

УДК 619:578.835.2:636.5

КУЛЬТУРАЛЬНІ ТА ДЕЯКІ ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОЛЬОВОГО ІЗОЛЯТУ МЕТАПНЕВМОВІРУСА ПТИЦІ

Пархоменко Л.І., Дубін Р.А.

Луганський національний аграрний університет, м. Луганськ

Респіраторні захворювання птиці, обумовлені збудниками вірусної етіології, завдають значних економічних збитків у птахогосподарствах. Своєчасна діагностика та вживання заходів щодо обмеження розповсюдження захворювання здатні їх зменшити.

Упродовж останніх 2–3 років на бройлерних і яєчних птахофабриках України виявляли птицю з клінічними ознаками інфекційного ринотрахеїту (Avian Rhino Tracheitis) – риніт, кон'юнктивіт, пригнічення та зниження несучості [1, 2]. Дане захворювання реєструється в країнах Західної Європи, Північної Африки, Північній і Латинській Америці. На підставі антигенних і генетичних властивостей вірусу виділяють 4 підтипи: А, В, С і D, з яких найбільш поширенішими є підтипи А і В. Підтип С зустрічається переважно в індичок у США, а тип D виділяють у Франції [3].

Для розмноження Метапневмовірусу (МПВ) птиці підходить лише обмежена кількість клітинних ліній. Більшість штамів вірусу розмножується в первинно-трипсинізованій культурі клітин фібробластів курячих ембріонів (ФКЕ), фібробластів ембріонів індичок і гусей, ВНК-21, Vero, Q-35, BGM, MA-104, McCoу. Цитопатичні зміни у ФКЕ характеризуються округленням клітин, формуванням симпластів із подальшим відторгненням уражених ділянок клітинного моношару від скла. На ранніх етапах основною ознакою цитопатичної дії (ЦПД) є утворення характерних включень у цитоплазмі, а також формування кулеподібних клітин. Репродукція МПВ у культурі клітин Vero також відбувається з ЦПД, яка характеризується руйнуванням моношару. Через 12 годин після зараження клітин Vero утворюється синцитій, а через 22 години формується великий синцитій із мінімальною кількістю одноядерних клітин [4, 5].

Метапневмовірус птиці відноситься до родини *Paramyxoviridae*, роду *Metapneumovirus*.

Геном вірусу має деякі особливості, які обумовлюють його патогенні властивості. Даний вірус містить одноланцюгову РНК, до складу якої входить 9 фрагментів, які кодують послідовні амінокислоти для різних структурних білків. До основних білків МПВ птиці відноситься білок G з молекулярною масою 78–80 кДа, який відповідає за проникнення вірусу в клітину та білок F, з молекулярною масою 45–60 кДа, основна дія якого це забезпечення злиття вірусу з клітинною оболонкою та проникнення в неї. Матричний білок M знаходиться в середині вірусу та утворює внутрішній шар, білок N тісно зв'язаний з нуклеопротеїновим комплексом L та P білків, які беруть участь в утворенні вірусної транскриптази. При імунологічних дослідженнях спираються на білки G та F, які мають діагностичне значення при метапневмовірусній інфекції (МПВІ) птиці. Віріон представлений сферичною або ниткоподібною формами. Діаметр віріону коливається від 80 до 200 нм, а іноді сягає 500 нм. Ниткоподібні форми мають діаметр від 80 до 100 нм, а довжину до 1000 нм. Вірусна оболонка представлена ліпідним шаром з виступами на поверхні, довжина яких сягає 13–14 нм. У середині оболонки, вірус має симетричний, спіралеподібний нуклеокапсид, діаметр якого становить 14 нм, але даний вірус не володіє нейрамінідазою та гемаглютинуючою активністю [6, 7, 8].

Метою роботи було вивчення культуральних і деяких фізико-хімічних властивостей польового ізоляту МПВ, виділеного від індички приватного господарства Київської області.

