

УДК 636.09:616.98

ГАЛКА І.В., канд. вет. наук, e-mail: ptica2005@ukr.net  
МУЗИКІНА Л.М.,  
ГУДЗЬ Н.В., канд. вет. наук, e-mail: gudznataly@gmail.com  
КОВАЛЕНКО Г.А.,  
ПОГРЕБНЯК О.П.,  
ЧЕХУН А.І.

*Інститут ветеринарної медицини НААН*

## ІЗОЛЯЦІЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВІРУСУ ЕНЗООТИЧНОЇ ДІАРЕЇ СВИНЕЙ

*В результаті досліджень ізольовано та ідентифіковано вірус ензоотичної діареї свиней (ЕДС) методом ПЛР в режимі «реального часу». Здійснено виділення збудника ЕДС з біологічного матеріалу та його культивування на культурах клітин Vero, ПТП, СНЕВ, MARC-145, РК-15, SK6, IB-RS2. Встановлено, що в результаті культивування in vitro вірусу ЕДС є значні особливості. Вірус не культивується в лініях клітин природнього господаря – свині (лінії СНЕВ, РК-15, SK6, IB-RS2), але культивується в лінії клітин нечутливого виду – мавпи (лінія Vero). За результатами проведених досліджень виявлено культуру клітин, придатну для культивування вірусу ЕДС.*

**Ключові слова:** ензоотична діарея свиней, РНК, ПЛР у режимі реального часу, культури клітин.

**Вступ.** ЕДС – висококонтагіозне вірусне захворювання свиней, яке характеризується діареєю та дегідратацією організму. До захворювання сприйнятливі свині всіх вікових груп [1].

Збудником ЕДС є РНК-вмісний вірус, який відноситься до родини *Coronaviridae* (порядок *Nidovirales*).

Клінічно гострі спалахи діареї у свиней усіх вікових груп неможливо відрізнити від проявів трансмісивного гастроентериту. В ряді випадків, спалахи ЕДС можуть проявлятися у вигляді швидко поширюючої діареї у відлучених поросят і більш дорослих тварин на репродуктивних фермах, але без клінічних проявів у новонароджених поросят [1].

Діагноз на ЕДС встановлюють шляхом ізоляції самого вірусу, його геному або специфічних антитіл. Найбільш чутливим та специфічним тестом для виділення РНК вірусу ЕДС є зворотнютранскриптазна полімеразно ланцюгова реакція (RT-PCR)[2]. В тест-системі RT-PCR використовуються праймери до лідируючої послідовності вірусного геному (5' UTR) і успішно застосовуються для індикації та ідентифікації як лабораторних штамів, так і польових ізолятів вірусу ЕДС [3–5].

**Метою наших досліджень** була індикація та ідентифікація збудника ЕДС і вивчення його біологічних властивостей.

**Матеріали і методи досліджень.** В якості досліджуваного матеріалу використовували кишківники загиблих від діареї поросят віком 1–5 діб.

Для виділення РНК вірусу використовували комплект реагентів «РИБО-сорб», а для ідентифікації РНК вірусу ЕДС – діагностичну тест-систему «ЭДС» методом ПЛР в режимі «реального часу» (кат. № VET-58-FRT (RQ, iQ) – К, виробник ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва ).

У роботі були використані культури клітин:

- MARC-145 – клон культури клітин нирки макаки-резус *MA-104*, яку підтримували шляхом регулярних пасажувань з використанням поживного середовища *DMEM* з 10 % сироватки ВРХ;
- Vero – перещеплювана культура клітин нирки зеленої африканської макаки;
- СНЕВ – перещеплювальна культура клітин нирки ембріону свині;
- ПТП – перещеплювальна культура клітин тестикул поросят;
- РК-15, SK6, IB-RS2 – перещеплювані культури клітин нирки свині.

Суспензію з біологічного матеріалу готували на розчині Хенкса із подальшим центрифугуванням протягом 25 хв за 4 тис. об./хв.

