

2. Ponamarev, V.S. Polymerase chain reaction with electrophoretic detection of amplification products / Ponamarev V.S., Makavchik S.A. // Youth scientific forum: natural and medical sciences. - 2016. - No. 10 (38). - P. 148-152.

3. Sukhinin, A.A. The use of polymerase chain reaction in the molecular diagnosis of infectious animal diseases / Sukhinin A.A., Makavchik S.A., Prasolova O.V., Vinokhodova M.V. // Textbook. - St. Petersburg: Publishing house of FGBOU VO SPbGAVM, 2017. - 96 p.

4. Makavchik, S.A. Rational pharmacotherapy of animals with the basics of ranking antimicrobials in veterinary laboratories / Veterinary science. - 2022. - No. 2. - S. 9-12.

5. Makavchik, S.A. Antibiotic resistance of Staphylococcus aureus microorganisms isolated from animals/Makavchik S.A., Krotova A.L. // International Bulletin of Veterinary Medicine. - 2021. - No. 3. - P. 103-107.

6. Smirnova, L.I. Biological properties of C. jejuni isolated during the monitoring study of poultry products/ Smirnova L.I., Makavchik S.A., Sukhinin A.A., Pankratov S.V., Rozhdestvenskaya T.N. // Poultry and poultry products. - 2021. - No. 6. - S. 38-41.

7. Makavchik, S.A. Types of coagulase-negative staphylococci isolated from mastitis milk of cows and their antimicrobial susceptibility in vitro/ Makavchik S.A., Krotova A.L., Sukhinin A.A., Antipova N.A., Belkina I.V. // Medical Problems mycology. - 2020. - T. 22. - No. 3. - S. 101.

8. Makavchik, S.A. Mechanisms of resistance to antimicrobial drugs in microorganisms isolated from cattle / Makavchik S.A., Krotova A.L., Bargman Zh.E., Sukhinin A.A., Prikhodko E.I. // Issues of legal regulation in veterinary medicine. - 2020. - No. 4. - S. 41-46.

9. Makavchik, S.A. Hypermucoid phenotypes of Klebsiella pneumoniae and problems of antibiotic therapy of farm animals/Makavchik S.A. // Issues of legal regulation in veterinary medicine. - 2019. - No. 4. - S. 48-51.

10. Vaganova, A.N. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus of zoonotic origin - a new threat to public health / Vaganova A.N., Borisenko S.V., Sokurova A.M., Verbov V.N. // Journal of Infectology. - 2019. - T. 11. - No. 4. - S. 122-133.

11. Vaganova, A.N. Evaluation of the sensitivity of the iodine method in the rapid determination of beta-lactamase activity of Staphylococcus aureus isolates / Vaganova A.N., Mikheeva M.V., Nesterova E.V., Trofimova N.N., Litvinenko I.V., Petunova Ya.G., Verbov V.N. // Issues of biological, medical and pharmaceutical chemistry. - 2020. - Vol. 23. - No. 7. - S. 35-39.

12. Sulyan, O.S. Associated resistance to polymyxin and beta-lactams of Escherichia coli isolated from humans and animals / Sulyan O.S., Ageevets V.A., Sukhinin A.A., Ageevets I.V., Abgaryan S.R., Makavchik S.A., Kamenova O.A., Kosyakova K.G., Mrugova T.M., Popov D.A., Punchenko O.E., Sidorenko S.V. // Antibiotics and chemotherapy. - 2021. - T. 66. - No. 11-12. - S. 9-17.

УДК 615.383:636.2:578.831.083.22

DOI: 10.52419/issn2782-6252.2023.1.40

ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРС В ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕТАПНЕВМОВИРУСА ПТИЦ

*Скорик Анастасия Сергеевна¹, студент
Панкратов Сергей Вячеславович¹, канд.ветеринар.наук, доц.,
Крон Наталья Владимировна², канд.ветеринар.наук*

¹Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Россия

²Научно-производственное предприятие «АВИВАК», Россия

РЕФЕРАТ

При получении вирусосодержащего материала метапневмовирусной инфекции птиц (МПВИ) на культуре клеток Vero особое внимание надо уделять составу ростовых и поддерживающих питательных сред, поскольку их компоненты непосредственно влияют на пролиферацию и жизнеспособность клеточной культуры, а, значит, и на качество получаемого целевого продукта.

