

УДК: 619:578.835.1:636.4

І. Ф. ДЕМИДЕНКО*, аспірант

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

КЛОНУВАННЯ ЕНТЕРОВІРУСІВ СВИНЕЙ І ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ОДЕРЖАНИХ КЛОНІВ

Наведено експериментальні дані послідовного клонування референтних штамів та виділених ізолятів ентеровірусів свиней. Проведено порівняльне вивчення генетичних ознак виділених клонів штамів ентеровірусів свиней.

Ключові слова: ентеровіруси свиней, метод бляшок, клони, генетичні маркери.

Віруси, як і інші організми володіють комплексом різноманітних властивостей. Ті властивості, які передаються по спадковості, отримали назву генетичних ознак. Сукупність всієї спадкової інформації організму визначає його генотип.

Точне знання генетичних властивостей вірусів, особливо тих, які дозволяють диференціювати окремі штами вірусів, їх стабільність і взаємозв'язки, а також наявність простих та доступних методів виявлення змін генетичних ознак – одна із найважливіших умов, що визначає успішність проведення дослідів в генетиці.

Вивчення генетичних ознак має вагоме значення не тільки для теоретичних досліджень, але також і для практичної вірусології. Тільки, при поглибленню їх вивченні, можливо провести диференціацію між близькими штамами вірусів, підбирати виробничі штами і здійснювати контроль за станом штамів у виробництві діагностичних та вакцинних препаратів[1].

Перш ніж приступати до вивчення спадковості та мінливості вірусів, так як і будь яких інших організмів, необхідно отримати нащадків вірусів, всі частки якого володіють однаковими спадковими ознаками – так звану чисту лінію (клон).

Як відмітив Тимофіїв-Рессовський [2], робота з генетично однорідною популяцією є першим правилом експериментальної генетики.

Принцип отримання генетично однорідних ліній включає в себе виділення потомства від одного організму. Для отримання чистих ліній вірусів використовують декілька методів: метод кінцевих розведень, метод отримання клонів із популяції однієї інфікованої клітини та метод бляшок. При цьому допускають, що популяція вірусу в одній із чутливих систем

(наприклад, в культурі клітин), інфікованої кінцевим розведенням, або одна бляшка походить із однієї вірусної частки.

Метод кінцевих розведень вперше використали Барнет і Балл у 1943 р. Відповідно методу, готують ряд граничних розведень вірусу, якими заражають чутливу систему (тварин, курячі ембріони, культуру клітин). Досить важливо, щоб використана система була максимально чутлива до досліджуваного вірусу, оскільки це надає можливість виявити найбільшу кількість часток вірусу.

* Науковий керівник – В. П. Романенко, доктор ветеринарних наук, академік НААН

Інший метод отримання генетично однорідних ліній запропонував у 1963 р. Волен К. За даним методом, виділення клонів із популяції однієї інфікованої клітини здійснювали за допомогою зараження дозою вірусу (150 бляшкоутворюючих одиниць) декількох мільйонів клітин чутливої культури клітин. Після адсорбції шар клітин відмивають, клітини відокремлюють від скла, ресуспендують, розливають по декілька мілілітрів у велику кількість пробірок та інкубують впродовж певного часу, необхідного для здійснення одного циклу розмноження вірусу. Вважається, що за допомогою такого методу, популяція вірусу в одній пробірці походить із однієї інфікованої клітини [1].

Метод бляшок, який вперше був запропонований для вірусологічних досліджень Dulbecco [3] і перетерпів ряд модифікацій щодо складу поживного покриття та співвідношення між його компонентами, найбільш чутливий метод отримання чистих ліній (клонів) при роботі з різними вірусами, у тому числі ентеровірусами. Він дозволяє здійснити точний кількісний підрахунок інфекційних вірусних часток, проводити первинну ідентифікацію ентеровірусів за формою, величиною, динамікою розвитку бляшок [4].

За цим методом, вірусом заражають моношар чутливої культури клітин, яку після видалення неадсорбованого вірусу заливають поживним агаром, що містить нейтральрот. У місцях, де відбувається розмноження вірусу, клітини руйнуються і втрачають нейтральрот, в результаті чого на фоні червоно-рожевого шару агару над нормальним шаром клітин проявляються негативні колонії – бляшки вірусу, які вважаються потомством однієї інфекційної вірусної частки. Подальше виділення і пасажування вірусного клону із бляшки здійснюється шляхом переносу шматочку агару, виділеного з бляшки, у чутливу систему [1].