Клітини Vero культивували на середовищі *DMEM* з додаванням 5–10 % сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ) та антибіотиків (гентаміцин 20 мкг/см<sup>3</sup>, або ципрофлоксацин 25 мкг/см<sup>3</sup>). Із флакону з отриманим клітинним моношаром видаляли середовище для культивування, моношар промивали 1–2 рази розчином Версена (0,02 %) та 1 раз сумішню розчинів Версена (0,02 %) і трипсину (0,025 %) у співвідношенні 4:1, після чого витримували за 37°C 5–10 хв.

Після відокремлення клітин від стінок флакону їх розводили середовищем *DMEM* із сироваткою крові ВРХ. Клітинну суспензію, яка містила 1–2x10<sup>5</sup> клітин/см<sup>3</sup>, вносили по 10 см<sup>3</sup> у флакони об'ємом 50 см<sup>3</sup>. Клітини культивували за температури 37 °С. Термін формування моношару становив 48–72 год.

Культуру клітин MARC-145 вирощували на скляних матрасах об'ємом 50 см<sup>3</sup> у стаціонарних умовах за наступною схемою:

- культивування в моношарі клітин MARC-145 до повного утворення моношару;
- дезагрегацію моношару клітин проводили з використанням 2–5 см<sup>3</sup> диспергуючої суміші, що складається із 0,02 % розчину версену і 0,25 % розчину трипсину у співвідношенні 9:1. Отриману суміш вносили на моношар клітин і витримували в термостаті 5–10 хвилин за температури 37°C;
- отриману клітинну суспензію розсівали на матраси з додаванням ростового середовища (10 % фетальної сироватки ВРХ).

Клітини СНЕВ культивували на середовищі 199, інші клітини культивували на середовищі *DMEM* з антибіотиком (гентаміцин 20 мкг/см<sup>3</sup> або ципрофлоксацин 25 мкг/см<sup>3</sup>). Клітини усіх ліній пересівали кожні 3–4 доби з коефіцієнтом 1:4–1:5.

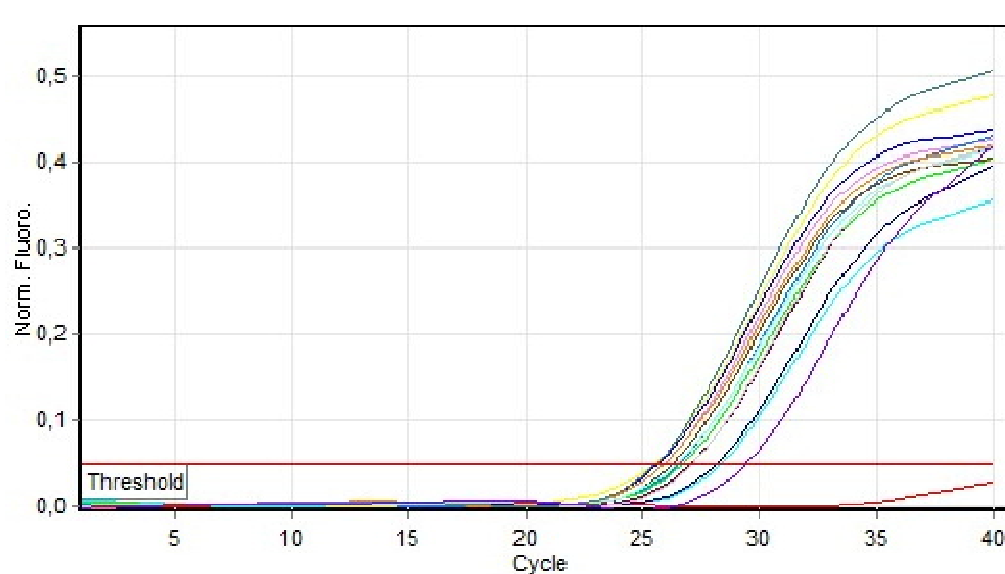
Для культивування вірусу в культурі клітин використовували клітини Vero. Клітини відмивали розчином Хенкса та інфікували вірусом у концентрації 0,1 тканинних цитопатичних доз (ТЦД<sub>50</sub>) на клітину. Вірус вносили одночасно з підтримуючим середовищем (DMEM, антибіотиками без сироватки), яке містило трипсин у концентрації 5 мкг/см<sup>3</sup>. Виражена цитопатична дія розвивалася через 18–20 годин після інфікування. Вірусомісну культуральну суспензію зливали в окремі ємності та зберігали за температури від –70 °С до –20 °С.

