

14. Kryvoshyja, P.Ju., Mandygra, M.S., & Kot L.B. (2011). Reprodukciya virusu infekciynoi' anemii' v geterologichnij kul'turi klityn ta otrymannja antygeny dlja reakcii' nejtralizacii' [Reproduction of infectious anemia virus in cell culture and heterologous antigens for obtaining neutralization]. *Veterynarna medycyna: mizhvidomchyyj tematychnyj naukovyj zbirnyk – Veterinary Medicine: interdepartmental thematic scientific collection*, 95, 158-160 [in Ukraine].

15. Gyrin, V.M. (1995). *Posibnyk z medychnoi' virusologii' [Manual of Medical Virology]*. K.: Zdorov'ja [in Ukraine].

УДК 619:616.98:578.825.1

КРИВОШИЯ П.Ю., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: p.kryvoshyya@gmail.com

Дослідна станція епізоотології Інституту ветеринарної медицини НААН

РУДЬ О.Г., канд. вет. наук, доц., e-mail: oleg.rud-rud1965@ukr.net

Рівненський державний гуманітарний університет

КУЛЬТИВУВАННЯ ГЕРПЕСВІРУСУ КОНЕЙ І- ТИПУ НА КУРЯЧИХ ЕМБРІОНАХ

У статті наведено результати вивчення біологічних властивостей репродукції штамів вірусу ринопневмонії коней на курячих ембріонах, а саме динаміку накопичення його в органах інфікованих. Проведеними дослідженнями встановлено, що найбільша концентрація вірусу була в мозку, печінці та серці, в інших органах – вміст незначний. Пасажування M(W) на курячих ембріонах супроводжувалось накопиченням його в органах, але ембріони не гинули. Збільшення концентрації штаму СВ-69 супроводжувалось загибеллю ембріонів, що вказує на біологічну відмінність між штамами.

Ключові слова: коні, ринопневмонія, курячі ембріони, гемаглютинація.

Вступ. Герпесвірусна інфекція одна з найбільш розповсюджених серед тварин, вражаючи центральну нервову систему (енцефаліт, мієліт, енцефаломієліт), очі (кератит, кератокон'юнктивіт), слизові оболонки (стоматит, афтозні язви, ураження статевих органів) і шкіряні покриви (екзема, везикулярне запалення).

Герпесвірусні інфекції періодично загострюються, але це не супроводжується розвитком довготривалого імунітету. У разі недостатньої гуморальної відповіді (антитіла) мають місце чинники, що характеризують неспецифічну резистентність організму.

Патогенною для тварин є родина *Herpesviridae*, до складу якої входять віруси хвороби Ауескі, ринотрахеїту великої рогатої худоби, ринопневмонії коней, злякисної катаральної гарячки великої рогатої худоби, виразкового мамаліту, ринотрахеїту кішок, герпесу собак, хвороби Марека, інфекційного ларинготрахеїту птиці, чуми качок, герпесу птиці та інші. Більшість герпесвірусів довготривалий час персистують в організмі природних господарів, підтримуючи хронічну або латентну інфекцію.

Збудник ринопневмонії коней – герпесвірус першого типу (ВГК-1). Він є одним із основних причин респіраторних хвороб та абортів у коней. Хвороба завдає значних економічних збитків конярству, що призводить до втрати відтворювальної здатності конематок, вибраковки цінних племінних тварин та витрат на проведення ветеринарно-санітарних заходів. У природніх умовах вірус уражає коней, віслюків і мулів незалежно від статті, породи та віку. Чистопородні коні більш сприйнятливі до збудника, ніж тварини місцевих порід. Ринопневмонія, вперше виникнувши в кінному господарстві, часто-густо набуває характеру стаціонарної інфекції. Гострий перебіг інфекції чергується з періодами прихованого, атипового прояву хвороби, що значно ускладнює постановку діагнозу. Різноманітний перебіг і прояв захворювання обумовлений біологічними особливостями штамів збудника [1–5].

Мета роботи. Провести культивуацію вірусу герпесу коней І-типу на курячих ембріонах та визначити його вміст в органах інфікованих ембріонів.

