

УДК 602.9:619: 578:616.98

ГУЛЯНИЧ М.М.*, e-mail: myroslava_hulyanych@ukr.net

Національний університет біоресурсів і природокористування України

НЕДОСЕКОВ В.В., д-р вет. наук, e-mail: nedosekov1@rambler.ru

Інститут ветеринарної медицини НААН

ДОСЛІДЖЕННЯ ІНФЕКЦІЙНОЇ АКТИВНОСТІ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЗА ТРИВАЛОГО ПАСАЖУВАННЯ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН

В роботі представлені результати дослідження інфекційної активності вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби за тривалого пасажування в культурі клітин MDBK та TrT. Результати проведених досліджень свідчать про стабільність вірусу при його пасажуванні в культурі клітин MDBK, а тривале пасажування вірусу інфекційного ринотрахеїту штам «ВМ» впродовж 20 пасажів не призводить до зниження інфекційної активності вірусу та зберігається на рівні 7,9–8,1 lg ТЦД₅₀/см³. При пасажуванні вірусу інфекційного ринотрахеїту в культурі клітин TrT виявлено значне зниження інфекційної активності після проведення 10-ти послідовних пасажів.

Ключові слова: інфекційний ринотрахеїт великої рогатої худоби, культури клітин, інфекційна активність вірусу, перещеплювана культура клітин.

Вступ. Респіраторні захворювання великої рогатої худоби (ВРХ), в тому числі інфекційний ринотрахеїт (ІРТ) завдають значних економічних втрат тваринництву. Унікальність збудника ІРТ полягає в можливості інтеграції його геному в геном клітини господаря, що призводить до тривалої персистенції. Вірус ВоНВ-1 здатний розмножуватись в моноцитах, нейтрофілах і макрофагах, спричиняє при цьому імуносупресію. Це обумовлює імунодефіцитний стан тварин та підвищує їх сприйнятливість до умовно-патогенних збудників, що в свою чергу перешкоджає адекватній та ефективній імунній відповіді після введення вакцинного препарату [1, 2].

Вперше інфекційний ринотрахеїт/інфекційний пустульозний вульвовагініт був описаний в 1928 році. 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 році із носових виділень телят з ознаками гострого респіраторного захворювання. На території колишнього Радянського Союзу ІРТ був вперше діагностований в 1964 році [3]. Зараз інфекційний ринотрахеїт ВРХ реєструється 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 ефективного вакцинного препарату важливим є

* Аспірант, науковий керівник – д-р вет. наук, проф. В.В. Недосєков

активність використовуваного вірусного матеріалу [5]. Тому необхідним є знання про стабільність конкретного вірусу при тривалому пасажуванні. Вірусний матеріал, в свою чергу, зокрема вірусу інфекційного ринотрахеїту ВРХ напрацьовують шляхом пасажування вірусу в культурі клітин. Відомо, що властивості штамів можуть різнитись при пасажуванні в різних культурах клітин [3, 4, 6–8].

Мета роботи. Метою роботи є дослідження стабільності за показниками інфекційної активності вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби штам «ВМ» за тривалого пасажування в перещеплюваних культурах клітин MDBK та TrT.

Матеріал і методика досліджень. Дослідження динаміки зміни інфекційної активності вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби вивчали використовуючи метод послідовних пасажів в перещеплюваній культурі клітин MDBK та TrT. Культури клітин кожного наступного пасажу інфікували вірусмістким матеріалом отриманим від попереднього пасажу.

Культури клітин вирощували в культуральних матрасах площею 25 см² протягом 1–2 діб до утворення суцільного моношару клітин, в кількості по 5 дослідних матрасів та 1 контрольний на кожен пасаж. Після попереднього відмивання моношар клітин розчином Хенкса в культуральні матраси з моношаром клітин вносили вірус ІРТ ВРХ штам «ВМ» з інфекційною активністю не нижче 5,0 Іг ТЦД₅₀/см³. Множинність зараження при цьому складала 0,01 ТЦД₅₀/кл. Для контакту вірусу з клітинами, інфіковану культури в матрасах переміщували в термостат на 1 годину за температури 37 ± 0,5 °С. Після контакту додавали підтримуюче середовище. В якості підтримуючого середовища використовували живильне середовище «DMEM+RPMI» у співвідношенні 1:1 без сироватки крові. В якості контролю залишали матрас з неінфікованою культурою клітин, де проводили зміну ростового середовища на підтримуюче.

