

# ВЕТЕРИНАРНІ НАУКИ

УДК 619:578.825.15

## ПОРІВНЯННЯ ЧУТЛИВОСТІ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН ДО ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Гулянич М.М., Недосєков В.В.

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Досліджено чутливість ряду перещеплюваних культур клітин різного погодження до вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби штаму «ВМ». За результатами досліджень виявлено, що з поміж дев'яти досліджуваних культур найбільш чутливою до вірусу ІРТ була культура нирки теляти – MDBK. Використання культури клітин MDBK дозволяє накопичувати вірусну суспензію на четвертому пасажі в титрах  $8,0 \pm 0,11 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ .

**Ключові слова:** інфекційний ринотрахеїт, чутливість культур клітин, герпервірус 1 типу великої рогатої худоби, перещеплювана культура клітин, профілактика, вакцинація.

**Актуальність.** Респіраторні захворювання великої рогатої худоби (ВРХ) завдають значних економічних втрат тваринництву. Одним із таких захворювань є інфекційний ринотрахеїт (ІРТ). Захворювання спричинюється герпесвірусом великої рогатої худоби 1 типу. Унікальність збудника ІРТ в можливості інтеграції геному вірусу в геном клітини господаря і таким чином тривалої персистенції. Вірус ІРТ здатний розмножуватись в моноцитах, нейтрофілах і макрофагах, викликаючи при цьому імуносупресію. Це обумовлює імунodefіцієнтний стан тварин та підвищує їх сприйнятливність до умовно-патогенних збудників, що в свою чергу перешкоджає адекватній та ефективній імунній відповіді після введення вакцинного препарату [1, 2].

Клінічно хвороба проявляється катарально-некротичним ураженням слизових оболонок дихальних шляхів, лихоманкою, пригніченням, кон'юнктивітом, ураженням центральної нервової системи, розвитком пустульозного вульвовагініту та абортми у корів, а також баланопоститами у биків [1, 3].

Вперше хвороба була описана в 1928 році, а в 50-х роках в США. Тоді у великої рогатої худоби було зареєстровано захворювання верхніх дихальних шляхів, описане під назвою «червоний ніс» та інфекційний некротичний риніт. Вірус вперше був виділений в 1956 із носових виділень телят з гострим респіраторним захворюванням. На території колишнього Радянського Союзу ІРТ був вперше діагностований в 1964 році [3]. Зараз інфекційний ринотрахеїт ВРХ реєструється повсюдно в країнах з розвинутим скотарством. У всьому світі для профілактики цього захворювання проводять поголовні вакцинації, як телят так і дорослих тварин. Застосовують при цьому живі та інактивовані вакцини. Масова вакцинація дозволяє створити популяційний імунітет та знизити виділення та циркуляцію вірусу, аж до елімінації його із імунної популяції [4].

Для виготовлення якісного вакцинного препарату важливу роль відіграє активність використаного вірусного матеріалу. Вірусний матеріал, в свою чергу, зокрема вірусу інфекційного рино-

трахеїту ВРХ напрацьовують вирощуючи вірус в культурі клітин. Відомо, що до різних вірусів чутливість клітин різна, також як і до різних штамів вірусу ІРТ [3, 4, 5, 6].

**Мета роботи.** Метою роботи є визначення найбільш оптимальної культури клітин, як біологічного об'єкту для ефективного культивування вірусу інфекційного ринотрахеїту ВРХ штаму «ВМ».

**Матеріали та методи.** Чутливість перещеплюваних культур клітин до вірусу інфекційного ринотрахеїту вивчали використовуючи метод послідовних пасажів. Лінії клітин інфікували вірусмістким матеріалом, отриманим від попереднього пасажу.

Культуру клітин вирощували в культуральних матрасах площею  $25 \text{ см}^2$  протягом 1-2 діб до утворення суцільного моношару клітин. Після попереднього відмивання моношару клітин розчином Хенкса в культуральні матраси з моношаром клітин вносили вірус ІРТ ВРХ штаму «ВМ» з інфекційною активністю не нижче  $5,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ . Множинність зараження при цьому складала  $0,01 \text{ ТЦД}_{50}/\text{кл}$ . Для контакту вірусу з клітинами, інфіковану культуру в матрасах переміщували в термостат на 1 годину за температури  $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ . Після контакту додавали підтримуюче середовище. В якості підтримуючого середовища використовували живильне середовище «DMEM+RPMI» та «DMEM+199» у співвідношенні 1:1 (в залежності від того до якого середовища пристосовано досліджувану культуру) без сироватки крові. В якості контролю залишали по два матраси з неінфікованою культурою клітин (зі зміною ростового середовища на підтримуюче).

