2. Максимальное количество клеток полученных с одного роллера с монослоя и суспензии достигало 975–1210 млн. кл./бут.

3. Клетки, накопленные роллерно-суспензионным методом и снятые в логарифмической фазе роста, сохраняют пролиферативную активность при заправке их в биореактор для глубинного культивирования.

4. В практику успешно культивированных клеток ВНК-И внедрен опыт использования кондиционированной питательной среды, которая положительно влияет на ростовые свойства клеток.

Список литературы

1. Адамс, Р. Методы культуры клеток для биохимиков [Текст] / Р. Адамс. — М. : Мир, 1983. — 263 с. ***2.*** Дьяконов, Л.П. Культивирование клеток и тканей животных [Текст] / Л.П. Дьяконов [и др.]; под общ. ред. Л.П. Дьяконова. — Ставрополь: Ставроп. Правда, 1988. — Ч. 2. — 91 с. ***3.*** Дьяконов, Л.П. Животная клетка в культуре [Текст] / Л.П. Дьяконов, В.И. Ситьков. — М. : Компания Спутник+, 2000. — 154 с. ***4.*** Фрешни, Р. Культура животных клеток. Методы [Текст] / Р. Фрешни. — М. : Мир, 1989. — 318 с. ***5.*** Jakoby, W.B. Cell Culture [Text] / Jakoby W.B., Pastan I.H. — 2004. — P. 639.

DEVELOPMENT OF CULTIVATION METHOD OF SUSPENSION LINE OF CELLS BHK-21(C–13)

Babak V.A., Gusev A.A., Zhalikhovskaya Z.L.

Institute of Experimental Veterinary Medicine, Minsk, Belarus

This article gives the description of roller-suspension method of cultivation of cells BHK-21 (c-13), and experience of use of the conditioned nutrient mediums. The developed method is more effective than the basic variant minimum in 2.7 times, and can be used for accumulation of cells BHK-21 (c-13) for a bioreactor batch at the first stage of cultivation.

УДК 619:616-07:578.5:578.835.11

СУЧАСНІ АСПЕКТИ ДІАГНОСТИКИ ТЕШОВІРУСНИХ ХВОРОБ СВИНЕЙ З ВИКОРИСТАННЯМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕТОДІВ

Дерев'янко С.В., Бова Т.О., Сорока В.І.

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН, м. Чернігів

Тешо-, ентеровіруси свиней можуть бути причиною ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней [1-3], гастроентериту [4], пневмоній [5, 6], патології репродуктивної системи [7] та везикулярної хвороби свиней [8]. За фізико-хімічними, біологічними властивостями та типом цитопатичної дії в культурах клітин ссавців ентеровіруси свиней було розділено на три групи [9, 10]. До I групи були віднесені штами 1-7 та 11-14 серотипів, до II групи – 8-й серотип, III групи – 9-й, 10-й серотипи. На основі секвенування геномів [11] та філогенетичного аналізу [12, 13] ентеровіруси свиней I групи віднесено до виду *Porcine teschovirus* і винесено в окремий рід *Teschovirus,* ентеровіруси свиней II групи рекласифіковано як *Porcine enterovirus A* та III групи – *Porcine enterovirus B*, які віднесені до роду *Enterovirus* [14, 15].

Геном тешо- й ентеровірусів свиней представлений одноланцюговою (+) РНК, яка виконує функцію матричної. Довжина РНК тешовірусів становить від 7006 до 7111 нуклеотидів [12], ентеровірусів А – 7412-7491 [16], ентеровірусів В – 7351-7401 [16].

На рис. 1. представлена структура геному тешо-, ентеровірусів. На кінцях відкритих для зчитування структур, знаходяться ділянки, що не транслюються (NTR-Non-translated region). 3-й кінець є поліаденільованим, а до 5-го кінця ковалентно приєднаний низькомолекулярний білок VPg. Геноми тешовірусів і ентеровірусів свиней А кодують лідерний протеїн, функція якого поки що невідома [15].