Для культуры клеток Vero основной питательной средой является среда DMEM, в которую вносят различные дополнительные компоненты. В ростовую среду принято вносить до 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Что касается поддерживающей среды, то вопрос необходимости внесения в неё сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС) не имеет однозначного решения. Поскольку финансовые затраты на питательные среды оказывают существенное влияние на себестоимость конечной продукции, то необходимо анализировать экономическую целесообразность использования того или иного компонента, в связи с чем нами была изучена роль сыворотки крови КРС (ФБС и сыворотки крови КРС) в технологии получения вируса МПВИ.

В результате проведенных исследований было выявлено, что в ростовой среде для культуры клеток Vero можно заменить ФБС на сыворотку крови КРС при проведении не более чем двух последовательных пересевов. Однако если культура клеток Vero будет пересеваться более двух раз, то такая замена невозможна, поскольку уже в 3-4 пассаже наблюдаются признаки снижения скорости деления клеток и дегенерации клеточной культуры. В клеточном слое отмечается большое количество пустот и округлившихся клеток, что делает невозможным его использование для культивирования вирусов или дальнейшего пересева.

Также было установлено, что при культивировании вируса МПВИ на культуре клеток Vero оптимальной для использования является поддерживающая среда DMEM, содержащая 2% сыворотки крови КРС, поскольку она обеспечивает получение вирусосодержащего материала с более высокой инфекционной активностью, по сравнению со средой DMEM, которая вообще не содержит или содержит 10 % сыворотки крови КРС.

Ключевые слова: сыворотка крови крупного рогатого скота, культуральные среды, культура клеток VERO, метапневмовирусная инфекция птиц.

ВВЕДЕНИЕ

Перевиваемая культура клеток Vero широко используется в биотехнологии с целью получения вирусосодержащего материала (ВСМ) для изготовления вакцин и диагностических наборов [1, 2]. Именно на этой клеточной культуре получают ВСМ для производства вакцин против метапневмовирусной инфекции птиц. МПВИ – это болезнь, которая вызывает острые воспалительные процессы в слизистых оболочках верхних дыхательных путей [1, 3], чем повышает восприимчивость птиц к возбудителям других болезней и способствует развитию ассоциированных форм течения инфекций и проявлению респираторного синдрома [4, 5].

При получении культурального ВСМ МПВИ одним из самых важных элементов технологического процесса является правильно подобранная питательная среда, поскольку её компоненты непосредственно влияют на пролиферацию и жизнеспособность клеточной культуры, а, значит, и на качество получаемого целевого продукта [6].

Для культуры клеток Vero основной питательной средой является среда DMEM, однако в неё вносят различные дополнительные компоненты, в том числе и сыворотку крови животных, которая оказывает стимулирующий эффект на пролиферацию клеток [1, 6]. С этой целью наиболее часто используют эмбриональную (фетальную) бычью сыворотку (ФБС), а также сыворотку крови крупного рогатого скота (КРС). При этом, согласно имеющимся в литературе рекомендациям, в ростовую питательную среду необходимо добавлять до 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) от общего объема среды DMEM. Что же касается вопроса необходимости добавления сыворотки крови КРС в поддерживающую питательную среду, то он остается открытым, так как в данные о необходимости ее внесения разнятся [6, 7].

Поскольку финансовые затраты на питательные среды оказывают существенное влияние на себестоимость конечной продукции, то необходимо анализировать экономическую целесообразность использования того или иного компонента [1, 2, 6]. В связи с этим особый интерес представляет вопрос возможности замены в ростовой среде для культуры клеток Vero ФБС, обладающей высокой стоимостью, на более дешевую сыворотку крови КРС, а также вопрос необходимости добавления сыворотки крови КРС в поддерживающую среду.

Целью работы было изучить роль сыворотки крови КРС в технологии получения вируса МПВИ. Для решения поставленной цели нами были определены две задачи. Первая – изучить возможность использования в ростовой среде для культуры клеток Vero сыворотки крови КРС вместо ФБС, вторая – определить целесообразность внесения в поддерживающую среду сыворотки крови КРС при культивировании на культуре клеток Vero вируса МПВИ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для решения первой поставленной задачи использовали шесть культуральных флаконов (матрасов) площадью 25см², в которых в термостате в течение нескольких суток при температуре (37,5±0,5)°C выращивали монослой культуры

клеток Vero. В первых трех матрасах для культивирования культуры клеток применяли питательную среду DMEM, содержащую 10% сыворотки крови КРС (опыт), а в других трех – среду DMEM, содержащую 10% ФБС (контроль).

Контроль формирования монослоя проводили ежедневно с помощью световой микроскопии.