Інфекційність вірусу визначали методом титрування в культурі клітин Vero на 96-лункових планшетах стандартним способом в атмосфері 5 % CO<sub>2</sub>. Концентрація клітин за посіву: 2–4×10<sup>5</sup> клітин/см<sup>3</sup>, в лунку вносили 100 мкл клітинної суспензії, строк формування моношару 24–48 год. Серійні десятикратні розведення вірусу готували на середовищі DMEM, яке містило трипсин (5 мкг/см<sup>3</sup>) та гентаміцин (20 мкг/см<sup>3</sup>). Результати титрування вірусу враховували через 48–72 год. Титр вірусу визначали за методом Ріда-Менча та виражали в одиницях ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Для інфікування використовували культури клітин із сформованим моношаром на 90–100 % (24–48 год після засіву). Перед інфікуванням моношар двічі промивали від ростового середовища і 10 см<sup>3</sup> відповідного ростового середовища без сироватки, яка містила вірус у дозі 0,5 ТЦД<sub>50</sub> на клітину та трипсин у концентрації 5 мкг/см<sup>3</sup>. За розвитком цитопатичної дії (ЦПД) спостерігали протягом 96 годин. В якості контролю використовували ті самі культури клітин, не інфіковані вірусом, а також інфіковану та неінфіковану культуру клітин Vero. Культури заморожували в період виявлення ЦПД або за його відсутності – через 96 годин після інфікування. Після розморожування, культуральну рідину використовували для наступного пасажу в гомологічній лінії клітин. Результати адаптації вірусу до нових ліній клітин враховували за наявністю ЦПД та за допомогою РТ–ПЛР.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Індикацію та ідентифікацію вірусу ЕДС свиней було здійснено методом ПЛР в режимі "реального часу" з біологічного матеріалу від поросят віком 1–5 діб у кількості 12 проб.

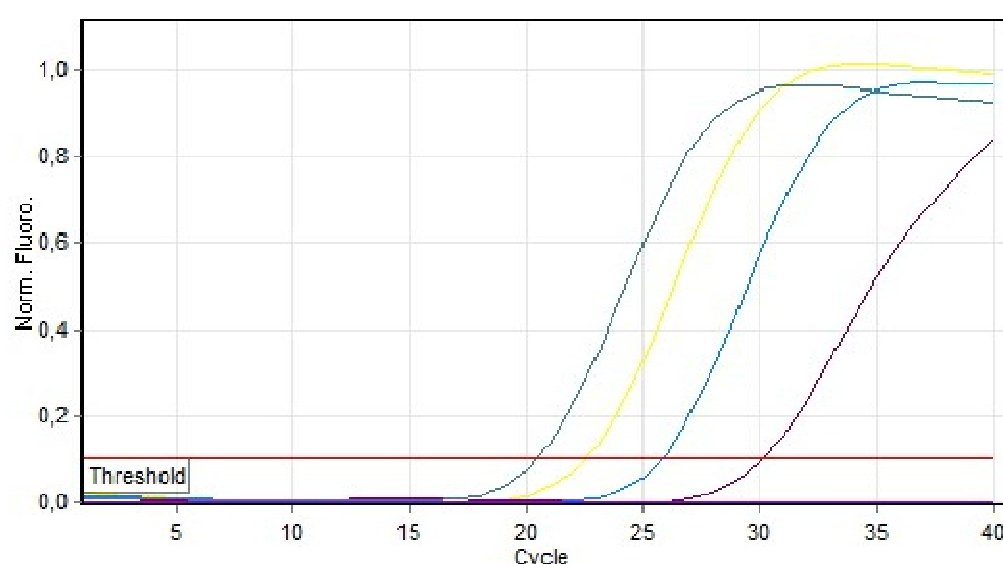
Метод визначення РНК вірусу ЕДС включає екстракцію РНК з біологічного матеріалу разом з РНК екзогенного неконкурентного внутрішнього контрольного зразка (ВКЗ), проведення зворотної транскрипції отриманої РНК, ампліфікації отриманої кДНК та гібридизаційно-флуоресцентної детекції продуктів ампліфікації в режимі «реального часу». Результат ампліфікації екзогенного ВКЗ на каналі FAM/Green (рис. 1, 2), а результат ампліфікації кДНК вірусу ЕДС реєстрували на каналі JOE/Yellow (рис. 3, 4),