Інфіковані культури клітин досліджували за допомогою інвертованого мікроскопу до прояви цитопатичної дії (ЦПД) вірусу в культурах клітин. Репродукцію вірусу ІРТ в культурах клітин оцінювали за появою інтенсивних специфічних цитопатичних змін у клітинному моношарі. При ураженні не менше 70–80 % моношару матраси з культурою заморожували за температури мінус 20–24 °С. Після відтавання, з отриманої суспензії відбирали проби для визначення титру інфекційної активності вірусу ІРТ. Визначення інфекційної активності вірусмісткої суспензії проводили методом титрування в культурі клітин MDBK та TrT відповідно. Культуру клітин вирощували в 96-лункових мікропланшетах до формування не менше 90 % моношару в лунках. Робили 10-кратні послідовні (методом послідовних перекатів зі зміною наконечників) розведення вірусу (від 10⁻¹ до 10⁻⁹) в наборі стерильних пеніцилінових флаконів, на підтримуючому середовищі, по два повтори на кожен досліджувану пробу. Відповідні розведення вірусу переносили на планшет в лунки з культурою клітин, перед внесенням з лунок видаляли ростове середовище та вносили по 200 мкл розведень вірусу. Використовували по чотири лунки для кожного

розведення вірусу. Мікропланшет з внесеними в культуру клітин розведеннями вірусу переносили в CO₂-інкубатор (подача газу 5 %, температура 37°C) для подальшої культивування протягом 7 діб. Щоденно, починаючи з 72-ї години інкубації мікропланшети проглядали під мікроскопом на наявність цитопатичної дії (ЦПД) вірусу. Лунки планшету, в моношарі яких спостерігали ЦПД хоча б у вигляді окремих вогнищ, вважали позитивними, та відмічали як «+». Результати титрування вважали достовірними при умові збереження моношару в контрольних лунках. Обчислення титру інфекційної активності матеріалу проводили за методом Ріда та Менча (1938). Результати виражали в тканинних цитопатичних дозах (ТЦД₅₀/см³). Для кожного наступного пасажу використовували матеріал з попереднього. Пасажування проводили до 20 пасажу.

Результати досліджень та їх обговорення. Нами було досліджено вплив тривалого пасажування в культурах клітин на інтенсивність накопичення вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби. Дослідження інфекційної активності проводили продовж 20 пасажів в культурах клітин MDBK та TrT. Результати дослідження представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Інфекційна активність вірусу інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби при пасажуванні в культурах клітин, $M \pm m$, $n=5$

Культура клітин	Титр інфекційної активності вірусу (lg ТЦД ₅₀ /см ³)								
	Вихідний	1 пасаж	2 пасаж	3 пасаж	4 пасаж	7 пасаж	10 пасаж	15 пасаж	20 пасаж
MDBK	5,0 ±0,05	6,5 ±0,10	7,2 ±0,05	7,9 ±0,12	8,0 ±0,11	7,8 ±0,02	8,1 ±0,13	8,0 ±0,15	7,9 ±0,16
TrT	5,0 ±0,05	5,2 ±0,07	6,3 ±0,06	6,6 ±0,19	6,8 ±0,14	6,4 ±0,11	6,7 ±0,16	5,9 ±0,41	5,1 ±0,07

Нами виявлено, що процес адаптації вірусу ІРТ до культури клітин MDBK та досягнення максимальної інфекційності тривав до 3-го пасажу, та зріс майже на 1,5 lg в порівнянні з 1-м пасажем, інфекційна активність на 3-му пасажі склала 7,9 ±0,12 lg ТЦД₅₀/см³.

Після закінчення процесу адаптації спостерігали незначні коливання показників інфекційної активності. Проте, впродовж дослідження (20 пасажів) вірус проявляв стабільно високі показники інфекційної активності на рівні 7,9–8,1 lg ТЦД₅₀/см³.

При пасажуванні вірусу ІРТ в культурі клітин TrT спостерігали поступове зростання титру інфекційної активності до 6,8 ±0,14 lg ТЦД₅₀/см³ на 4-му пасажі. Інфекційна активність вірусу при культивуванні в культурі клітин TrT в середньому була на 1–1,5 lg нижчою в порівнянні з культурою MDBK

Проте, як видно на рисунку 1, починаючи вже з 10 до 20 пасажу відбулось стрімке зниження титру інфекційної активності до $5,1 \pm 0,07 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