За інфікованою культурою клітин спостерігали за допомогою інвертованого мікроскопу до появи ЦПД вірусу або протягом 120 год. Репродукцію вірусу ІРТ в культурі клітин враховували з появою інтенсивних специфічних цитопатичних змін у клітинному моношарі. При ураженні не менше 70-80% моношару матраси з культурою заморожували при температурі мінус  $20-24^\circ \text{C}$ . Якщо за період спостереження (120 год.) ЦПД вірусу не спостерігали культуру піддавали замороженню, як описано вище, та проводили наступний пасаж.

Таблиця 1

**Чутливість ряду культур до вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби (M±m, n=5)**

Культура клітин	Титр інфекційної активності вірусу (lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )				
	Вихідний	1 пасаж	2 пасаж	3 пасаж	4 пасаж
MDBK	5,0 ±0,05	6,5 ±0,10	7,2 ±0,05	7,9 ±0,12	8,0 ±0,11
TrT	5,0 ±0,05	5,2 ±0,07	6,3 ±0,06	6,6 ±0,19	6,8 ±0,14
HB	5,0 ±0,05	4,5 ±0,11	5,5 ±0,10	6,3 ±0,06	6,5 ±0,11
RCC	5,0 ±0,05	2,5 ±0,07	5,3 ±0,13	5,9 ±0,07	6,0 ±0,05
RK-13	5,0 ±0,05	3,7 ±0,07	5,7 ±0,11	5,7 ±0,04	5,8 ±0,07
Vero	5,0 ±0,05	н/ч	н/ч	н/ч	н/ч
BHK-21	5,0 ±0,05	н/ч	н/ч	н/ч	н/ч
ST	5,0 ±0,05	н/ч	н/ч	н/ч	н/ч
KCT	5,0 ±0,05	н/ч	н/ч	н/ч	н/ч

Примітка: н/ч – не чутлива

Джерело: розроблено авторами

Після відтавання, з отриманої суспензії відбирали проби для визначення активності вірусу ІРТ. Визначення інфекційної активності одержуваної вірусної суспензії проводили методом титрування в культурі клітин яка відповідає тій на якій був напрацьований матеріал. Для наступного пасажу використовували матеріал з попереднього.

Чутливість клітинних ліній визначали за проявом цитопатичної дії вірусу на клітини та рівнем накопичення вірусу в клітинній суспензії, який визначали шляхом титрування отриманого матеріалу в культурі клітин та обчислювали титр інфекційної активності матеріалу за методом Ріда та Менча [7].

**Результати дослідження.** В якості біологічної моделі для культивування та накопичення вірусу ІРТ було обрано культуру клітин. З цією метою було випробувано ряд перещеплюваних ліній культур клітин з наступною порівняльною оцінкою чутливості цих ліній до вірусу ІРТ. В роботі було використано перещеплювані лінії різного походження: MDBK – нирка теляти, TrT – трахея теляти, KCT – коронарні судини теляти, HB – нирка вівці, ST – нирка свині, RK-13 – нирка кроля, RCC – рогівка ока кроля, BHK-21 – нирка сирійського хом'яка, Vero – нирка африканської зеленої мавпи.

Чутливість клітинних ліній визначали за рівнем накопичення вірусу в клітинній суспензії та проявом цитопатичної дії вірусу на клітини. Результати визначення інфекційної активності ві-

русу ІРТ в перещеплюваних культурах клітин представлені в таблиці 1.

Відповідно до результатів представлених у таблиці досліджено, що репродукція вірусу ІРТ відбувалась при інфікуванні культур клітин MDBK, TrT, HB, RCC, RK-13. При цьому найбільш інтенсивне зростання накопичення вірусу в суспензії спостерігали з 1 по 3 пасажі.