Трансляція відбувається за допомогою механізму кеп-незалежної внутрішньої ініціації, ключову роль у цьому процесі відіграє IRES (Internal Ribosome Entry Site) – місце внутрішнього приєднання рибосоми [17]. IRES-елементи тешо-, ентеровірусів

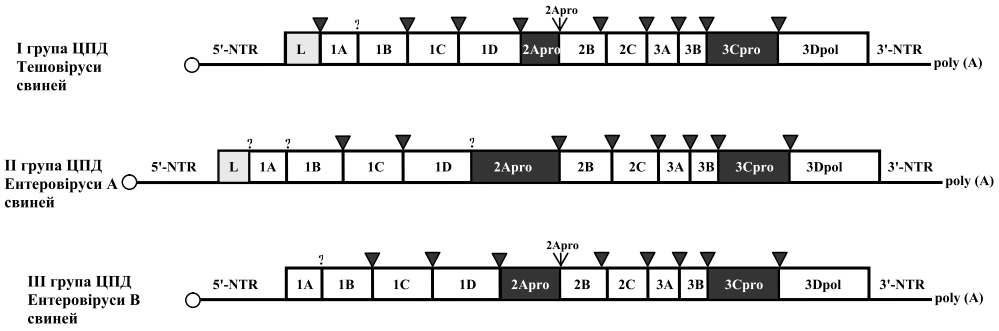

Рис. 1. Організація геному 3-х груп тешо-, ентеровірусів свиней [16].

свиней, довжина яких становить приблизно 450 нуклеотидів, належать до різних типів: тешовірусів – до II типу (подібні вірусу ящуру) [18], ентеровірусів свиней А – до IV типу (подібні вірусу гепатиту С) [19], ентеровірусів В –до I типу (подібні ентеро- і риновірусам людини) [16].

РНК містить одну протяжну рамку зчитування, що кодує поліпептидний ланцюг. Цей поліпротеїн розщеплюється ще в процесі трансляції, і повноцінний білок зазвичай не утворюється. Білкові попередники Р1, Р2, Р3 розщеплюються далі на 4, 3 і 4 кінцеві продукти відповідно [20].

Сегменти 1А, 1В, 1С та 1D кодують субодиниці білкової оболонки (протомеру), а ділянки $2A_{pro}$ і $3C_{pro}$ – вірусоспецифічні протеази [13, 20], які приймають участь у більшості актів розщеплення поліпротеїна (на малюнку ділянки розщеплення позначені стрілками) [16]. Розщеплення сайту 1А-1В в ході дозрівання вірусу відбувається невідомою на сьогоднішній день протеазою (на малюнку позначено знаками питання). Продукт $3D_{pol}$ – фермент, здатний подовжувати ланцюг РНК на РНК-матриці [13]. Сегмент 3В кодує геномзв'язаний білок VPg [20].

У роботі Zell R. et al. [21] показано результати конструювання праймерів для виявлення РНК ентеровірусів свиней I-III груп у зворотно транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ ПЛР). Автори запропонували 3 пари праймерів для ампліфікації консервативних послідовностей в області 5'-NTR та $3D_{pol}$. Перевірка референтних штамів тешовірусів та ентеровірусів А й В, а також польових ізолятів продемонструвала високу специфічність методу.

Palmquist J.M. et al. [22] використали ПЛР для детекції тешовірусів та ентеровірусів свиней II типу. Дослідженнями Jimenez-Clavero M. A. et al. [23] показано, що з використанням ПЛР можна виявити 92 фг РНК тешовірусів. Аналіз результатів ПЛР, описаний у роботі Pogranichniy R. et al. [24], підтвердили припущення, що етіологічним агентом спалаху поліоенцефаломієліту на свинофермі у штаті Індіана (США) був ентеровірус свиней, який віднесено до I групи. В 2003 році вперше ізольовано й охарактеризовано з використанням ПЛР тешовірус свиней першого серотипу на території Китаю [25]. Yamada M. et al. [26] з використанням ПЛР довели, що причиною спалаху ентеровірусного енцефаломієліту в Японії в 2002 році став тешовірус свиней.