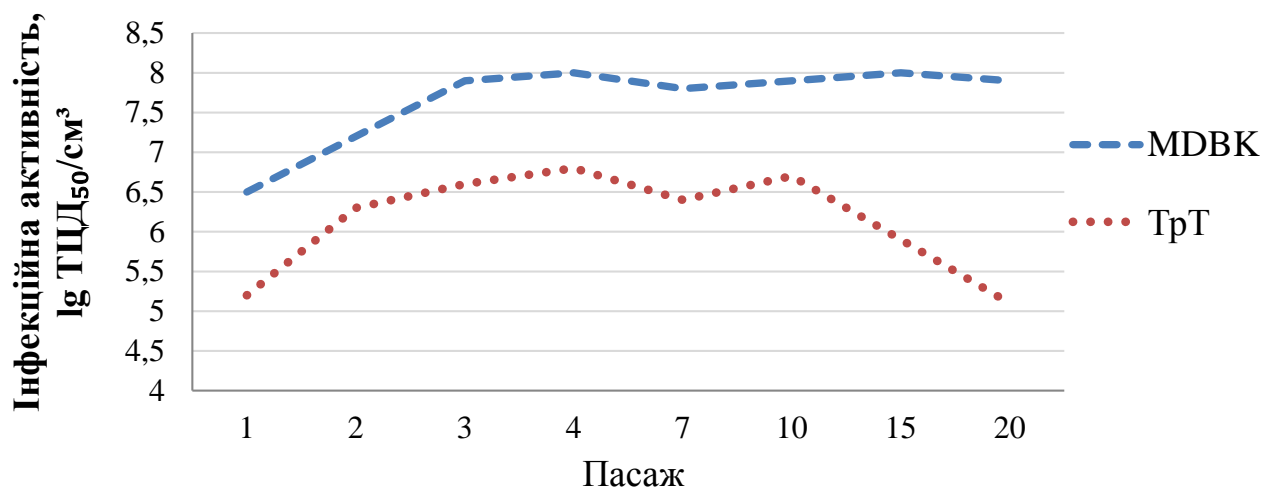


Рис. 1. Динаміка прояву інфекційної активності вірусу ІРТ за тривалого культивування.

Таким чином нами було встановлено, що процес адаптації вірусу до культури TrT займає приблизно той же час що й при адаптації до культури MDBK. Проте нам не вдалось адаптувати вірус ІРТ до культури клітин TrT методом тривалого пасажування для збільшення інфекційної активності в даній культурі. Натомість після тривалої фази «плато» спостерігали різке зниження інфекційності, що може свідчити про мінливість вірусу інфекційного ринотрахеїту штам «ВМ».

Висновки та перспективи подальших досліджень. Результати проведених досліджень дозволяють зробити висновок, що тривале пасажування вірусу інфекційного ринотрахеїту штам «ВМ» в культурі клітин MDBK не призводить до зниження інфекційної активності вірусу та відповідно до зниження інтенсивності накопичення вірусу. Це свідчить про стабільність вірусу при пасажуванні впродовж 20 пасажів в культурі клітин MDBK без втрати інфекційності, та збереженні її на рівні 7,9–8,1 lg ТЦД₅₀/см³. При тривалому пасажуванні в культурі клітин TrT спостерігали різке зниження інфекційної активності вірусу від 10 до 20 пасажу з 6,7 lg до 5,1 lg відповідно.

Подальші дослідження будуть зосереджені на продовженні проведення пасажування вірусу до 50 пасажу. Та більш детального вивченні причин різкого зниження інфекційної активності вірусу ІРТ в культурі клітин TrT.

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. Гулянич М.М. Технологічні аспекти виготовлення інактивованих вакцин проти інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби / М.М. Гулянич, В.В. Недосеков, І.С. Клейманов // Науково-технічний бюлетень Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. – 2015. – Т.3, №3. – С. 58–63.
6. 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.
7. Hulyanych Myroslava. Determination of Cultural Conditions of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus Strain “BM” / Myroslava Hulyanych, Vitalii Nedosekov, Yurii Sobko // Annals of Agrarian Science, Elsevier, Volume 14, Issue 3, September 2016, Pages 201-204. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/15121887>.
8. 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. – 2015. – Vol. 15. – Issue 2. – P. 5063–5066.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНФЕКЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПАССИРОВАНИИ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК / Гулянич М.М., Недосеков В.В.

В работе представлены результаты исследования инфекционной активности вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота при длительном пассировании в культуре клеток MDBK и TrT. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о стабильности вируса при его пассировании в культуре клеток MDBK, а длительное пассирование вируса инфекционного ринотрахеита штамм «BM» в течение 20 пассажей не приводит к снижению инфекционной активности вируса и сохраняется на уровне 7,9-8,1 lg ТЦД₅₀/см³. При пассировании вируса инфекционного ринотрахеита в культуре клеток TrT выявлено значительное снижение инфекционной активности после проведения 10-ти последовательных пассажей.

Ключевые слова: *инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота, культуры клеток, инфекционная активность вируса, перевиваемая культура клеток.*

STUDY OF INFECTIOUS ACTIVITY OF THE INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS VIRUS DURING LONG-TERM PASSAGE IN CELL CULTURE / Hulyanych M.M., Nedosekov V.V.