**Рис. 1. Графік результатів ампліфікації ВКЗ по каналу FAM/Green.**

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1	Yellow	K+	Positive Control	25,55			
2	Red	K-	Negative Control				
3	Blue	B-	NTC	25,70			
4	Cyan	B15/1518/1	Unknown	28,39			
5	Pink	B15/1519/1	Unknown	25,97			
6	Blue	B15/1520/1	Unknown	26,59			
7	Green	B15/1521/1	Unknown	26,77			
8	Magenta	B15/1524/1	Unknown	27,14			
9	Orange	B15/1525/1	Unknown	25,95			
10	Brown	B15/1527/1	Unknown	26,32			
11	Cyan	B15/1528/1	Unknown	26,51			
12	Dark Blue	B15/1529/1	Unknown	28,19			
13	Grey	B15/1530/1	Unknown	27,17			
14	Teal	B15/1531/1	Unknown	25,61			
15	Purple	B15/1532/1	Unknown	29,47			

**Рис. 2. Показники порогового циклу (Ct) при ампліфікації ВКЗ по каналу FAM/Green.**



**Рис. 3. Графік результатів ампліфікації специфічної ділянки кДНК вірусу епідемічної діареї свиней по каналу JOE/Yellow.**

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1	Yellow	K+	Positive Control	22,57			
2	Red	K-	Negative Control				
3	Blue	B-	NTC				
4	Cyan	B15/1518/1	Unknown				
5	Pink	B15/1519/1	Unknown				
6	Blue	B15/1520/1	Unknown	25,81			
7	Green	B15/1521/1	Unknown				
8	Magenta	B15/1524/1	Unknown	30,15			
9	Orange	B15/1525/1	Unknown				
10	Brown	B15/1527/1	Unknown				
11	Cyan	B15/1528/1	Unknown				
12	Dark Blue	B15/1529/1	Unknown				
13	Grey	B15/1530/1	Unknown				
14	Teal	B15/1531/1	Unknown	20,47			
15	Purple	B15/1532/1	Unknown				

**Рис. 4. Показники порогового циклу (Ct) при ампліфікації специфічної ділянки кДНК вірусу епідемічної діареї свиней по каналу JOE/Yellow.**

У результаті проведення діагностичних досліджень виявлено РНК вірусу ЕДС у трьох зразках біологічного матеріалу.

З метою виділення ізоляту вірусу було використано як чутливу біологічну модель культури клітин Vero, СНЕВ та ПТП. Ізолят вірусу був виділений з

біологічного матеріалу в культурі клітин Vero. Слід відмітити дуже повільне розмноження вірусу протягом перших пасажів. Культура п'ятого пасажу мала титр  $2,0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ . Культури клітин СНЕВ та ПТП виявилися не чутливі до вірусу ЕДС, тому в подальших пошукових дослідженнях використовували тільки лінію клітин Vero.

За подальших дослідженнях біологічних властивостей вірусу ЕДС визначали його культуральні властивості.

Ці дослідження були проведені з метою можливого виявлення високопродуктивної лінії клітин для виробничого культивування вірусу. Вивчали можливість до культивування в культурі клітин перещеплюваних ліній різного походження (PK15, SK6, IB-RS2, MARC-145). Початковим матеріалом був ізолят вірусу в культурі клітин Vero  $4,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ . Культивування вірусу в культурах клітин різного походження визначали протягом кількох серійних пасажів.

У процесі виконання роботи вірус ЕДС пройшов більше 20 серійних пасажів у культурі клітин Vero. Культивування вірусу постійно супроводжувалось характерною ЦПД, що виражалось в інтенсивному формуванні вакуолізованих синцитіїв, які зливалися в симпласти. За період пасажування період прояву вираженого ЦПД поступово скорочувався, а концентрація вірусу збільшувалась.

З даних наведених в табл.1, видно, що з п'яти досліджуваних ліній клітин чутливими до культивування ізоляту вірусу ЕДС виявились дві: IB-RS2 і MARC-145.

