

10. A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouwsantibiotictest (NAT – screening). *www.elsevier.com*. Retrieved from <http://www.elsevier.com/locate/foodcont>.
11. Nachkebia, J.V., Nachkebia, E.J. & Nachkebia, K.J. (2006). Casual Conditionality of Pathogen Features of Escherichia due to their Joint Inhabitation with Oxygenic Clostridia. *Annals of Agrarian Science*, Vol. 3, 4, 195-197.
12. Gondova, Zuzana (2012). The NAT test – screening for antibiotic residues in the tissues of food-producing animals – Institute of Meat Hygiene and Technology University of Veterinary Medicine and Pharmacy Kosice, Slovak Republic. *www.maso-international.cz*. Retrieved from: <http://www.maso-international.cz/download/maso-international-2012-2-page-095-100.pdf>.
13. Nico, Coppens (2012). Microbial screening tests for antibiotic residues in meat: compared with the European technologies – Ghent university veterinary faculty. *www.lib.ugent.be*. Retrieved from: http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/893/681/RUG01-001893681_2012_0001_AC.pdf.
14. Commission Regulation (EU) No. 37/2010.(2010). *Official journal of the European Commission*, L. 15, 72.
15. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Commission*, L. 221, 8-28.

УДК 636.09:57.083.2[57.063.8+578.82/.83]

ГАВРАСЬЄВА Н.В., канд. вет. наук, наук. сп., e-mail: gari-nata@ukr.net,

КУЗЬМИЧ Г.С., e-mail: 80505752885@mail.ru,

ЮЩЕНКО А.Ю., e-mail: yshchenkoalla@ukr.net,

КЛЕСТОВА З.С., д-р вет. наук, e-mail: zinaklestova@gmail.com

Державний науково-контрольний інститут біотехнології та штамів мікроорганізмів

АДАПТАЦІЯ ДО НЕПЕРМІСИВНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН ТВАРИН ВІРУСУ ДІАРЕЇ ВРХ ШТАМУ «BUG-04»

У статті наведено результати підбору перещеплюваних культур клітин BGM, KST, PK-15, FLK для культивування вірусу діареї великої рогатої худоби. Швидкість реплікації та урожай вірусу залежали від культури. На підставі отриманих результатів, культура клітин BGM на 6 пасажі дає більш високий урожай вірусу у порівнянні з культурами клітин KST, PK-15 та FLK. Отримані дані дозволяють розширити діапазон досліджень із вірусом діареї ВРХ.

Ключові слова: вірус діареї ВРХ, культура клітин, титр вірусу, штам «BUG-04».

Вступ. Вірусна діарея великої рогатої худоби (хвороба слизових оболонок, мукозального хвороба, інфекційний ентерит великої рогатої худоби) – поширене контагіозне захворювання, що уражує різні вікові групи тварин, має широкий спектр клінічних симптомів, може спричинювати як

імуносупресію, так і розлади репродуктивної, респіраторної та травної систем [1].

Поряд з великою рогатою худобою в природних умовах до вірусної діареї сприйнятливі буйволи, олені, козулі, кози, вівці. У свиней інфекція протікає безсимптомно. Серологічні дослідження показали, що в польових умовах вірус діареї інфікує свиней, кіз, буйволів, оленів, косуль, овець, біловезьких зубрів, червоних оленів. Персистентно інфіковані тварини є постійним джерелом виділення вірусу, а отже і основним чинником передачі захворювання між сприйнятливими тваринами [2].

Збудником вірусної діареї великої рогатої худоби є РНК-геномний вірус, що відноситься до родини *Flaviviridae*, роду *Pestivirus*. Має антигенну спорідненість із вірусом класичної чуми свиней та прикордонної хвороби овець [3].

Вірус діареї репродукується в первинних культурах клітин нирок, легень або селезінки ембріона корови, тестикул теляти, перещеплюваних культурах селезінки ембріона корови, макрофагах та лімфоцитах [4]. Лабораторну діагностику хвороби проводять комплексно, з використанням різних методів, серед яких виділення вірусу в культурі клітин до теперішнього часу залишається «золотим стандартом» діагностики [5].

Головною задачею при роботі з вірусним матеріалом є збереження його біологічних властивостей. Найкращим способом зберігання вірусу є ліофілізація, але при цьому спостерігається зниження закладеної інфекційної активності матеріалу.

Виходячи з цього, поновлення біологічних властивостей вірусу з ліофільного стану завжди пов'язано з певними труднощами при накопиченні біомаси з високим інфекційним титром [6]. У процесі роботи може виникнути необхідність у заміні перещеплюваної культури клітин, що може призвести до зниження титру вірусу.

Метою роботи було дослідження здатності вірусу діареї великої рогатої худоби штаму «BUG-04» до культивування в різних біологічних системах.