После формирования в матрасах полноценного клеточного монослоя в виде плотно прилегающих друг к другу клеток полигональной формы из каждого матраса, индивидуально, проводили пересев клеток в отдельный новый матрас (второй пассаж) и выращивали культуру клеток Vero при тех же условиях с использованием аналогичных культуральных ростовых сред, как при первичном посеве (первом пассаже). Коэффициент посева составлял 1:5.

Для изучения целесообразности внесения в поддерживающую культуральную среду сыворотки крови КРС при культивировании вируса МПВИ на культуре клеток Vero использовали три культуральных флакона, в которых в термостате в течение 72 ч при $t(37,5\pm0,5)^{\circ}\text{C}$ выращивали монослой культуры клеток Vero.

Во всех флаконах промывали фосфатно-буферным раствором, после чего вносили метапневмовирус птиц штамма PV03-B в дозе 0,1 ТЦД₅₀ на клетку, а затем поддерживающую среду DMEM, причем в первый флакон добавляли среду DMEM, содержащую 10% сыворотки крови КРС, во второй – 2% сыворотки крови КРС, а в третий флакон без содержания сыворотки.

Зараженные культуры клеток культивировали стационарно в термостате при $t(37,5\pm0,5)^{\circ}\text{C}$, периодически проводя световую микроскопию. Через 72 часа, при появлении в клеточном монослое выраженного цитопатического действия (ЦПД) вируса, содержимое каждого флакона интенсивно встряхивали и отбирали пробы ВСМ для определения титра инфекционной активности метапневмовируса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При учете результатов сравнительного испытания ФБС и сыворотки крови КРС было установлено, что после первого посева культуры клеток Vero во всех шести матрасах через 72 часа наблюдали образование клеточного монослоя в виде плотно прилегающих друг к другу клеток полигональной формы. После проведения второго пассажа культуры клеток так же, как и при первичном посеве, в независимости от компонентного состава используемой ростовой среды, через 72 часа при микрокопировании во всех шести матрасах наблюдали образование полноценного монослоя.

Однако после проведения третьего пассажа в одном из опытных матрасов, в котором использовалась среда DMEM, содержащая 10% сыворотки крови КРС, через 72 часа наблюдали признаки снижения скорости деления клеток и дегенерации клеточной культуры. Монослой имел большое количество пустот и округлившихся клеток. Согласно нормативной документации,

использовать такой клеточный монослой для культивирования вирусов и дальнейшего пересева недопустимо. При этом в двух оставшихся опытных, а также в трех контрольных матрасах был получен полноценный клеточный монослой, поэтому культуру клеток из этих матрасов вновь пересеяли. После культивирования четвертого пассажа в монослой всех опытных матрасов наблюдались признаки дегенерации, в связи с чем дальнейшего их пассажирования не проводили. При этом в опытных матрасах был получен полноценный монослой.

Изучение результатов культивирования вируса МПВИ при наличии в поддерживающей культуральной среде сыворотки крови КРС показало, что полученный 72-часовой монослой культуры клеток Vero до инфицирования имел вид плотно прилегающих полигональных клеток. Спустя 72 ч после заражения метапневмовирусом птиц штамма PV03-B во всех трех флаконах в культуре клеток наблюдали выраженное ЦПД вируса, которое проявлялось разрушением целостности монослоя, округлением клеток и образованием симпластов. Это послужило основанием для отбора из флаконов проб ВСМ.

При определении инфекционной активности метапневмовируса в пробе ВСМ из первого флакона, содержащего в питательной среде 10% сыворотки крови КРС, титр вируса составил – 7,0 $\lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$; в пробе из второго флакона, содержащего 2% сыворотки – 7,5 $\lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$, а в пробе из третьего флакона, в котором отсутствовала сыворотка – 7,0 $\lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$.

ВЫВОДЫ

1. Использование сыворотки крови КРС вместо ФБС в качестве компонента ростовой среды для культуры клеток Vero возможно при проведении не более чем двух последовательных пересевов.
2. При культивировании вируса МПВИ на куль-