Матеріали і методи досліджень. У дослідах було використано штам СВ-69 та М(W) герпесвірусу першого типу, курячі ембріони 12-добового віку (n=20), а також клітинні культури. Для досліджень відбирали яйця з живими ембріонами та відмічали маркером межі пуги (повітряний простір зі сторони тупого кінця яйця). Відібрані яйця з курячими ембріонами переносили в кімнату для інфікування. Поверхню зі сторони пуги дезінфікували 5 % спиртовим розчином йоду. Для запобігання контамінації бактеріями, у вірусосумісний матеріал додавали суміш антибіотиків пеніциліну та стрептоміцину – 200 ОД/см³. Проколювали шкарлупу одноразовим шприцом та проводили інфікування на хоріоалантоїсну оболонку вище згаданими штамми в об'ємах 0,5–1 см³. Після чого, отвір закривали розплавленим парафіном. Для виділення вірусу з одного матеріалу використовували не менше ніж чотири курячі ембріони.

Інфіковані ембріони інкубували в термостаті за температури 37,0–37,5 °С. Для підтримання вологості у межах 70–80%, в термостат поміщали великий кювет з водою. У разі випаровування води її періодично поповнювали. За інфікованими ембріонами вели спостереження шляхом періодичного овоскопування перевертаючи кожен раз яйця в іншу сторону. Через 5–6 днів припиняли інкубацію ембріонів і проводили їхнє вилучення. Перед цим знову обробляли 5% спиртовим розчином йоду та зрізали ножицями за відміченими межами повітряної пуги шкарлупу яйця. Після чого розрізали хоріоалантоїсну оболонку і відбирали стерильним одноразовим шприцом алантоїсну рідину. Залишок вмісту яйця виливали в чашку Петрі. З ембріона видаляли мозкову тканину, м'язи, кров, внутрішні органи. Останні подрібнювались шляхом гомогенізації, а отримані суспензії – центрифугувались. Надосад використовували для виявлення присутності вірусу за цитопатичною дією на моношарі клітин ембріонів курчати (КЕК) та визначали титр гемаглютинації (РГА) з використанням еритроцитів коня та барана згідно загальноприйнятої методики [6].

Первинні та субкультури клітин з курячих ембріонів отримували з використанням відповідних загальноприйнятих методик [6].

Визначення цитопатичної активності проводили з використанням мікроплашок, вносячи по 0,3 см³ надосадів з органів ембріонів до кожної лунки зі сформованим моношаром клітин. Вирощували клітинні культури з розрахунку 0,8–1,0×10⁵ клітин в 1 см³ в полістиролових лунках мікроплашок об'ємом 0,3 см³ за температури 37 °С. Культивування клітин у мікропанелях проводилася за розробленою нами технологією. Кожним розведенням дослідного матеріалу заражали 4 лунки з клітинами. Досліди ставили паралельно з усіма зразками. Результати досліджень обліковували шляхом реєстрації цитопатичної дії, для чого лунки полістиролових плашок з культурами клітин щоденно проглядали під малим збільшенням мікроскопу впродовж 4–7 діб. Титр вірусу визначали за методом Ріда і Менча. Для ідентифікації виділених ізолятів використовували реакцію нейтралізації (РН) з специфічними сироватками і паралельно титрували з нормальними сироватками. Так, якщо індекс нейтралізації перевищував 2 lg ТЦД₅₀ /0,3 см³, рахували, що виділений ізолят є ВГК-1.

Результати досліджень та їх обговорення. Впродовж проведених 4-х пасажів на курячих ембріонах вище згаданих штамів вірусу ринопневмонії було встановлено, що штам М(W) не був адаптований до курячих ембріонів, тому як у жодному пасажі не було виявлено загибелі ембріонів, хоча накопичувався в тканинах ембріона та в ембріональній рідині. На відміну від нього, СВ-69 у кожному наступному пасажі викликав загибель ембріонів, що свідчило про його чутливість до цих клітин. Відібрані органи та рідини інфікованих курячих ембріонів були досліджені на вміст вірусів в РГА з використанням еритроцитів коня та барана (табл. 1).

Таблиця 1

Гемаглютинуючий титр надосаду екстрактів органів та рідин з ембріонів курей інфікованих штамми вірусу ринопневмонії коней

Органи та рідини ембріонів курчат 18-добового віку.	СВ-69		М(W)	
	Титри гемаглютинації з еритроцитами коня	Титри гемаглютинації з еритроцитами барана	Титри гемаглютинації з еритроцитами коня	Титри гемаглютинації з еритроцитами барана
Мозок	1:32	1:8	1:64	1:32
Серце, печінка	1:32	1:8	1:16	1:64
М'язи	1:4	1:8	1:4	0
Алантаїсна рідина	1:4	0	1:4	0
Жовток	1:8	1:8	1:16	0
Контроль – не інфіковані органи ембріонів курчати	0	0	0	0

Встановлено, що титр гемаглютинації був високий з екстракту мозку, печінки та серця ембріонів інфікованих штамом М(W), як з еритроцитами коня, так і барана, та був у межах 1 : 16 – 1 : 64. Титр з органів, інфікованих штамом СВ-69 дещо відрізнявся. Високий титр був лише з еритроцитами коня, а з еритроцитами барана він був значно нижчим. Таким чином, аналізуючи динаміку титрів гемаглютинації найбільша концентрація вірусів встановлена в таких органах, як мозок, печінка та серце, а в інших органах і рідинах їхній уміст був незначний.