У силу природньо протікаючих процесів мінливості, існування клону як сукупності генетично однорідних віріонів обмежено часом, так як у популяції клону можуть утворитись віріони із спадково зміненими властивостями. Відбір із такої популяції клону по певній ознаці дозволяє отримати штам або культуру вірусу, клонованого саме по даній властивості. Однорідність такого штаму може бути збережена консервацією його методом ліофільного висушування і в певній мірі пасажами в умовах, які забезпечують нормальний розвиток даної властивості.

Генетичною ознакою (маркером) може бути будь яка властивість вірусу, яка передається спадково і володіє відповідною якісною і кількісною характеристикою у визначених умовах зовнішнього середовища[5].

У даній роботі **нашою метою** було порівняльне вивчення маркерних ознак клонів, отриманих за допомогою методу бляшок, референтних штамів ентеровірусів свиней та виділених ізолятів, тих же серотипів. Дослідження клонів проводили за маркерами: час появи бляшок, розмір бляшок – дрібні, маленькі, середні, великі (маркер S); форма бляшок – кругла, неправильна; колір – мутні (маркер r^1), крапчаті (маркер r^f), прозорі (маркер r^c), “червоні” (маркер r^r); цитопатична активність до культури клітин СНЕВ; терморезистентність (маркер Tr) в присутності 1 М $MgCl_2$ і без нього.

Матеріали та методи: в дослідах використовували штами ентеровірусів свиней: *Konratice*, *T80*, *V13* (одержані В. П. Романенком у 1970 р. від доктора І. В. Derbyshire Pirbright Laboratore (Великобританія)); виділені В. П. Романенком епізоотичні штами і доведені: до вакцинного – штам Перечинський-642, до

діагностичного – штам Березнянський-652, та патогенний штам Чернігівський-2372, який використовується для визначення імуногенних властивостей вакцини проти хвороби Тешена свиней, а також виділені ізоляти 1-го, 2-го та 8-го серотипів.

Клонування штамів методом бляшок проводили на культурі клітин СНЕВ відповідно модифікованого методу В. П. Романенка [6].

Терморезистентність вірусів визначали за методами Rovozzo G., Burke C. [7] і Melnick J., Wallis C. [8].

Результати досліджень і обговорення. У п'яти послідовних бляшечних пасажах отримали десять стійких клонів досліджуваних штамів ентеровірусів свиней. Під час клонування виявили, що штам *Konratice* утворював два типи бляшок: великі (діаметром 0,5 см) та середні (діаметром 0,3 см). При цьому, при подальшому пасажуванні, виділені клони із великих бляшок продукували тільки великі бляшки, а середні – тільки середні. Клони інших штамів та ізолятів, були однорідними впродовж всіх п'яти пасажів. Спільним для всіх штамів та ізолятів було те, що з часом бляшки зливались, внаслідок дифузного проникнення вірусів через агар в сусідні клітини з бляшок (фото 1).



Фото 1. Зліва – бляшки штаму *Konratice* №2, які проявились через 72 години, справа – злиття бляшок штаму *Konratice* №2 через 96-120 годин після постановки дослідів.

Визначили маркери клонів п'ятого пасажу: час появи бляшок, їх розмір та морфологію [9]. Дані наведені у таблиці 1.

Таким чином, бляшки виділених ізолятів в основному з'являлись через 72-96 год після постановки дослідів, а референтних штамів – через 48-72 год. Різниця між виділеними клонами відмічалась і по морфологічним ознакам.

**Морфологічна характеристика виділених клонів штамів
ентеровірусів свиней**

Виділений клон штаму ЕВС*, V пасаж	Час появи бляшок, год	Розмір бляшок, см	Морфологічна характеристика
<i>Konratice №1</i>	48	0,5	Великі, матові, круглі з рівними краями
<i>Konratice №2</i>	72	0,3	Середні, матові, круглі з рівними краями
Перечинський-642	48	0,02	Однорідні, матові, круглі з рівними краями
Березнянський-652	48	0,1	Однорідні, блискучі, круглі з рівними краями
Чернігівський-2372	96	0,01	Однорідні, матові, круглі з нечіткими краями
Ізолят 1-го серотипу	96	0,01	Однорідні, блискучі, круглі з рівними краями
<i>T80</i>	48	0,1	Однорідні, блискучі, круглі з рівними краями
Ізолят 2-го серотипу	72	0,01	Однорідні, блискучі, круглі з рівними краями
<i>V13</i>	72	0,02	Однорідні, матові, круглі з нечіткими краями
Ізолят 8-го серотипу	96	0,01	Однорідні, матові, круглі з нечіткими краями

*ЕВС – ентеровіруси свиней

Провели порівняння часу виникнення цитопатичної дії на культуру клітин СНЕВ виділених клонів ентеровірусів свиней та їх інфекційної активності [10].