Матеріали та методи. Для вірусовиділення тампонами робили назофарингальні змиви від індиків, у розчині Хенкса або фізіологічному розчині, що містить антибіотики: бензилпеніцилін-КМП 100 ОД/см³ та стрептоміцин-100 мг/см³ і витримували впродовж 1-2 годин. Суспензію центрифугували при 3000 об/хв., 10 хвилин. Деконтамінацію змивів від сторонньої мікрофлори здійснювали методом фільтрації через мембранний фільтр із діаметром пор 0,22 мкм. Контроль суспензії проводили висівом на м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) та м'ясо-пептонний агар (МПА). Інфікування культури клітин Vero здійснювали за загальноприйнятою методикою. Оцінку морфологічних змін у клітинах проводили щодобово безпосередньо мікроскопією під світловим мікроскопом. Інфекційну активність МПВ визначали в культурі клітин Vero, титр вірусу визначали за методом Ріда і Менча. Концентрацію та очищення вірусного матеріалу здійснювали осадженням на 30 % сахарозній подушці, розчин якої робили на TSE буфері з наступним центрифугуванням упродовж 1,5 годин за температури 5 °С. Отриманий вірусний осад ресуспендували у 0,5 см³ TSE буфері. Електронно-мікроскопічні дослідження проводили методом негативного контрастування за допомогою мікроскопу ПЕМ-125 К (за прискореної напруги 75 кВт), забезпеченому системою зображення CAI-01A (АО «SELMI», м. Суми) на основі CCD камери DX-2 і пакету програм фірми «КАРРА» (Німеччина) [9].

Горизонтальний електрофорез проводили у поліакриламідному гелі (ПААГ) за методикою Laemmli [10]. Електронну мікроскопію та електрофорез здійснено за допомогою кандидата біологічних наук Войчука С.І. та старшого наукового співробітника лабораторії репродукції вірусів ІМВ НАНУ Загородня С.Д. «Інститут мікробіології та вірусології ім. Заболотного» (м. Київ).

Результати досліджень. Виділення та визначення патогенності польового ізоляту МПВ–PV-3 проводили інфікуванням культури клітин Vero. Встановлено, що польовий ізолят PV-3 викликав ЦПД у культурі клітин Vero через 48 годин після інфікування, яка проявлялася округленням клітин і зернистістю у цитоплазмі на деяких ділянках моношару. Через 72 години після інфікування відмічали зернистість клітин усього моношару. Повну дегенерацію моношару відзначали через 120 годин у першому пасажі (рис. 1).

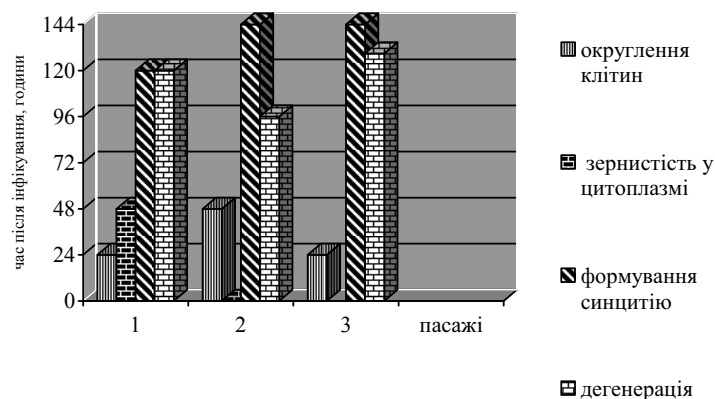


Рис. 1. Динаміка прояву цитопатичних змін у культурі клітин Vero, інфікованої ізолятом PV-3, упродовж 3-х послідовних пасажів

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія та мікробіологія

Титр польового ізоляту PV-3 після 3-х пасажів у культурі клітин Vero становив $10^{4.5}$ ТЦД₅₀/см³.

Негативне контрастування польового ізоляту PV-3 виявило віріони сферичної форми, розмір яких коливався від 122 до 169 нм. Деякі віріони мали подвійний контур зовнішньої мембрани з видимими виступами (рис. 2).

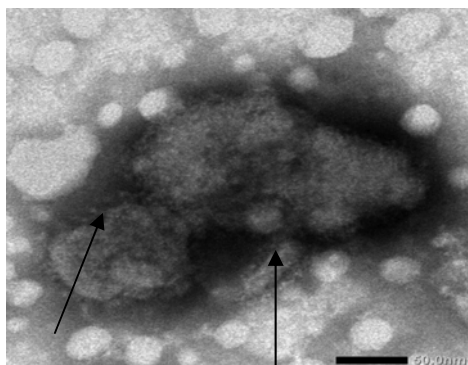


Рис. 2. Віріони ізоляту PV-3 МПВ птиці: Збільш. ×800000. Негативне контрастування

Електрофоретичний профіль польового ізоляту PV-3 свідчить про наявність у його структурі білків із молекулярною масою 38904 та 69183 кДа. Білки з аналогічною молекулярною масою виявлені й під час електрофорезу вакцинного штаму 1062 МПВ, що належить до типу В (табл.).