Паралельно проводились дослідження щодо встановлення присутності вірусного матеріалу з органів інфікованих ембріонів за проявом ЦПД на субкультурі клітин КЕК. Всього було проведено 5 пасажів (табл. 2). З неї видно, що прояв ЦПД вірусу спостерігали з екстракту мозку вже в 1-му пасажі та прояв дії його був упродовж п'яти пасажів, з печінки – на 2 пасажі, серця – на 3-му, алантоїсна рідина та жовток – 4-му, а в м'язах – лише в 5 пасажі. Титр вірусу в мозку був в межах 10^{-2} - 10^{-3} ТЦД₅₀/0,3 см³, печінці та серці – 10^{-1} - 10^{-2} , в інших органах та рідинах прояв ЦПД був лише у разі додавання не розведених вірус-рідин.

Таблиця 2

Динаміка прояву цитопатичної дії на культуру клітин КЕК екстрактів органів та рідин інфікованих ембріонів курчат штамми ринопневмонії

Органи та рідини ембріонів курчат 18-добового віку.	Пасажі				
	1	2	3	4	5
Мозок	+	+	+	+	+
Печінка	-	+	+	+	+
Серце	-	-	+	+	+
Алантоїсна рідина	-	-	-	+	+
Жовток	-	-	-	+	+
М'язи	-	-	-	-	+
Контроль органів не інфікованих ембріонів курчати	-	-	-	-	-

Примітка: (+) прояв ЦПД вірусу; (-) відсутнє ЦПД вірусу.

Для перевірки приналежності цитопатогенних агентів до ВГК-1 було проведено реакцію нейтралізації на субкультурі клітин курячого ембріона з використанням специфічних імунних сироваток і паралельно – з нормальними сироватками. Було встановлено, що індекс нейтралізації перевищував 2 lg ТЦД₅₀/0,3 см³, що вказувало на присутність у дослідних пробах ВГК-1.

За ринопневмонії коней разом з респіраторним симптомокомплексом реєструють також ураження центральної нервової системи, що може бути як самостійна форма хвороби. Довгий час збудник персистує в нервових вузлах. У разі реактивації вірусу клінічні ознаки частіше відображені в атаксії та парезах тазових кінцівок коней.

Непрямым доказом цього є результати наших досліджень, а саме – максимальне накопичення вірусу в нервових клітинах мозку. Хоча проводити

пряму аналогію розмноженню вірусу в курячих ембріонах, як лабораторної моделі, з розподілом його вмісту в коней хворих на ринопневмонію не є прямим доказом, але можливо припустити, що ВГК-1 має подібний розподіл за чутливістю до клітин організму незалежно від виду тварин.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Незалежно від штамової приналежності найбільша концентрація вірусного антигену була в мозку, печінці та серці, в інших органах – їхній вміст був незначним.

2. Встановлена біологічна відмінність між штамми за їхньою патогенністю до курячих ембріонів (СВ-69 – патогенний, М(W) – непатогенний).

В подальшому буде вивчено біологічні властивості ізолятів герпесвірусів 1-го типу на інших біологічних об'єктах з метою вивчення особливостей їх розвитку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Біологічні властивості штамів вірусу ринопневмонії та діагностика захворювання в реакції нейтралізації / П.Ю. Кривошия, С.М. Катюха, Л.Б. Кот., М.В. Романко // Сільський господар. – 2015. – №4 – 6. – С.18–22.

2. Кривошия П.Ю. Епізоотологічний моніторинг інфекційних захворювань коней та шляхи підвищення його ефективності. / П.Ю. Кривошия // Ветеринарна медицина України. – 2013. – № 3. – С. 7–10.

3. Сюрин В.Н. Диагностика вирусных болезней животных / В.Н. Сюрин [и др.]. – Москва: ВО Агропромиздат, 1991. – 362 с.

4. Allen G. Equine herpesvirus neurological disease in the USA and United Kingdom / G. Allen, D. Powell // Equine Disease Quarterly. – 2003. – № 12. – P. 2–3.

5. Allen G. Equine herpesvirus new insights into equine herpesvirus-1 EHV-1 neurological disease / G. Allen // Equine Disease. – 2006. – Vol.15. – № 1. – P. 2–3.

