

микроорганизмов к антибактериальным препаратам [Текст] / А.В. Авдеева // Лаб. диагностика. – 1998. – № 3 (5). – С. 36–38. 6. Сидоренко, С.В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам [Текст] / С.В. Сидоренко, В.И. Тишков // Успехи биол. химии. – 2004. – Т. 44. – С. 263–306. 7. Особенности применения антибиотиков в ветеринарной практике [Электронный ресурс]. – Режим доступа : URL: <http://www.vetorg.ru/articles/item-39.html>. – Заглавие с экрана. 8. Проблема антибиотикорезистентності у ветеринарній медицині [Текст] / М. Косенко [та ін.] // Вет. медицина України. – 2005. – № 1. – С. 38–39.

## SENSITIVITY OF AGENTS OF BACTERIAL INFECTIONS OF PIGS AND TURKEYS TO SOME ANTIBIOTICS

**Pasun'kina M.A., Onishchenko N.G.**

*Crimean Experimental Station of the NSC "IEVM", Simferopol*

*In the article there are presented the results concerning detection of sensitivity of the isolated cultures of microorganisms from pigs and turkeys to commonly used antibiotics. Analysis of the results has shown that the most of the cultures of isolated microorganisms were not sensitive to the antibiotics studied, with the exception of ceftriaxone, gentamicin and neomycin.*

УДК 619:636.1

## КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСУ ГЕРПЕСУ ДРУГОГО ТИПУ, ЙОГО КОНЦЕНТРУВАННЯ ТА КРІОКОНСЕРВУВАННЯ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР

**Радзиховський М.Л.**

*Житомирський національний агроекологічний університет, м. Житомир*

Герпесвірусна інфекція поширена серед людей і тварин. До родини герпесвірусів належать віруси, які вражають центральну нервову систему (енцефаліт, мієліт, енцефаломієліт), органи зору (кератит, кератокон'юнктивіт), слизові оболонки ротової порожнини (стоматит) і шкіряний покрив (екзема, везикулярний дерматит). За сучасною класифікацією родина *Herpesviridae* поділяється на підродини  $\alpha$ ,  $\beta$  та  $\gamma$  *herpesvirinae* [1, 2].

Патогенний потенціал герпесвірусної інфекції коней другого типу ГВК-2 на сьогоднішній день повністю не з'ясований, але результати серологічних досліджень вказують, що більшість коней є вірусоносіями даного типу. Даний вірус зазвичай виявляють в крові клінічно здорових лошат і в секретах дихальних шляхів молодняку з ознаками захворювання дихальних шляхів. Літературні дані свідчать, що найбільш розповсюджена респіраторна форма прояву герпесвірусної інфекції [3, 4].

Культури клітин і тканин отримали в останній час широке розповсюдження майже в усіх галузях біології. Використання культур клітин тварин з суто експериментальної процедури перетворилось в технологічний компонент багатьох біологічних досліджень і виробничих процесів. Виникли нові підходи, які забезпечують розширення галузі застосування та стандартизацію [5, 6].

В Україні лабораторна діагностика ГВК-2 проводиться на досить низькому рівні. Не в повній мірі вивчена епізоотологічна ситуація щодо розповсюдженості даної патології в різних регіонах, відсутні профілактичні заходи [7, 8]. У зв'язку із викладеним, удосконалення лабораторних методів діагностики герпесвірусної інфекції у коней другого типу з використанням культур клітин, які можна використовувати як депо накопичення культурального антигену, є надзвичайно актуальним питанням ветеринарної науки і практики.

**Метою роботи** було вивчення та визначення оптимального методу кріоконсервування культур клітин, їх використання для культивування й накопичення культуральної вірусмісної рідини її концентрування з визначенням оптимальної концентрації для серо-діагностики.

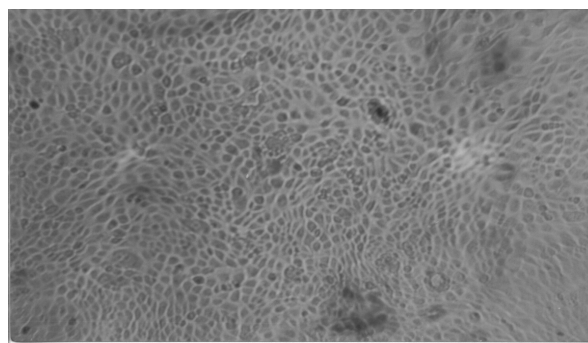
**Результати досліджень.** Робота виконувалася на факультеті ветеринарної медицини, у навчально-дослідній лабораторії кафедри мікробіології, вірусології та епізоотології Житомирського національного агроекологічного університету.