Отримані результати представлені на рис.1. та в таблиці 2.

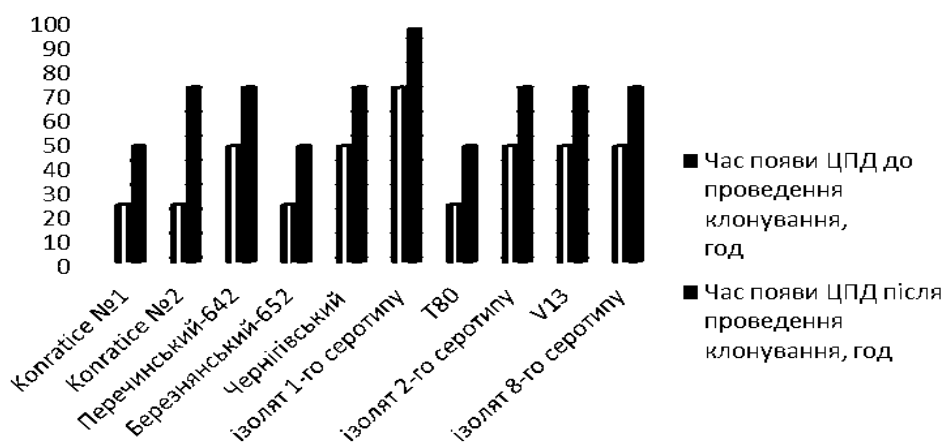


Рис. 1. Порівняння появи цитопатичної дії (ЦПД) на культуру клітин штамів ентеровірусів свиней до і після проведення клонування

Цитопатична дія на культуру клітин СНЕВ отриманих клонів референтних штамів ентеровірусів свиней проявлялась через 24-48 год після зараження дрібними фокусами круглих клітин, які через 4-6 годин перетворювались у вогнища круглих клітин, що охоплювали 50-70% всього моношару. ЦПД клонів виділених ізолятів проявлялась через 48-72 год. Після проведення клонування, час виникнення ЦПД на культуру клітин СНЕВ клонів референтних штамів подовжився на 24 годин, а клонів ізолятів – на 24-48 год.

Було визначено інфекційну активність штамів ентеровірусів свиней у культурі клітин СНЕВ до і після проведення клонування методом бляшок.

Таблиця 2.

Диференціація інфекційної активності штамів ентеровірусів свиней у культурі клітин СНЕВ до і після проведення клонування методом бляшок

Вихідні штамів та ізоляти ентеровірусів свиней	Виділений клон штаму ЕВС, V пасаж	Титр до проведення клонування, lg ТЦД/50см	Титр після проведення клонування, lg ТЦД/50см
<i>Konratice</i>	<i>Konratice №1</i>	9,5	9,75
	<i>Konratice №2</i>		9,5
Перечинський-642	Перечинський-642	9,5	9,75
Березнянський-652	Березнянський-652	9,0	9,5
Чернігівський-2372	Чернігівський-2372	5,75	6,5
Ізолят 1-го серотипу	Ізолят 1-го серотипу	8,0	8,25
T80	T80	9,0	9,5
Ізолят 2-го серотипу	Ізолят 2-го серотипу	8,0	8,25
V13	V13	8,75	9,0
Ізолят 8-го серотипу	Ізолят 8-го серотипу	8,5	8,75

Таблиця 2 демонструє, що після проведення клонування відмічається підвищення титрів інфекційної активності до культури клітин СНЕВ, як референтних штамів, так і виділених ізолятів.

Терморезистентність отриманих клонів штамів ентеровірусів свиней визначали шляхом прогрівання проб на водяній бані впродовж 1 год за температури 56 °C в присутності 1 М MgCl₂ і без нього. Проби вірусів непрогрітих, прогрітих у присутності іонів магнію і без них титрували у культурі клітин СНЕВ. Результати даних дослідів відображені у таблиці 3.

Як видно із таблиці 3, інфекційна активність виділених клонів штамів ентеровірусів свиней при прогріванні з 1М MgCl₂ зменшувалась тільки на 0,25-1,25 lg ТЦД/50см, тоді як при прогріванні без 1М MgCl₂ – значно більше, на 1,25-1,75 lg ТЦД/50см.