Таблиця 1

**Чутливість різних ліній культур клітин до культивування вірусу ЕДС**

Пасаж вірусу	Культура клітин	Походження	Культивування та цитопатичні зміни					Результат виявлення вірусу ЕДС	
			пасаж					у культурі клітин Vero	методом РТ-ПЛР
			1	2	3	4	5		
15	СНЕВ	Нирка свині	±	±	±	±	±	-	-
15	PK-15	-//-	-	-	-	-	-	-	-
20	SK6	-//-	±	±	±	±	±	-	-
20	IB-RS2	-//-	-	-	+	+	+	+	+
20	MARC-145	Нирка зеленої мавпи	+	+	±	±	±	+	+

**Примітка:** + – наявність ЦПД; ± – сумнівний результат; – – відсутність ЦПД.

У культурі клітин MARC-145 ізолят вірусу ЕДС пасажувався 5 разів, максимальна активність вірусу ( $3,5 \lg/\text{cm}^3$ ) була в перших двох пасажах. Під час подальшого пасажування в цій культурі активність вірусу знижувалась і в п'ятому пасажі складала  $3,0 \lg/\text{cm}^3$ .

У культурі клітин IB–RS2 вірус пройшов вісім пасажів, максимальна активність була відмічена на п'ятому пасажі (4,0 Іг/см<sup>3</sup>). Результати дослідження підтверджують, що з усіх використаних культур клітин тільки Vero підтримує реплікацію ізоляту вірусу ЕДС на відносно високому рівні.

**Висновки та перспективи подальших досліджень:**

1. У результаті досліджень ізолювано та ідентифіковано методом ПЛР в режимі «реального часу» вірус ЕДС.

2. Виділено ізолят вірусу ЕДС та досліджено його культуральні властивості. Встановлено, що в результаті культивування *in vitro* вірусу ензоотичної діареї свиней (ЕДС) є значні особливості. Вірус не культивується в лініях клітин природнього господаря – свині (лінії СНЕВ, РК–15, SK6, IB–RS2), але культивується в лінії клітин нечутливого виду – мавпи (лінія Vero).

3. Встановлено, що серійне пасажування вірусу ЕДС в культурі клітин Vero супроводжувалось вираженням ЦПД з утворенням синцитія, симпластів та помірним накопиченням вірусу.

4. Культура клітин Vero та ізолят вірусу ЕДС буде використовуватись у наших подальших дослідженнях.

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Bachmann P.A. Comparative aspects of pathogenesis and immunity of viral diarrhoeas in animals / P.A. Bachmann, R.G. Hess // Virus infections of gastrointestinal tract.– New York, 1982.– P. 361–397.

2. Direct and rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus by RT–PCR / K. Ishikawa, H. Sekiguchi, T. Ogino, S. Suzuki // J. Virol. Methods–1997. – V. 69. – P. 191–195.

3. Detection of porcine epidemic diarrhea virus using polymerase chain reaction and comparison of the nucleocapsid protein genes among strains of the virus / S. Kubota, O. Sasaki, K. Animoto et al. // J. Vet. Med. Sci. – 1999. – V. 61. – P. 827–83.

4. Kim O. In situ hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhea virus in the intestinal tissues from naturally infected piglets / O. Kim, C. Chae // Vet. Pathol. – 2000. – V. 37. – P. 62–67.

5. Kim O. Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine epidemic diarrhea virus in pigs / O. Kim, C. Chae // Can. J. Vet. Res. – 2002. – V. 66. – P. 112–116.

**ИНДИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА ЭНЗООТИЧЕСКОЙ ДИАРЕИ СВИНЕЙ / Галка І.В., Музикіна Л.М., Гудзь Н.В., Коваленко Г.А., Погребняк О.П., Чехун А.І.**

*В результате исследований методом ПЦР в режиме «реального времени» идентифицирован вирус энзоотической диареи свиней (ЭДС). Проведено выделение возбудителя ЭДС из биологического материала, а также его культивирование на культурах клеток Vero, ПТП, СНЭВ, MARC–145, РК–15 SK6, IB–RS2. В результате установлено, что культивирование вируса ЭДС *in vitro* имеет значительные особенности. Вирус не культивируется в линиях клеток естественного хозяина – свиньи (линии СНЭВ, РК–15 SK6, IB–RS2), но культивируется в линии клеток нечувствительного вида – обезьяны (линия Vero). По результатам проведенных исследований определено культуру клеток, пригодную для культивирования вируса ЭДС.*