Для культивування герпесвірусу другого типу використовували такі культури клітин, як фібробласти шкіри коня та трахеї теляти. Для культивування перещеплюваної культури фібробластів шкіри коня (Рис. 1) використовували ростове середовище, до складу якого входили середовище Ігла або MEM – 90 %, 10 % ембріональної сироватки та антибіотики.

Для культивування культури трахеї теляти (Рис. 2) використовували ростове середовище такого складу: ГЛА + середовище 199 + 10 % сироватки великої рогатої худоби та 4 %-ний гентаміцин з розрахунку 1 см<sup>3</sup> на 500 см<sup>3</sup> середовища.



**Рис. 1.** Стан перещеплюваної культури фібробластів шкіри коня (x120) – 48 годин



**Рис. 2.** Стан перещеплюваної культури ТТ (x120) – 72 години

Маточні культури пересівали з інтервалом 3–4 доби. Для культивування використовували матраци об'ємом 100, 250 та 500 см<sup>3</sup>. При пересіві культури застосовували розчин трипсин-версену у співвідношенні 1:2 та антибіотик. Коли у матраці формувалася моно-

шар клітин на 80–90 % проводили її зараження. На культурі фібробластів шкіри коня під дією ГВК-2 ЦПД проявлялась на 6–7 добу, а на культурі трахеї теляти під дією ГВК-2 ЦПД проявлялась на 7–9 добу, супроводжувалось таким ефектом, який характеризується декількома типами, а саме аглютинація, вакуолізація та руйнація.

Через 10 діб культивування тричі переморожували культуральну вірусовмісну рідину в умовах морозильної камери (-30 °C) і піддавали концентруванню методом зворотного діалізу.

Діалізний мішок з вірусовмісним матеріалом засипали ПЕГом з розрахунку 12 % від об'єму і залишали на 16 год. Після цього вірусовмісний матеріал зливали та визначали ступінь концентрування в РГА для визначення титрів гемаглютининів і подальшого його використання в реакції дифузної преципітації (РДП).

**Таблиця 1 – Результати визначення робочої дози (концентрації) антигену для постановки РДП**

Концентрування ГВК-2 в	Результат через год.			
	24	48	72	96
1:100	±	±	±	-
1:80	±	±	±	-
1:60	+	+	+	±
1:30	+	+	+	+
1:20	±	+	+	±
1:10	-	-	±	-

Як видно з даних таблиці 1, придатним до постановки РДП є антиген, концентрований від 1:60 до 1:20. З практичної точки зору найраціональніше використовувати антиген, концентрований у 20 разів.

Реакції дифузної преципітації ставили по загально прийнятій методиці.

Культури клітин часто необхідно законсервувати, щоб мати запас клітин із певною біологічною характеристикою.

Для підтримання культур клітин періодично проводили їх кріоконсервування за допомогою морозильної камери – (-30 °C). Процес кріоконсервування здійснювали за урахуванням модифікацій Галатюка О.Є. при власному удосконаленні за такою схемою:

- відбирали матраци з 100 %-ним моношаром клітин;
- ростове середовище зливали, моношар промивали розчином версену з попередньо доданим до нього антибіотиком пролонгованої дії. Потім до матрацу (об'ємом 1500 см<sup>3</sup>) вносили 30–40 см<sup>3</sup> розчину трипсин-версену у співвідношенні 1:3 і матрац ставили у термостат за температури 37,5 °C на 5–10 хвилин. Періодично візуально контролювали процес відставання клітин від стінок матраца. Після цього частину розчину трипсин-версену зливали, лишаючи 15–20 см<sup>3</sup> і, інтенсивно струшуючи матрац, одержували суспензію клітин;
- суспензію клітин розливали по 5–7 см<sup>3</sup> у стерильні пробірки на 20 см<sup>3</sup>, куди додавали 5–7 см<sup>3</sup> поживного середовища 25 % сироватки ВРХ;
- пробірки центрифугували при 200 g 10 хвилин і надосадову рідину зливали;
- до осаду клітин додавали 1–1,5 см<sup>3</sup> кріозахисного середовища такого складу: ДМСО – 10 %, поживне середовище – 40 %, сироватка ВРХ – 50 %;
- суспензію клітин з кріозахисним середовищем розфасовували в стерильні пробірки по 10–15 см<sup>3</sup>;
- режим заморожування: розфасовану суспензію клітин витримували за температури 4 °C протягом однієї години, потім при – 10 °C також одну годину, при – 18 °C – 30 хвилин, а після цього закладали в морозильну камеру за температури – 30 °C;
- при необхідності пробірки з замороженою суспензією клітин доставали і поміщали до водяної бані за температури 37,5 °C протягом 1–2 хв. При легкому струшуванні. Потім проводили підрахунок, визначали життєздатність клітин, їх концентрацію і засівали у флакони об'ємом 250 см<sup>3</sup>.