Introduction. *Infectious bovine rhinotracheitis cause significant economic losses to animal husbandry therefore needs to be controlled through vaccination.*

The goal of the work. *The aim of this study was to investigate stability of infectious activity of the infectious bovine rhinotracheitis virus strain “BM” during long-term passage in MDBK and TrT cell cultures.*

Materials and methods. *Research of infection activity dynamics of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus was studied using the method of successive passages in continuous cell cultures MDBK and TrT. Cell cultures were infected with each subsequent passage virus material obtained from the previous passage.*

Result of research and discussion. It was revealed that period of MDBK cell culture adaptation to the IBR virus continued until 3rd passage, and increased by nearly 1.5 lg compared with the 1st passage, infectious activity on 3rd passage was 7.9 ± 0.12 lg TCID₅₀/cm³. During the study (20 passages) virus showed consistently high rates of infectious activity at 7.9–8.1 lg TCID₅₀/cm³.

During passages of IBR virus in cell culture TrT observed a gradual increase in titer of infectious activity to 6.8 ± 0.14 lg TCID₅₀/cm³ at the 4th passage. Infectious virus activity by culturing in TrT cell culture was on average 1–1.5 lg lower compared with MDBK cell. However, starting from 10 to 20 passage there was a rapid reduction in titer of infectious activity to 5.1 ± 0.07 lg TCID₅₀/cm³.

Conclusions and prospects for further research. Long-term passage of infectious bovine rhinotracheitis virus strain “BM” in MDBK cell culture does not reduce infectious activity of the virus. This demonstrates stability of the virus for 20 passages in MDBK cell culture without losing infectivity, and maintaining it at the level 7.9–8.1 lg TCID₅₀/cm³. At long-term passage in TrT cell culture observed a rapid decline in infectious activity of the virus from 10 to 20 passages from 6.7 lg to 5.1 lg respectively.

Further studies will be focused on the continuation passages of the virus for up to 50 passage. And more detailed study of the causes of the rapid decline of infectious activity of the IBR virus in TrT cell culture.

Keywords: infectious bovine rhinotracheitis, cell culture, infectious activity of the virus, continuous cell culture.

REFERENCES

1. Glotov, A.G., Shuljak, A.F., Glotova, T.I., et al. (2006). Infekcionnyj rinotraheit krupnogo rogatogo skota [Infectious bovine rhinotracheitis]. Novosibirsk [in Russian].
2. Kostyrkin, Y.A., Mischenko, V.A., Nesterenko, J.V. (2005). Mery profilaktiki i bor'by s infekcionnym rinotraheitom - infekcionnym pustuleznym vul'vovaginitom KRS v uslovijah molochnogo skotovodstva [Measures of prevention and fight against infectious bovine rhinotracheitis - infectious pustular vulvovaginitis cattle in a dairy cattle]. *Tr. Federal'nogo centra ohrany zdorov'ja zhivotnyh Proc. – Federal Centre for Animal Health*, 3, 171-183 [in Russian].
3. Zakutskiy, N.I., Huhorov, I.Y., & Zhesterev, V.I. (2003). *Gerpesvirusnye bolezni zhivotnyh [Herpesvirus disease of animals]*. Vladimir [in Russian].
4. Straub, O.C. (1990). Bovine Rhinotracheitis Virus. *Virus Infection of Ruminants*. Amsterdam ets. Elsevier. sci. publ., 9, 71-108.
5. Hulyanych, M.M., Nedosekov, V.V., & Kleimanov, I.S. (2015). Tekhnolohichni aspekty vyhotovlennia inaktyvovanykh vaksyn proty infektsiinoho rynotrakheitu velykoi rohatoi khudoby [Technology aspects for production of inactivated vaccines against infectious bovine rhinotracheitis]. *Naukovo-tekhnichnyi biuleten Naukovo-doslidnyi tsentr biobezpeky ta ekolohichnoho kontroliu resursiv APK – Scientific and technical bulletin of the Research Center of biosafety and environmental control resources AIC*, 3, 3, 58-63 [in Ukraine].
6. Krasochko, P.A. (2009). Biotehnologicheskie osnovy konstruirovaniya i ispol'zovaniya immunobiologicheskikh preparatov dlja molodnjaka krupnogo rogatogo skota [Biotechnological bases of design and use of immunobiological drugs for young cattle]. *Doctor's thesis*. Shhelkovo [in Russian].
7. Hulyanych, M., Nedosekov, V., & Sobko, Y. (2016). Determination of Cultural Conditions of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus Strain “BM”. *Annals of Agrarian Science, Elsevier*, 14, 3, 201-204. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/journal/15121887>.
8. Bashir, S. (2015). Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus in cell culture: (a case study). *Journal of Cell and Tissue Research*, 15, 2, 5063-5066.