Матеріали та методи досліджень. В якості поживного середовища для культивування усіх ліній клітин використовували середовище ДМЕМ з додаванням 10% фетальної сироватки ВРХ. Для отримання суспензії клітин та подальшого їх пересіву використовували суміш, що складалась з 0,02% р-ну Версену та 0,25% р-ну Трипсину (1 : 10). З метою обрання чутливої клітинної культури для виділення та культивування вірусу діареї ВРХ штаму «BUG-04» були випробувані різні щодо видового походження лінії перещеплюваних клітин: ВGM (клітини нирки африканської зеленої мавпи), KST (клітини коронарних судин великої рогатої худоби) FLK (клітини ембріональної нирки вівці), РК-15 (клітини нирки свині). Усі культури знаходяться у колекції ДНКІБШМ та зберігаються у рідкому азоті при -196 °С. Досліджуваний штам вірусу діареї ВРХ був люб'язно наданий аспіранткою Інституту ветеринарної медицини Дремух Ю.Ю. Усі культури були перевірені на відсутність контамінації сторонніми вірусами, мікоплазмою, а також грибовою та

бактеріальною мікрофлорою. Моношар клітин вирощували у пластикових культуральних флаконах об'ємом 50 см³ та у 96-лункових культуральних планшетах. Посівна доза – 2 x 10⁵ кл/см³ клітин на флакон.

Титр вірусу розраховували за методом Ріда та Менча, який виражали в тканинних цитопатогенних дозах (ТЦД 50/см³).

Результати та їх обговорення. Під час порівняльного вивчення репродуктивної здатності вірусу у перещеплюваних культурах клітин встановлено, що реплікація викликає цитопатичні зміни у моношарових культурах перещеплюваних ліній клітин.

Інфікування культур клітин штамом «BUG-04» виконували двома способами:

1. Контакт культури з досліджуваним штамом вірусу «BUG-04» протягом 30 хв за температури 37 °С у розведенні 1 : 10.

2. Додавання вірусу безпосередньо у підтримуюче середовище у розведенні 1 : 3.

Після інфікування перші прояви ЦПД у культурах спостерігали при застосуванні першого способу. При застосуванні другого способу інфікування культур клітин прояви ЦПД були менш характерні та помітні та проявлялись пізніше в порівнянні із застосуванням першого способу.

ЦПД характеризувалися округленням, утворенням конгломератів клітин, формування симпластів у вигляді багатоядерних клітин.

Таблиця 1

Результати титрування вірусу діареї ВРХ штаму «BUG-04» на культурах клітин (ТЦД 50/см³)

Культура клітин	3 пасаж	6 пасаж
FLK	5,5 ± 0,19	6,0 ± 0,07
BGM	7,0 ± 0,17	7,75 ± 0,15
PK-15	5,5 ± 0,21	6,5 ± 0,11
KST	5,5 ± 0,20	6,0 ± 0,08

Швидкість реплікації та урожай вірусу залежали від культури. Зокрема, перші ознаки ЦПД в інфікованих штамом «BUG-04» культурі BGM (клітини нирки африканської зеленої мавпи) проявлялись через 72 години на першому пасажі, на культурі KST (клітини коронарних судин великої рогатої худоби) на 3 добу на 2 пасажі, а на культурах PK-15 (клітини нирки свині), FLK (клітини ембріональної нирки вівці) на 4 добу на 3 пасажі.

Висновки та перспективи подальших досліджень. На підставі отриманих результатів культура клітин BGM на 6 пасажі дає більш високий урожай вірусу у порівнянні з культурами клітин KST, PK-15 та FLK. Отримані дані дозволяють розширити діапазон досліджень із вірусом діареї ВРХ. Планується продовження наукової роботи із використанням інших перещеплюваних ліній культур клітин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Fulton R. Bovine Viral Diarrhea Virus. Diagnosis, Management, and Control / R. Fulton // Iowa: Blackwell, 2005. – P. 197–208.

2. Hessman B. Evaluation of economic effects and the health and performance of the general cattle population after exposure to cattle persistently infected with bovine virus diarrhea virus in a starter feedlot / B. Hessman, R. Fulton, D. Sjeklocha et al. // Am. J. Vet. Res. – 2009. – V. 70. – P. 73–85.

3. Стеценко, В.І. Антигенна спорідненість та відмінність різних штамів вірусу діареї великої рогатої худоби [Текст] / В. І. Стеценко, О. В. Годовський, Л. І. Кучерявенко, Л.П. Тризна, Ю. С. Голуб, І.В. Чебанюк // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – 2002. – Вип. 80. – С. 589–594.

4. Baker J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection / J.C. Baker // Vet. Clin. North. Am. – 1995. – Vol. – 11. – P. 425–445.

5. Saliki J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections / J. Saliki, E. Dubovi // Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. / – 2004. – V. 20, N 1. – P. 69–83.