Через 30–45 діб пробірки із замороженою суспензією клітин розморожували, засівали у матраци об'ємом 250 см<sup>3</sup> і відмічали їх життєздатність після консервування (дані представлені в таблиці 2.).

**Таблиця 2 – Залежність формування 100 % моношару клітин ТТ від тривалості їх консервування**

Перебування у кріоконсервованому стані (діб)	Час формування 100 % моношару (годин)
30	48 – 72
45	48 – 72
60	96 – 120
75	96 – 120
90	120 – 144
105	Клітини моношару не формували

З даних таблиці 2 видно, що життєздатність клітин при їх кріоконсервуванні зберігалась впродовж 3-х місяців.

Застосування таких методичних підходів дозволяло нам у літній період зберігати суспензію клітин трахеї теляти в кріоконсервованому стані протягом 3-ох місяців.

**Висновки.** Для культивування вірусу герпесу другого типу з метою одержання максимальної його кількості краще застосовувати перещеплювану культуру клітин трахеї теляти.

Оптимальним методом концентрації культурального антигену з вмістом вірусу герпесу другого типу є метод зворотного діалізу.

При використанні представленого методу кріоконсервування життєздатність клітин зберігалась впродовж 3-х місяців

**Перспективи досліджень.** Подальша робота буде направлена на проведення моніторингових досліджень щодо розповсюдження герпесвірусної інфекції другого типу на території України, удосконалення існуючих і розробку нових методів діагностики даної патології.

#### Список літератури

1. Сюрин, В.Н. Диагностика вирусных болезней животных [Текст] : справ. / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. – М. : Агропромиздат, 1991. – С. 197–209.
2. Алексеенкова, С.В. Лабораторная модель для оценки иммуногенности вакцин против ринопневмонии лошадей [Текст] : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 16.00.03 / С.В. Алексеенкова. – М., 2007. – 29 с.
3. Browning, F. Equine herpesvirus 2 and 5 (equine gammaherpesviruses) and asinine herpesvirus 2 infections [Text] / F. Browning, C.T. Agius // Chapter 4, in Virus Infections of Equines / ed. M.J. Studdert. – Amsterdam : Elsevier, 1996. – P. 44–47.
4. Distribution and relevance of equine herpesvirus type 2 (EHV2) infections [Text] / K. Borchers [at al.] // Arch. Virol. – 1997. – Vol. 142. – P. 917–928.
5. Official site of O.I.E. [Electronic resource]. – Access mode : [http://www.oie.int/eng/en\\_index.htm](http://www.oie.int/eng/en_index.htm). – Title from the screen.
6. Культивування клітин і тканин тварин [Текст] / Л.П. Дьяконов [та ін.]. – Ставрополь, 1986. – 95 с.
7. Галатюк, О.Є. Заразні хвороби коней [Текст] / О.Є. Галатюк. – Житомир : Волинь, 2003. – 273 с.
8. Герпесвирусные инфекции [Текст] // Болезни лошадей, современные методы лечения / Э. Робинсон. – М., 2007. – С. 66–70.

## CULTIVATION OF HERPESVIRUS THE SECOND TYPE HIS CONCENTRATION AND CRYOPRESERVATION CULTURES CELL

Radzikhovskiy M.L.

Zhytomyr National Agroecological University, Zhytomyr

*In the article information is presented about the use of cultures of cages for cultivation of herpesviridae infection of horse of the second type, methods of his concentration for the use last in serum reactions. The method of cryopreservation of cultures of cages is described with the maintainance of their cell properties.*

УДК 636.2:578

## ОСОБЛИВОСТІ ПАСАЖУВАННЯ ВІРУСУ ПАРАГРИПУ-3 НА ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ КУЛЬТУРАХ КЛІТИН

Романішина Т.О.

Житомирський національний агроекологічний університет, м. Житомир

У всьому світі, у тому числі й в економічно розвинутих країнах, втрати від інфекційних респіраторних захворювань молодняку дуже великі [2, 6]. В Україні та в країнах ближнього зарубіжжя проблема респіраторних захворювань телят займає одне з перших місць серед патологій сільськогосподарських тварин. За даними Апатенко В.М., Петрова О.Г., Глотова А.Г. захворюваність на гострі респіраторні хвороби у великих тваринницьких господарствах може досягати 80,0 % та більше від сприйнятливої поголів'я, смертність – 12,0–18,0 % та вище [1, 7, 8].