La Rosa G. et al. [27] запропоновано новий підхід для молекулярної диференціації тешовірусів і ентеровірусів В свиней. При дослідженні 33 польових ізолятів, виділених на території Італії, та 10 референтних штамів були підібрані праймери, найбільш придатні для діагностики.

У роботі Kaku Y. et al. [28] описано стратегію молекулярної ідентифікації тешовірусів свиней, яка базується на ПЛР і полегшує епідеміологічне вивчення тешовірусної інфекції.

На сьогоднішній день в Україні діє тривіальна класифікація ентеровірусів свиней [29], яка не передбачає розподіл вірусів на роди. На думку її авторів між

ентеровірусами свиней відсутня різниця за фізико-хімічними властивостями та типом ЦПД [30]. Однак, структура геному вітчизняних штамів не вивчалася.

Отже, існує нагальна необхідність порівняльного вивчення еталонних штамів тешо-, ентеровірусів свиней і типових штамів ентеровірусів свиней, за вітчизняною класифікацією, з метою приведення у відповідність до міжнародних вимог.

Для цього з Інституту вірусної діагностики ім. Ф. Леффлера Федерального центру вірусних хвороб тварин Німеччини нами отримано 20 еталонних штамів тешо-, ентеровірусів свиней (табл. 1). Проводяться дослідження штамів тешо-, ентеровірусів свиней, виділених на території України, в порівнянні з еталонними вірусами з використанням традиційних і молекулярно-генетичних досліджень.

Таблиця 1. Еталонні штами тешо-, ентеровірусів свиней

Рід	Вид	Серотип	Назва штаму
Teschovirus	Porcine Teschovirus	1	Talfan, Teschen 199, Tirol, DS1520/93
		2	T80, O 3b
		3	O 2b
		4	PS 36
		5	F 26
		6	PS 37
		7	F 43
		8	UKG 173/74, DS 805/92
		9	VIR 2899/84
		10	VIR 460/88
		11	Dresden
Enterovirus	Porcine Enterovirus A	8	V 13, Potsdam 5116
	Porcine Enterovirus B	9	UKG 410/73
		10	LP 54

Комп'ютерним аналізом геномів референтних штамів та польових ізолятів тешо-, ентеровірусів свиней визначено консервативні ділянки, одержано 3 пари праймерів, які були використані при конструюванні діагностичних засобів на основі ЗТ ПЛР. Проводяться дослідження еталонних та українських штамів тешо-, ентеровірусів свиней у ЗТ ПЛР з наступним сіквенс-аналізом ампліфіконів.

Таким чином, найближчим часом практиці ветеринарної медицини буде запропоновано сучасну тест-систему на основі полімеразної ланцюгової реакції.