6. Изучение чувствительности перевиваемой линии клеток ПЭК к вирусу диареи [Текст] / Н.Н. Гизитдинов [и др.] // Ветеринария. 1976. – №12. – С. 29–30.

АДАПТАЦИЯ К НЕПЕРМИССИВНЫМ КУЛЬТУРАМ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ ВИРУСА ДИАРЕИ КРС ШТАММА «BUG-04» / Гаврасьева Н.В., Кузьмич А.С., Ющенко А.Ю., Клестова З.С.

В статье приведены результаты подбора перевиваемых культур клеток BGM, KST, PK-15, FLK для культивирования вируса диареи крупного рогатого скота. Скорость репликации и урожай вируса зависели от культуры. На основе полученных результатов, культура BGM на 6 пассаже даёт более высокий урожай в сравнении с культурами KST, PK-15 и FLK. Полученные результаты позволяют расширить диапазон исследований с вирусом диареи КРС.

Ключевые слова: вирус диареи КРС, культура клеток, титр вируса, штамм «BUG-04».

ADAPTATION OF THE BOVINE DIARRHEA VIRUS STRAIN «BUG-04» TO NON-PERMISSION ANIMAL CELL CULTURES / Gavrasieva N.V., Kuzmich A.S., Yushchenko A.Y., Klestova Z.S.

Introduction. Bovine viral diarrhea (mucosal disease, infectious enteritis of cattle) is a common contagious disease affecting different age groups of animals, has a wide range of clinical symptoms, can lead to both immunosuppression and reproductive, respiratory and digestive systems.

Laboratory diagnostics of the disease include various methods, among which the virus isolation in the cells culture remains the "gold standard" of the diagnosis until now.

The main goal when working with viral material is to preserve its biological properties. The best way to store the virus is lyophilization, but the renewal of the biological properties of the virus from the lyophilic state is always associated with certain difficulties in the accumulation of biomass with high infectious titer. In the work, there may be a need to replace the cell culture, which may cause decreasing of the virus titer.

The goals of the work was the investigate the ability of bovine diarrhea virus BUG-04 strain of cultivation in different biological systems.

Materials and methods. Cell lines were cultivated in a DMEM nutrient media with 10% fetal bovine serum. Monolayer cell cultivated in plastic culture wells with a volume of 50 cm³ and in 96-well culture plates. Seeding dose was 200000 cells per well. Monolayer cells BGM (African green monkey kidney cells), KST (bovine coronary vessels cells), PK-15 (pig's kidney cells) and FLK (sheep embryonic kidney cells) were infected by strain «BUG-04» in a dose of 0.02-0.5 TCID₅₀.

Results of research and discussion. It was found that replication induces cytopathic changes in monolayer cultures of transfilled cell lines. The rate of replication and crop of the virus depended on the culture. The first signs of CPE in the infected culture BGM appeared after 72 hours in the first passage, in culture KST on 3rd days on 2nd passage, in culture PK-15, and FLK on 4th days on 3rd passage.

Conclusions and prospects for further research. Based on the results obtained, the BGM cell culture on the 6 passage gives a higher yields of the virus compared to the cell cultures KST, PK-15 and FLK. The obtained data allow expanding the range of studies with bovine diarrhea virus. It is planned to continue the scientific work with the use of other cell culture lines.

Keywords: bovine diarrhea virus, cell culture, strain «BUG-04».

REFERENCES

1. Fulton, R. (2005). Bovine Viral Diarrhea Virus. Diagnosis, Management, and Control. Iowa: Blackwell.
2. Hessman, B., Fulton, R., Sjeklocha, D. et al. (2009). Evaluation of economic effects and the health and performance of the general cattle population after exposure to cattle persistently infected with bovine virus diarrhea virus in a starter feedlot. *Am. J. Vet. Res.*, Vol. 70, 73-85.
3. Stetsenko, V.I., Godovskiy, O.V., Kucheryavenko, L.I., Trizna, L.P., Golub, Yu.S., Chebanyuk, I.V. (2002). Antigenna sporidnenist ta vidminnost riznih shtamiv virusu diareyi velikoyi rogotoyi hudobi [Antigenic affinity and difference between different strains of bovine diarrhea virus]. *Veterinarna meditsina – Veterinary medicine*, Vol. 80, 589-594 [in Ukrainian].
4. Baker, J.C. (1995). The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet. Clin. North. Am.*, Vol. 11, 425-445.
5. Saliki, J., & Dubovi, E. (2004). Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, Vol. 20 (1), 69-83.
6. Gizitdinov, N.N. & et. al. (1976). Izuchenie chuvstvitelnosti perevivaemoy linii kletok PEK k virusu diarei [Izuchenie chuvstvitelnosti perevivaemoy linii kletok PEK k virusu diarei]. *Veterinariya – Veterinary medicine*, Vol. 12, 29–30 [in Ukrainian].