Ряд вчених вважають, що основну роль при виникненні спалахів первинних пневмоній у молодняку ВРХ відіграють віруси, найчастіше за все парагрипу-3, інфекційного ринотрахеїту та респіраторно-синцитіальний, рідше адено-, корона-, торо-, рео-, парвовірусів, а також, збудники вірусної діареї та грипу [4, 6, 8]. Віруси інфекційного ринотрахеїту та вірусної діареї хоч і займають другі місця після родини *Paramyxoviridae* – збудників парагрипу-3 за ступенем розповсюдженості, однак вони здатні викликати в польових умовах самостійну інфекцію [1, 7].

Тканинні культури вже давно знайшли своє застосування для вирішення питань біології та медицини. Культивування вірусів допомагає вирішити ряд теоретичних проблем, пов'язаних з вивченням особливостей взаємодії «вірус-клітина». Крім того, вирішення концепцій, пов'язаних з діагностикою та виробництвом препаратів для профілактики вірусних інфекцій неможливо без накопичення вірусомісної сировини. Масове вирощування клітин у культурі є центральною ланкою технологічного процесу виробництва вірусних препаратів. Ефективність технології отримання вірусної сировини залежить від використання штаму вірусу, клітинної системи, способу накопичення біомаси клітин і вірусу. У ННЦ «ІЕКВМ» розроблено «Набір для діагностики парагрипу-3 великої рогатої худоби в реакції затримки гемаглютинації». Зусилля дослідників спрямовані на максимальну реалізацію потенціалу клітин шляхом забезпечення умов їх культивування *in vitro*, наближених до умов *in vivo* [3, 5].

Диференційна діагностика вірусних хвороб з проявом респіраторного синдрому можлива завдяки серологічним реакціям. Проведення останніх можливе за наявності специфічних діагностиків, до складу яких входять штучні антигени та контрольні сироватки.

**Метою роботи** було виготовлення експериментальних серій антигену для діагностики парагрипу-3, шляхом адаптації вірусу ПГ-3 до культур клітин трахеї теляти та тестикулів поросяти.

**Матеріали та методи.** Робота виконувалася на факультеті ветеринарної медицини, в навчально-дослідній лабораторії кафедри мікробіології, вірусології та епізоотології Житомирського національного агроекологічного університету.

Для досліджень використовували штаму вірусу ПГ-3 «М-87», отриманий в регіональній державній лабораторії ветеринарної медицини. Накопичення вірусу проводили на перещеплюваних культурах трахеї теляти (ТТ) та тестикулів поросяти (ТП), культивування яких проводили стаціонарним способом: культуру трахеї теляти на ростовому середовищі такого складу – 45 % середовище Ігла, 45 % середовище 199, 10 % сироватки великої рогатої худоби та гентаміцин (10 мкг/см<sup>3</sup>), культуру тестикулів поросяти на середовищі такого складу – 90 % середовище 199, 10 % сироватки великої рогатої худоби та гентаміцин (10 мкг/см<sup>3</sup>) до формування суцільного моношару. Через 2–3 доби після пересіву формувалася 90–100 % моношар, який використовували для зараження (рис. 1, 2).

Досліджувані культури заражали штамом вірусу ПГ-3 «М-87». При цьому ростове середовище зливали. Моношар промивали версеном з гентаміцином і вносили 5 см<sup>3</sup> з 100 ТЦД<sub>50</sub> вірусу на 200 см<sup>2</sup> матрас, ставили в термостат при 37,5 °С на 40–60 хвилин і періодично через кожні 10 хв 3–4 рази повільно омивали моношар клітин вірусним матеріалом. Через годину інокулянт видаляли і в матрас вносили середовище аналогічне до ростового, але без додавання сироватки [5]. Сформували дві дослідні групи з двох заражених вірусом культур – по п'ять матрасів на кожну культуру і по три матраси для контролю (дві контрольні групи). Усі матраси інкубували при 37,5 °С протягом 8 діб. Щоденно зараженні культури продивлялись візуально та під мікроскопом. Паралельно з зараженими культурами вели спостереження за контрольними незараженими матрасами. По мірі максимального прояву цитопатогенної дії (ЦПД) вміст дослідних матрасів 2 рази переморожувалось за температури -18 °С і розморожувалось при кімнатній температурі (з метою підвищення виходу вірусу з клітин) та перевірялась гемаглютинуюча активність вірусу в реакції гемаглютинації (РГА) з еритроцитами морської свинки.