6. Гирін В.М. Посібник з медичної вірусології / В.М. Гирін. – К.: Здоров'я, 1995. – 367 с.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ГЕРПЕСВИРУСУ ЛОШАДЕЙ 1-ТИПУ НА КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ / Кривошея П.Ю., Рудь О.Г.

В статье приведены результаты изучения биологических свойств репродукции штаммов вируса ринопневмонии лошадей на куриных эмбрионах, а именно динамику накопления его в органах инфицированных. Проведенными исследованиями установлено, что наиболее высокая концентрация вируса была в мозге, печени и сердце, в других органах – содержание незначительное. Пассирование М(W) на куриных эмбрионах сопровождалось накоплением его в органах, но эмбрионы не гибли. Увеличение концентрации штамма СВ-69 сопровождалось гибелью эмбрионов, что указывает на биологические отличия между штаммами.

Ключевые слова: лошади, ринопневмония, куриные эмбрионы, гемагглютинация.

CULTIVATION OF HORSE HERPES VIRUS TYPE 1 ON CHICKEN EMBRYOS / Kryvoshyja P.Ju., Rud' O.G.

Introduction. Rhinopneumonia is a widespread disease of horses, both in the world and in Ukraine. It causes significant economic losses to the horse breeding, which leads to loss of

reproductive capacity of mares, to the culling of valuable pedigree animals and to significant costs for the implementation of veterinary and sanitary measures.

The goal of the work. To cultivate herpes virus of horses (I-type) on chicken embryos.

Materials and methods. The strains SV-69 and M (W) of the rhinopneumonia virus were investigated. To infect 12-day-old embryos viral material was injected into the chorioallantoic cavity at a dose of 0.5–1.0 cm³. The presence of the virus in organs and tissues was determined by cytopathic effect on the monolayer of chick embryo fibroblasts (CEF) and determined the hemagglutination titre (HA) using horse and rabbit red blood cells.

Results of research and discussion. The conducted studies revealed that the titer of hemagglutination was high in extracts of the brain, liver and heart of the embryos infected with virus strains, as with the red blood cells of the horse and ram it was within 1: 16 – 1: 64. During the fourth passages of the tested strains on chicken embryos, it was found that the strain M (W) accumulated in the tissues of the embryo but did not cause embryos death in any passage. At the same time, the increase of the SV-69 strain concentration was accompanied by the death of embryos. By the manifestation of the cytopathic effect of the isolated samples on the culture of cells, similar results as in hemagglutination, test have been observed.

Conclusions and prospects for further research. Studied some biological properties of reproduction of horses' rhinopneumonia strains in chicken embryos, namely the dynamics of their accumulation in the organs of infected embryos. It was found that the highest concentration of the virus was in the brain, liver and heart, while in other organs its content is insignificant.

Keywords: horses, rhinopneumonia, chicken embryos, hemagglutination.

REFERENCES

1. Kryvosyja, P.Ju., Katjuha, S.M., Kot, L.B., & Romanko, M.V. (2015). Biologichni vlastyvoli shtamiv virusu rynopnevmonii' ta diagnostyka zahvorjuvannja v reakcii' nejtralizacii' [Biological properties of rhinopneumonia virus strains and diagnosis of the disease in the neutralization reaction]. *Sil's'kyj gospodar – The farmer*, 4-6, 18-22 [in Ukrainian].
2. Kryvosyja, P.Ju. (2013). Epizootologichnyj monitoryng infekcijnyh zahvorjuvan' konej ta shljahy pidvyshhennja jogo efektyvnosti [Epizootological monitoring of infectious diseases of horses and ways to increase its efficiency]. *Veterynarna medycyna Ukrai'ny – Veterinary Medicine of Ukraine*, 3, 7-10 [in Ukrainian].
3. Sjurin, V.N., Belousova, R.V., & Fomina, N.V. (1991). *Diagnostika virusnyh boleznej zhivotnyh [Diagnosis of viral diseases of animals]*. Moskva: Agropromizdat [in Russian].
4. Allen, G., & Powell, D. (2003). Equine herpesvirus neurological disease in the USA and United Kingdom, *Equine Disease Quarterly*, 12, 2-3.
5. Allen, G. (2006). Equine herpesvirus new insights into equine herpesvirus-1 EHV-1 neurological disease, *Equine Disease*, 15, 1, 2-3.
6. Gyrin, V.M. (1995). *Posibnyk z medychnoi' virusologii' [Manual of Medical Virology]*. K.: Zdorov'ja [in Ukraine].