Список літератури

1. Trefny, L. Massenerkangungen von Sweinen in Teschener Lend // Zverolek. Obzor. – 1930. – P. 253-236. ***2.*** Романенко, В.Ф., Сорока, В.И. Особенности эпизоотологии энзоотического энцефаломиелита (болезни Тешена) свиней // Общая эпизоотология: иммунологические, экологические и методологические проблемы: Зб. наук. праць – Харьков, 1995. – С. 92-95. ***3.*** Романенко, В.П. Хвороба Тешена. – К.: „Урожай", 1974. – 80 с. ***4.*** Романенко, В.Ф., Полевик, Е.И. Этиология энтеровирусного гастроэнтерита свиней // Ветеринария. – 1992. – № 3. – С. 29-30. ***5.*** Бокун, А.А., Бабич, Н.В., Пинчук, И.Н. Циркуляция штамов энтеровирусов в очагах заболевания свиней пневмонией // Мікробіологічний журнал. – 1994. – № 5. – С.67. ***6.*** Этиология энзоотической пневмонии свиней / Романенко В.Ф., Бокун А.А., Бабич Н.В. и др. // Ветеринария. – 1988. – № 2. – С. 35-37. ***7.*** Porcine reproductive failure associated with a newly identified „SMEDI" group of picornavirus / Dunne H.W., Gobble J.F., Hokanson D.C. et al. // Am. J. Vet. Res. – 1965. – № 26. – P. 1284-1297. ***8.*** Knowles, N.J. The association of group III porcine enterovirus with epithelial tissue // Vet. Rec. – 1988. – Vol. 122. – P. 441-442. ***9.*** Knowless, N.J., Buckley, L.S., Pereira, H.G. Classification of porcine enteroviruses by antigenic analysis and cytopathic effects in tissue culture: desciption of 3 new serotypes // Arch. Virol. – 1979. – V. 62, № 3. – P. 201-208. ***10.*** Grouping of porcine enteroviruses by indirect immunofluorescence and description of two new serotypes / Auerbach J, Prager D., Neuhaus S. et al. // J. Vet. Med. Series B. – 1994. – Vol. 41, № 4. – P. 277-282. ***11.*** Kaku, Y., Yamada, S., Murakami, Y. Sequence determination and phylogenetic analysis of RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of the porcine enterovirus 1 (PEV-1) Talfan strain. // Arch. Virol. – 1999. – Vol. 144. – P. 1845-1852. ***12.*** Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects / Zell R., Dauber A., Krumbholz A. et al. // J. Virol. – 2001. – Vol. 75. – P. 1620-1631. ***13.*** Sequence analysis of a porcine enterovirus serotype 1 isolate: relationships with other picornaviruses / Doherty M., Todd D., McFerran N., Hoey E.M. // J. Gen. Vir. – 1999. – V. 80. – P. 1929-1941. ***14.*** King, A.M.Q., Brown, F., Christian et al. Picornaviridae // Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. et al. Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. – New-York; San Diego: Academic Press, 2000. – P. 657-673. ***15.*** Kaku, Y., Sarai, A., Murakami, Y. Genetic re-