туре клеток Vero поддерживающая среда DMEM, содержащая 2% сыворотки крови КРС, обеспечивает получение ВСМ с более высокой инфекционной активностью, по сравнению со средой DMEM, которая вообще не содержит или содержит более высокую концентрацию (10 %) сыворотки крови КРС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Панкратов С. В. Метапневмовирусная инфекция птиц / С. В. Панкратов, С. Р. Абгарян // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. – 2022. – № 3. – С. 36-39.
2. Никитина Н. В. Выделение метапневмовируса птиц на различных биологических системах / Н. В. Никитина, С. Р. Абгарян // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2019. – № 2. – С. 34-36.
3. Норкина С. Н. Профилактика метапневмовирусной инфекции птиц / Т. Н. Рождественская, И. П. Николаева [и др.] // Птица и птицепродукты. – 2022. – № 4. – С. 52-55.
4. Респираторный синдром птиц. Этиология, диагностика, меры борьбы и профилактики / С. В. Панкратов, Т. Н. Рождественская, А. А. Сухинин, А. В. Рузина // . – 2021. – № 4. – С. 34-36.
5. Макавчик С. А. Колибактериоз птиц: особенности экспресс - диагностики, профилактики и лечения: специальность 16.00.03: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Макавчик Светлана Анатольевна. – Санкт-Петербург, 2007. – 19 с.
6. Герасимова Н. И. Разработка лабораторного способа поддержания перевиваемых культур клеток СПЭВ, GH-91, Vero / Герасимова Н. И., Старов С. К., Герасимов В. Н. // Ветеринарная патология. – 2006. – № 4(19). – С. 168-170.
7. Сухинин А.А. Лабораторная диагностика вирусных болезней: учебное пособие / А.А. Сухинин – СПб.: СПбГАВМ, 2019. – 124 с.

SPECIFICS OF THE USE OF BOVINE BLOOD SERUM IN THE TECHNOLOGY OF CULTIVATION OF AVIAN METAPNEUMOVIRUS

Anastasia S. Skorik¹, student

Sergey V. Pankratov¹, PhD in Veterinary Sciences, Docent

Natalya Vl. Kron², PhD in Veterinary Sciences

¹St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, Russia

²Scientific and production enterprise "AVIVAC", Russia

When obtaining virus-containing material of avian metapneumovirus infection (MPVI) on Vero cell culture, special attention should be paid to the composition of growth and supporting nutrient media, since their components directly affect the proliferation and viability of the cell culture, and hence the quality of the resulting target product.

For Vero cell culture, the main nutrient medium is the DMEM medium, into which various additional components are added. It is customary to add up to 10% of fetal bovine serum (FBS) to the growth medium, as for the supporting medium, the question of the need to add blood serum of cattle (cattle) to it does not have an unambiguous solution. Since the financial costs of nutrient media have a significant impact on the cost of the final product, it is necessary to analyze the economic feasibility of using one or another component, in connection with which we have studied the role of blood serum of cattle (FBS and blood serum of adult cattle) in the technology of obtaining the MPVI virus.

As a result of the conducted studies, it was revealed that in the growth medium for Vero cell culture, it is possible to replace FBS with blood serum of adult cattle with no more than two consecutive passages. However, if the Vero cell culture is replanted more than twice, then such a replacement is impossible, since already in the 3-4 passage there are signs of a decrease in the rate of cell division and cell culture degeneration. A large number of voids and rounded cells are noted in the cell layer, which makes it impossible to use it further for the cultivation of viruses or further replanting.

It was also found that when cultivating the MPVI virus on a Vero cell culture, the DMEM maintenance medium containing 2% of cattle blood serum is optimal for use, since it ensures the production of virus-containing material with higher infectious activity compared to the DMEM medium, which does not contain or contains 10% of cattle blood serum at all.

Key words: bovine blood serum, nutrient medium, VERO cell culture, avian metapneumovirus infection.

REFERENCES

1. Pankratov, S. V. Metapneumovirus infection of birds / S. V. Pankratov, S. R. Abgaryan // Regulatory and legal regulation in veterinary medicine. - 2022. - No. 3. - pp. 36-39.
2. Nikitina N. V. Isolation of avian metapneumovirus on various biological systems / N. V. Nikitina, S. R. Abgaryan // Issues of regulatory regulation in veterinary medicine. - 2019. - No. 2. - pp. 34-36.
3. Norkina S. N. Prevention of bird metapneumovirus infection / T. N. Rozhdestvenskaya, I. P. Nikolaeva [et al.] // Poultry and poultry products. - 2022. - No. 4. - pp. 52-55.
4. Avian respiratory syndrome. Etiology, diagnostics, control and prevention measures / S. V. Pankratov, T. N. Rozhdestvenskaya, A. A. Sukhinin, A.V. Ruzina // - 2021. - № 4. - Pp. 34-36.
5. Makavchik S. A. Colibacteriosis of birds: features of express diagnostics, prevention and treatment: specialty 16.00.03: abstract of the dissertation for the degree of Candidate of Veterinary Sciences / Makavchik Svetlana Anatolyevna. - St. Petersburg, 2007. - 19 p.
6. Gerasimova N. I. Development of a laboratory method for maintaining transplanted cell cultures of SPEV, GH-91, Vero / Gerasimova N. I., Starov S. K., Gerasimov V. N. // Veterinary pathology. - 2006. - № 4(19). - Pp. 168-170.
7. Sukhinin A.A. Laboratory diagnostics of viral diseases: textbook / A.A. Sukhinin - St. Petersburg: SPbGAVM, 2019. - 124 p.