**Ключевые слова:** энзоотическая диарея свиней, РНК, ПЦР в режиме реального времени, культуры клеток.

**IDENTIFICATION OF THE PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS / Halka I.V., Muzykina L.M., Hudz N.V., Kovalenko A.A., Pogrebniak O.P., Chekhun A.I.**

**Introduction.** *Porcine Epidemic Diarrhea (PED) is a highly contagious viral disease of pigs which is characterized by diarrhea and dehydration. The causative agent of the PED is a RNA containing virus that belongs to Coronaviridae (order Nidovirales). Diagnosis is considered confirm by direct virus detection, its genome or specific antibodies.*

**Goal of the work.** *Indication and identification of PED agent and study of the biological properties of the virus.*

**Materials and methods.** *In our work we used intestines of 12 1–5 days old piglets died from diarrhea.*

*We used the «РИБО-сорб» reagent kit for virus RNA isolation, and «ЭДС» diagnostic test kit for virus RNA identification by real-time PCR.*

*We used the following cell cultures for virus cultivation: Vero, ПТТІ, CHEB, MARC–145, PK–15, SK6, IB–RS2.*

**Results of research and discussion.** *As a result of diagnostic tests there were detected PED virus RNA in three samples of biologic material by real-time PCR.*

*Virus was isolated from biological material in Vero cell culture. Virus culture from 5<sup>th</sup> passage had 2.0 lg TCD<sub>50</sub>/sm<sup>3</sup> titer. CHEB and ПТТІ cell cultures were not susceptible to PED virus.*

*Results of the virus adaptation to new cell lines were took into account by the availability of cytopathic effect and RT-PCR.*

*Two of five cell cultures were susceptible to PED isolate: IB–RS2 and MARC–145.*

*In MARC–145 cell culture maximum activity of the virus were registered in the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> passages (3.5 lg/sm<sup>3</sup>). During further passaging in this cell culture the virus activity decreased and in the 5<sup>th</sup> passage was 3.0 lg/sm<sup>3</sup>.*

*In IB–RS2 cell culture maximum activity of the virus were registered in the 5<sup>th</sup> passage (4.0 lg/sm<sup>3</sup>). The study results confirmed that only Vero of all used cell cultures supports replication of the PED isolate at a relatively high level. Cultivation of the virus was constantly accompanied by typical cytopathic effect characterised with intensive formation of vacuolated syncytium which which merged into symplasts. During passaging period of significant cytopathic effect manifestations gradually decreased and the concentration of the virus increased.*

**Conclusion and prospects for futher research.** *As a result of investigations by real time PCR it was identified PED virus. It is found that there are significant features of PED virus in vitro cultivation. The virus does not cultivate in the natural host cell lines – pigs (CHEB, PK–15, SK6, IB–RS2 lines) but cultivate in insensitive species cell lines – monkey (Vero line).*

**Keywords:** *Porcine Epidemic Diarrhea RNA, PCR real-time, culture cells.*

**REFERENCES**

1. Bachmann, P.A. & Hess, R.G. (1982). Comparative aspects of pathogenesis and immunity of viral diarrhoeas in animals. Virus infections of gastrointestinal tract.– New York.
2. Ishikawa, K., Sekiguchi, H., Ogino, T., Suzuki, S. (1997). Direct and rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus by RT–PCR. *J. Virol. Methods*, V. 69, 191-195.
3. Kubota, S., Sasaki, O., Animoto, K. et al. (1999). Detection of porcine epidemic diarrhea virus using polymerase chain reaction and comparison of the nucleocapsid protein genes among strains of the virus. *J. Vet. Med. Sci.*, V. 61, 827-83.
4. Kim, O. & Chae, C. (2000). In situ hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhea virus in the intestinal tissues from naturally infected piglets. *Vet. Pathol*, V. 37, P. 62-67.
5. Kim, O. & Chae, C. (2002). Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine epidemic diarrhea virus in pigs. *Can. J. Vet. Res.*, V. 66, 112-116.