируса африканской чумы свиней, выделенного в Российской Федерации, к перевиваемым культурам клеток и изучение его биологических свойств. дис. ... канд. вет. наук. Покров. – 2013.

5. African swine fever virus CD2v and C-type lectin gene loci mediate serological specificity / A. Malogolovkin, G. Burmakina, E. R. Tulman, G. Delhon, D. G. Diel, N. Salnikov, G. F. Kutish, D. Kolbasov, D. L. Rock // Journal of General Virology. – 2015. – 96. – P. 866–873.

THE STUDY OF THE DYNAMICS OF REPLICATION OF STRAINS FC-262, FC-32/135, F-32 ASF VIRUS IN CELL CULTURE BONE MARROW PIGS

Antonova V.V., Burmakina G. S.

Key words: *African swine fever, PCR, cell culture bone marrow pigs, reproduction of the virus.*

The work is devoted to the study of the dynamics of reproduction of strains of the virus in cell cultures of different origin. To achieve the goal it was necessary to study the dynamics of reproduction strains CC-262, FC-32/135, F-32 virus ASF in the culture of bone marrow cells of pigs (CCMS). The results of these studies showed some differences in the dynamics of accumulation of different strains of the virus in cell culture bone marrow pigs.

УДК 619:612.112.94:616-006.446.2: 599.742.73

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИМФОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ И FELV-ИНФИЦИРОВАННЫХ КОШЕК МЕТОДОМ АСМ

Артемов Д.А.,* студент 3 курса факультета ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий,
Костишко Б.Б.,** магистрант физико-технического факультета
Научные руководители – Красникова Е.С.,* кандидат биологических наук, доцент; Столбовская О.В.,** кандидат биологических наук, доцент

*ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ»

** ФГБОУ ВПО «УлГУ»

Ключевые слова: *кошки, вирусная лейкемия, лимфоцит, атомно-силовая микроскопия, модуль Юнга.*