УДК 616.98:579.842.14:638.154.3(479.24)

DOI: 10.52419/issn2782-6252.2023.1.43

ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО САЛМОНЕЛЛЕЗУ В ПЧЕЛОВОДЧЕСКИХ ХОЗЯЙСТВАХ СЕВЕРО-ВОСТОЧНЫХ РАЙОНОВ АЗЕРБАЙДЖАНА

Гюлалыева Ф.Р.

Азербайджанский Ветеринарный Научно-Исследовательский Институт, Азербайджан

РЕФЕРАТ

Статья посвящена изучению сальмонеллеза пчел в пчеловодческих хозяйствах северо-восточных районов Азербайджана. В результате исследований, проведенных 2013-2021 гг. в пчеловодческих хозяйствах северо-восточных районов Азербайджана установлено, что сальмонеллез имеет широкое распространение и причиняет пчеловодству существенный экономический ущерб. Исследования проводились в пчеловодческих хозяйствах у пчел гонагкендской популяции боздагской кавказской породы *Aphis mellifera caucasica* Gorb. Исследования подвергнуты 720 пчелиных семей. Зараженность в Гусарском районе составляет 62,5%, в Хачмазском-37,5%, в хозяйствах Губинском -75,0%. Так, в Хачмазском районе зараженность сальмонеллезом составляет - 37,5 %, в Гусарском районе - 62,5 %, и в Губинском районе- 75,0 %. Изучена сезонная динамика, степень распространения инвазии по высотным поясам в зависимости от силы пчелиных семей. В зависимости от силы пчел динамика сальмонеллеза в пчелиных семьях ослабевает с потеплением погоды, то есть с марта по май. Так, в мае средняя зараженность в семьях слабого питания составляет 18,47%, в семьях среднего питания - 12,77%, в семьях сильного питания- 10,53%. Распространение и развитие сальмонеллеза обратно пропорциональна повышению температуры окружающей среды.

Ключевые слова: пчела, сальмонеллез, исследование, питательные среды, посев, пасека, распространение, температура, пчелиная сила, питание, заражение, эпизоотология, сезонная динамика, мед, хозяйство.

ВВЕДЕНИЕ

Пчеловодство-одна из очень прибыльных отраслей сельского хозяйства, которая занимается разведением пчел с целью получения меда - экологически чистого пищевого продукта, пчелиного яда, широко используемого в медицине для лечения многих заболеваний, пчелиного воска, цветочной пыльцы, прополиса, пчелиного молока и ряда других продуктов.

В современную эпоху интенсификации польза от пчелоопыления энтомофильных (насекомоопыляемых) растений- плодово-ягодных, бахчевых, кормовых, технических и других сельскохозяйственных растений - в повышении их продуктивности выше, чем польза, обеспечиваемая пасекой в период сезона. Благодаря пчелиному опылению обеспечивается сохранение биоразнообразия, восстанавливается экологический баланс, значительно повышается урожайность растений, а также повышается качество плодов и семян.

Одним из заболеваний, препятствующих развитию пчеловодства, является сальмонеллез, который широко распространен, как в Азербайджане, так и во всем мире. Ряд ученых

внесли большой вклад в изучение биоэкологических особенностей сальмонеллеза, физиологии, продуктивности и болезней медоносных пчел в нашей республике и разработку лечебно-профилактических мер борьбы [2,4,5].

Несмотря на это, исследований по эпизоотологии сальмонеллеза в пчеловодческих хозяйствах северо-восточных районов республики до наших исследований практически не проводилось.

С этой целью изучение эпизоотической ситуации сальмонеллеза медоносных пчел на северо-восточной части Азербайджана по вертикальным поясам имеет большое научное и практическое значение.

Учитывая это, в 2014-2021 годы нами проведена научно-исследовательская работа с целью изучения эпизоотической ситуации, диагностики сальмонеллеза, клинических признаков и ряда других биоэкологических особенностей распространения сальмонеллеза в пчеловодческих хозяйствах северо-восточного региона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в 2014-2021 гг в