Таблиця – Визначення маси білків польового ізоляту метапневмовірусу

Ізолят МПВ	Дистанція від старту, мм	Rf	Логарифм молекулярної маси	Молекулярна маса, дальтон	Білок МПВ
PV-3	34	0,44	5,28	190500	
	36	0,45	5,252	178000	
	43	0,54	4,842	69183	G
	47	0,59	4,645	66000	
	52	0,65	4,591	38904	F ₁
	65	0,81	4,165	14600	
1062, тип В	57,5	0,73	4,4	25000	F ₁
	47,5	0,6	4,795	62400	
	45,5	0,58	4,85	70800	G

Встановлені вірусні білки, за даними Gough R.E. (1989) та Collins M.S. (1988) належать до білків, що локалізуються у серцевині віріону та співвідносяться до поліпептидів G та F₁.

Висновки. Польовий ізолят PV-3 індукує ЦПД у перещепленій культурі клітин Vero та накопичується у 3 пасажі в титрі $10^{4.5}$ ТЦД₅₀/см³. За морфологією віріони ізоляту PV-3 МПВ мають плеоморфну форму та розмір від 122 до 169 нм. Електрофоретичний профіль ізоляту PV-3 МПВ має 2 основні білки з молекулярною масою 38904 та 69183 кДа, що є структурними білками МПВ.

Перспективи подальших досліджень. Результати наших досліджень вказують на приналежність польового ізоляту PV-3 до МПВ птиці, але з метою подальшого типування передбачається його молекулярно-генетичний аналіз.

Список літератури

1. Наливайко, Л. І. РНГА Діагностика метапневмовірусної інфекції птиці [Текст] / Л. І. Наливайко, С. В. Рябінін, Д. А. Рябека // Вет. медицина України. – 2012. – №1. – С. 34–36.
2. Визначення динаміки поствакцинального імунітету у курей щодо метапневмовірусної інфекції [Текст] / Л. І. Наливайко [та ін.] // Наук.-техн. бюл. – Львів, 2012. – Вип. 13, №3–4. – С. 380–383.
3. Kariuki Njenga M. Metapneumoviruses in birds and humans [Text] / M. Kariuki Njenga, M. Humphrey, Lwamba, B. S Seal // Vir. Res. – 2003. – Vol. 91. – P. 163–169.
4. Роменская, Д.В. Изучение цитоморфологических трансформаций клеточного монослоя Vero V в зависимости от времени репродукции метапневмовируса птиц [Текст] / Д.В. Роменская, Т.Б. Манин, Б.Л. Манин // Вет. патология. – 2011. – № 4. – С. 50–55.
5. Данко, Л.Ю. Культуральные и антигенные свойства метапневмовируса птиц [Текст] : автореф. дис. ... канд. вет. наук / Л.Ю Данко. – СПб., 2011. – 23 с.
6. Gough, R.E. Antigenic relationships of three turkey rhinotracheitis viruses [Text] / R. E Gough, M. S. Collins // Av. Pathol. – 1989. – Vol. 18. – P. 227–238.
7. Collins, M.S. Characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis [Text] / M.S. Collins, R.E. Gough // J. Gen. Virol. – 1988. – Vol. 69. – P. 909–916.
8. Jacobs, J.A. A Propagation and molecular characterization of avium pneumoviruses [Text] / J.A. Jacobs // Thesis submitted to the graduate faculty of the University of Georgia in partial fulfillment of the requirements for the degree. – Athens Georgia, 2001. – P. 9–32.
9. Пономарев, А.П. Электронная микроскопия вирусов животных и некоторых условно-патогенных микроорганизмов [Текст] / А.П. Пономарев, В.А. Мищенко. – Владимир : Фолиант, 2005. – 158 с.
10. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature [Text] / U.K. Laemmli // London, 1970. – P. 680–685.

CULTURAL AND SOME PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF THE FIELD ISOLATE OF AVIUM PNEUMOVIRUS

Parkhomenko L.I., Dubin R.A.

Lugansk National Agrarian University, Lugansk

The field isolate of avium pneumovirus (APV) PV-3 during 3 successive arcades in the culture of cells of Vero induces formation of syncytium and is accumulated in a titer $10^{4.5}$ TCD₅₀/sm³. By morphology of viral particles the isolate PV-3 MPV has polymorphic form and corresponds the structure of virions – representatives of family Paramyxoviridae. In composition of the isolate PV-3 there were found proteins with molecular mass 38904 and 69183 kDa, which correspond polypeptides F and polypeptide G, that are localized in a core of the virion APV of birds.