classification of porcine enteroviruses // J. Gen. Virol. – 2001. – Vol. 82. – P. 417-424. ***16.*** Sequencing of porcine enterovirus group II and III reveals unique features of both virus groups / Krumbholz A., Dauber M., Henke A. et al. // J. Virology. – 2002. – Vol. 76, № 11. – P. 5813-5821. ***17.*** Агол, В.И. Трансляционный контроль фенотипа пикорнавирусов // Молекулярная биология. – 2001. – Т. 35, № 4. – С. 691-701. ***18.*** Unique characteristics of a picornavirus internal ribosome entry site from the Porcine teschovirus-1 Talfan / Kaky Y., Chard L. S., Inoue T., Belsham G. J. // Journal of Virology. – 2002. – Vol. 76, № 22. – P. 11721-11728. ***19.*** Functional and structural similarities between the internal ribosome entry sites of Hepatitis C virus and Porcine teschovirus, a Picornavirus / Pisarev A. V., Chard L. S., Kaku Y., Johns H.L., Shatsky I.N., Belsam G. J. // Journal of Virology. – 2004. – Vol. 78, № 22. – P. 4487-4497. ***20.*** Linkage map of protein-protein interactions of Porcine teschovirus / Zell R., Seitz S., Henke A. et al. // J. Gen. Virol. – 2005. – Vol. 86, № 10. – P. 2763-2768. ***21.*** Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differentiation of CPE groups I-III specific primer sets / Zell R., Krumbholz A., Henke A. et al. // J. Virol. Methods. – 2000. – Vol. 88, № 2. – P. 205-218. ***22.*** Detection of porcine teschovirus type II by reverse transcription-polymerase chain reaction / Palmquist J.M., Munir S., Taku A. et al. // J. Vet. Diagn. Investing. – 2002. – № 14. – P. 476-480. ***23.*** Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water / Jimenez-Clavero M.A., Fernandez C., Ortiz J.A. et al. // Appl. Environment Microbiology. – 2003. – Vol. 69, № 10. – P.6311-6315. ***24.*** A prolonged outbreak of polioencephalomyelitis due to infection with a group I porcine enterovirus / Pogranichniy R.M., Janke B.H., Gillespie T.G., Yoon K.J. // J. Vet. Diagn. Invest. – 2003. – Vol. 15, № 2. – P. 191-194. ***25.*** Isolation and molecular characterization of a Porcine teschovirus 1 isolate from China / Feng L., Shi H.Y., Lui S.W. et al. // Acta Virol. – 2007. – Vol. 51, № 1. – P. 7-11. ***26.*** Enterovirus encephalomyelitis in pigs in Japan caused by porcine teschovirus / Yamada M., Kozakura R., Ikegami R. et al. // Vet. Rec. – 2004. – Vol. 155. – P. 304-306. ***27.*** Validation of RT-PCR assays for molecular characterization of porcine teschoviruses and enteroviruses / La Rosa G., Muscillo M., Di Grazia A. et al. // J. Vet. Med B Infect. Dis. Vet. Public Health. – 2006. – Vol. 53, № 6. – P. 257-265. ***28.*** Antigenic properties of porcine teschovirus 1 (PTV-1) Talfan and molecular strategy for serotyping of PTVs / Kaku Y., Murakami Y., Sarai A. et al. // Arch. Virol. – 2007. – Vol. 152-155. – P. 929-940. ***29.*** Классификация энтеровирусов свиней / Романенко В.Ф., Прусс О.Г., Бабич Н.В. и др.// Вісник аграрної науки. – 1993. – № 1. – С.94-101. ***30.*** Романенко В.П. Молекулярно-генетична ідентифікація ентеровірусів свиней // Вісник аграрної науки. – 2009. – № 1. – С. 30-35.

MODERN ASPECTS OF TESCHOVIRUS SWINE DISEASES DIAGNOSTICS WITH THE USE OF MOLECULAR-GENETIC METHODS

Derevyanko S.V., Bova T.O., Soroka V.I.

Institute of Agricultural Microbiology of UAAS, Chernihiv, Ukraine

The analysis of literature on porcine tescho-, enterovirus genome structure and on elaboration of diagnostic techniques of teschovirus diseases by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT PCR) is given in the article. We analyzed conserved sequences of porcine tescho-, enterovirus genome to which specific primer pairs were designed. A domestic test-system based on PT PCR is being created.

УДК 619:636.1:663.49

СТАН МІНЕРАЛЬНОГО ОБМІНУ В ОРГАНІЗМІ ВИСОКОПРОДУКТИВНИХ КОРІВ ПІВДЕННОЇ ГЕОХІМІЧНОЇ ЗОНИ УКРАЇНИ

Долецький С.П., кандидат ветеринарних наук, доц.

Українська академія аграрних наук

Вивчено основні морфологічні та клініко-біохімічні показники, сучасний стан мінерального обміну в організмі високопродуктивних корів південної геохімічної зони України. Виявлено та проаналізовано найбільш розповсюджені хвороби у лактуючих корів, які спричинені порушенням мінерального обміну речовин.

Ґрунти південної геохімічної зони України (Миколаївська, Херсонська, Дніпропетровська, Запорізька, Донецька, Луганська, Автономна республіка Крим, південні райони Харківської, а також південні та центральні райони Одеської та Кіровоградської областей) характеризуються більшою забезпеченістю рухомими формами макро- та мікроелементів порівняно із західною та північно-східною геохімічними зонами. Однак, в більшості районів цієї зони відмічають нестачу біогенних форм цинку, кобальту, а в деяких місцевостях (райони Херсонської області та Автономної республіки Крим) виявлено надлишок марганцю. Надлишок бору відмічено головним чином у солонцях і солончаках Генічеського району Херсонської області [1,3,4].