Висновки. Результати проведених нами дослідів свідчать про відмінності, як між штамми різних серотипів, так і між штамми одного серотипу, які можуть бути використані в подальших дослідженнях. За допомогою методу бляшок отримали чисті лінії вірусів, які за своїми ознаками мають вищу інфекційну актив-

ність у культурі клітин СНЕВ та являються більш стійкішими під час прогрівання в присутності 1 М $MgCl_2$. Одержані результати планується використовувати, як у фундаментальних, так і в прикладних цілях.

Таблиця 3.

Терморезистентність виділених клонів штамів ентеровірусів свиней в присутності і без 1М $MgCl_2$

Виділений клон штаму ЕВС, V пасаж	Титр непрогрітого (контроль), lg ТЦД/50см	Титр прогрітого в присутності 1М $MgCl_2$, lg ТЦД/50см	Титр прогрітого без 1М $MgCl_2$, lg ТЦД/50см
<i>Konratice</i> №1	9,75	8,5	8,25
<i>Konratice</i> №2	9,5	8,25	7,75
Перечинський-642	9,75	8,75	7,75
Березнянський-652	9,5	8,75	7,75
Чернігівський-2372	6,5	6,25	5,5
Ізолят 1-го серотипу	8,25	7,75	7,0
<i>T80</i>	9,5	8,5	8,25
Ізолят 2-го серотипу	8,25	8,0	7,5
<i>VI3</i>	9,0	8,75	7,75
Ізолят 8-го серотипу	8,75	8,0	7,0

Список використаної літератури

1. Ю. З. Гендон. Генетика вирусов человека и животных. – М.: Наука, 1967. – 355с.
2. Timofeeff-Ressovsky N. W. The experimental production of mutations // Biol. Rev. – 1934. – Vol.9, № 4. – p. 411-457.
3. Dulbecco R. Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particle of animal virus. Proc. Soc. Nat. Acad. Sci., 1952, 38, 747.
4. Ворошилова М. К. Энтеровирусные инфекции человека. – М.: Медицина, 1979. – 360 с.
5. Земсков М. В. Основы общей микробиологии, вирусологии и иммунологии: Науч. пособие / М. В. Земсков, М. И. Соколов, В. М. Земсков. – М.: Колос, 1972. – 287 с.
6. Романенко В. Ф. Бляшкообразующие свойства энтеровирусов свиней // В. Ф. Романенко, О. Г. Прусс // Тезисы докладов Всесоюзной межвузовской научной конференции по вет. вирусологии. – М., 1973. – Ч.І. – С. 47-48.
7. Bogel K. Untersuchungen uber die Chloroform-resistenz der Enteroviren des Rindes und des Schwienes /Bogel K. , Maer A.// Zbl. Vet. Med. – 1961. – В. 8, № 9. – S. 908-922.
8. Melnick J. Cationic stabilization – A new property of enteroviruses/Melnick J., Wallis C. //Virol. – 1961. – Vol. 14. – P. 74-82.
9. Демиденко І. Ф. Внутрішньотипова антигенна характеристика штамів ентеровірусів свиней // Вет. біотехнологія. – 2011. №18. – С. 60-63.
10. Клонування ентеровірусів свиней / В. П. Романенко, І. Ф. Демиденко // Вісник аграрної науки. – 2011. – №12. – С. 33-35.

**КЛОНИРОВАНИЕ ЭНТЕРОВИРУСОВ СВИНЕЙ И СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛУЧЕННЫХ КЛО-
НОВ / И. Ф. Демиденко**

Приведены экспериментальные данные последовательного клонирования референтных штаммов и выделенных изолятов энтеровирусов свиней. Проведено сравнительное изучение генетических признаков полученных клонов штаммов энтеровирусов свиней.

Ключевые слова: энтеровирусы свиней, метод бляшек, клоны, генетические маркеры

**SWINE ENTEROVIRUSES CLONING AND COMPARATIVE STUDY OF
GENETIC PROPERTIES OF RECEIVED CLONES/**

I. F. Demidenko

Experiments results are presents the sequential cloning of reference strains and dedicated isolates of swine enteroviruses. A comparative study of the genetic characteristics of derived clones of enterovirus strains of swine.

Key words: swine enteroviruses, the method of plaques, clones, genetic markers

Рецензент – кандидат ветеринарных наук У. М. Яненко