Найвищий титр вірусу в суспензії отримали при культивуванні вірусу ІРТ в культурі MDBK, який на 4-му пасажі склав 8,0±0,11 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Перещеплювані культури клітин кроля – RCC та RK-13 проявили порівняно низьку чутливість до вірусу ІРТ, яка знаходилась на рівні 6,0±0,05 та 5,8±0,07 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Культури клітин нирки вівці (HB) та трахеї теляти (TrT) мали дещо вищу чутливість в порівнянні з кролячими культурами, проте поступаються культурі MDBK в середньому на 1,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

В перещеплюваних культурах клітин Vero, BHK-21, ST та KCT вірус ІРТ ВРХ штаб «ВМ» не проявляв цитопатичну дію.

**Висновки.** Результати отриманих даних дозволяють зробити висновок, що для культивування вірусу ІРТ штаб «ВМ» та накопичення вірусної суспензії з високими титрами інфекційної активності серед досліджених культур клітин найкраще підходить культура MDBK. Використання культури клітин MDBK дозволяє накопичувати вірусну суспензію на четвертому пасажі в титрах 8,0±0,11 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

**Список літератури:**

1. Глотов А.Г. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / А.Г. Глотов, А.Ф. Шуляк, Т.И. Глотова, А.Н. Сергеев. – Новосибирск, 2006. – 196 с.
2. Костыркин Ю.А. Меры профилактики и борьбы с инфекционным ринотрахеитом – инфекционным пустулезным вульвовагинитом КРС в условиях молочного скотоводства / Ю.А. Костыркин, В.А. Мищенко, И.В. Нестеренко и др. // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2005. – Т.3. – С. 171-183.
3. Закутский Н. И. Герпесвирусные болезни животных / Н. И. Закутский, И. Ю. Хухоров, В. И. Жестерев и др. // Всерос. науч.-исслед. ин-т ветеринар. вирусологии и микробиологии. – Владимир, 2003. – 281 с.
4. Straub O.C. Bovine Rhinotracheitis Virus. Virus Infection of Ruminants / O.C. Straub // Amsterdam ets. Elsevier. sci. Publ. – 1990. – № 9. – P. 71-108.
5. Красочко П.А. Биотехнологические основы конструирования и использования иммунобиологических препаратов для молодняка крупного рогатого скота: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук: 03.00.23 / П.А. Красочко; Щелково – 2009. – 46 с.
6. Bashir S. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus in cell culture: (a case study) / S. Bashir, A.M. Dar, A.A. Bhat, S. Bukhari, T. Hussain // Journal of Cell and Tissue Research 15.2, 2015, pp. 5063-5066.
7. Reed L.J. A simple method of estimating fifty percent endpoints / L.J. Reed, H. Muench // Am. J. Hygiene, 27, 1938, pp. 493-497.

**Гулянич М.М., Недосеков В.В.**

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины

## **СРАВНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК К ВИРУСУ ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

### **Аннотация**

Исследовано чувствительность ряда перевиваемых культур клеток разного происхождения к вирусу инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота штамм «ВМ». По результатам исследований выявлено, что среди девяти исследуемых культур наиболее чувствительной к вирусу ИРТ была культура почки теленка – MDBK. Использование культуры клеток MDBK позволяет накапливать вирусную суспензию на четвертом пассаже в титрах  $8,0 \pm 0,11 \lg \text{TCD}_{50}/\text{cm}^3$ .

**Ключевые слова:** инфекционный ринотрахеит, чувствительность культур клеток, герпервирус 1 типа крупного рогатого скота, перевиваемая культура клеток, профилактика, вакцинация.

**Hulyanych M.M., Nedosekov V.V.**

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

## **COMPARISON OF SENSITIVITY CONTINUOUS CELL CULTURES TO THE INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS VIRUS**

### **Summary**

Sensitivity of a number of various approvals continuous cell cultures to infectious bovine rhinotracheitis strain «ВМ» was studied. According to research was found that among nine surveyed cell cultures most sensitive to infectious bovine rhinotracheitis virus was calf kidney culture – MDBK. Using of cell cultures MDBK allows to accumulate viral suspension on the fourth passages in the titer  $8,0 \pm 0,11 \lg \text{TCD}_{50}/\text{cm}^3$ .

**Keywords:** infectious bovine rhinotracheitis, sensitivity of cell culture, bovine herpesvirus type 1, continuous culture cell, prevention, vaccination.