

УДК 619:578.835.1

**ПІДБІР ЧУТЛИВИХ БІОЛОГІЧНИХ МОДЕЛЕЙ ДО ВІРУСУ ДІАРЕЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ
IN VITRO ТА ЇХ ОПТИМІЗАЦІЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ПЕРВИННОГО ТЕСТУВАННЯ
ПРОТИВІРУСНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИН**

Клестова З.С.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів,
м Київ, e-mail: zklestova@yandex.ua

Дремух Ю.Ю.

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

У статті представлені результати досліджень нових біологічних моделей (культур клітин тварин) та перспективність їх подальшого використання у ветеринарній вірусології для вивчення антивірусних властивостей хімічних речовин in vitro.

Ключові слова: вірус діареї великої рогатої худоби, культури клітин, титр вірусу, штам «BUG-04».

У системі ведення тваринництва особливу увагу приділяють захисту від інфекційних хвороб. Однією із найбільш розповсюджених вірусних хвороб є вірусна діарея ВРХ.

Вірусна діарея – хвороба слизових оболонок (ВД-ХС) – контагіозне захворювання, що викликає РНК-вмісний вірус, розповсюджене у всьому світі в популяції великої рогатої худоби (ВРХ).

Захворювання вперше було зареєстровано Олофсоном у 1946 році в США під назвою «хвороба слизових оболонок великої рогатої худоби». У 1961 році Гілlestі виділив та ідентифікував збудника хвороби – вірус Орегон С-24. В Україні захворювання вперше було зареєстроване в 1965 році. Хвороба поширена в багатьох країнах Європи, Америки, Африки та Австралії. Результати проведеного аналізу свідчать про значне розповсюдження його в економічно розвинених країнах, у тому числі Європи та Америки. Так, наприклад, ВД поширена в Європі (35 країн) та Америці (26 країн). Стаціонарно неблагополучні щодо діареї великої рогатої худоби Австралія та Нова Зеландія. За даними МЄБ, для боротьби з вірусною діареєю досить широко використовують вакцинацію тварин. У 1996 році щеплення проти вірусної діареї застосовували у 15 країнах, а у 2004 році – кількість країн збільшилась до 22, що свідчить про зростання уваги у світі до цього захворювання.[1].

Економічні збитки, що завдає вірусна діарея, обумовлені тривалою персистенцією збудника та його здатністю викликати імуносупресію, що сприяє розвитку інших інфекційних хвороб і змішаних інфекцій. Найбільш характерними та економічно вагомими наслідками даного вірусного захворювання для тваринництва являються проблеми, пов'язані з репродуктивною системою та хворобами респіраторного тракту. Значну небезпеку становлять тварини-вірусоносії з хронічним і латентним перебігом хвороби, у клітинах лімфоїдної тканини яких вірус може персистувати від 120 до 200 діб.

Збудник захворювання відноситься до роду *Pestivirus* родини *Flaviviridae* та існує у вигляді двох біотипів: цитопатогенного та нецитопатогенного, а також – двох генотипів [2]. Штами першого генотипу, включають 11 субгенотипів, поширені у всьому світі [3]. Другий генотип вірусу діареї ВРХ представлений двома субгенотипами та виділяється від хворих тварин значно рідше [4].

З епізоотологічної точки зору найбільш небезпечними являються гострі форми захворювання, а також персистентна. Крім того, вірус здатен викликати імунотолерантні ембріональні інфекції, що призводять до народження персистентно інфікованих телят, які є постійним джерелом збудника інфекції в популяції великої рогатої худоби.

Установлено антигенну та імуногенну спорідненість вірусу діареї до вірусу класичної чуми свиней. Вірус діареї репродукується в первинних культурах клітин нирок, легень або селезінки ембріона корови, тестикулах теляти, перещеплюваних культурах селезінки ембріона корови, макрофагах і лімфоцитах. Попередній діагноз на ВД ВРХ встановлюють на основі епізоотичних даних, клінічних ознак, патологоанатомічних змін і гематологічних досліджень. Лабораторну діагностику хвороби проводять комплексно, з використанням різних методів, серед яких виділення вірусу в культурі клітин до теперішнього часу залишається «золотим стандартом» діагностики [4].

Найбільш ефективним методом боротьби з вірусною діареєю залишається вакцинація сприйнятливого поголів'я тварин. На жаль, до останнього часу в Україні не існує впроваджених у виробництво засобів специфічного лікування цієї хвороби.

Мета наших досліджень полягала у підборі оптимальних біологічних моделей для вивчення антивірусних властивостей хімічних речовин *in vitro*, здатних інгібувати інфекційні властивості збудника ВД-ХС, та виявити перспективні для застосування у дослідках на тваринах.

Матеріали та методи. Культивування всіх ліній клітин проводили у суміші поживних середовищ 199 та ДМЕМ (1:1) з додаванням 10 % сироватки крові ВРХ. Для отримання суспензії клітин і подальшого їх пересіву використовували суміш, що складалась з 0,02 % р-ну Версену та 0,25 % р-ну Трипсину (1:5). Всі культури клітин були тестовані на відсутність контамінації мікроорганізмами у тіогліколевому середовищі та МПБ. Моношар клітин вирощували у скляних і пластикових культуральних флаконах

об'ємом 50 см³ та у 96-лункових культуральних планшетах. Інфікували моношар клітин ВНК-21, SK-6, Vero, MA-104, штамом «BUG-04» у дозі 0,02–0,5 ТЦД₅₀/кл. Інфекційну активність визначали титруванням вірусу в культурі клітин за мікрометодом. Титр вірусу розраховували за методикою Ріда та Менча, який виражали у тканинних цитопатогенних дозах (ТЦД₅₀/см³). Проведено дванадцять послідовних пасажів у культурі клітин ВНК-21, десять пасажів у Vero, та шість – у культурі клітин SK-6 із визначенням інфекційної активності штамів вірусів на всіх пасажах. На першу добу після зараження цитопатична дія вірусу проявлялась на 50 %. На другу добу після зараження ЦПД склала 100 %. Отриману вірусомісну рідину відокремлювали від клітинного детриту шляхом центрифугування (3000 об/хв) протягом 5 хв, підготовлений вірусний матеріал титрували у 96-лункових планшетах методом десятикратних розведень, по 150 мкл/лунку.

Результати роботи. Нами проведено цикл робіт з адаптування та культивування вірусу діареї великої рогатої худоби штаму «BUG-04» у перещеплюваних культурах клітин тваринного походження – ВНК-21, SK-6, Vero. Було виявлено, що у різних системах культивування титр інфекційної активності вірусу був різний (від 1,0 до 7,83 lg ТЦД₅₀/см³).

Таблиця 1 – Адаптування вірусу діареї ВРХ до перещеплюваних культур клітин тварин

№ пасажу	Культура клітин	Наявність ЦПД	Час прояву ЦПД, год	Ступінь цитопатичної дії, %	Титр вірусу lg ТЦД ₅₀ /см ³
1	Vero	+	24	25	5,66
2		+	24	25	5,66
3		+	24	75	5,50
4		+	24	100	5,66
5		+	24	100	7,33
6		+	24	100	6,23
7		+	24	100	7,0
8		+	24	100	6,66
9		+	24	100	7,83
10		+	24	100	7,83
1	ВНК-21	+	24	25	1,83
2		+	24	25	2,50
3		+	24	25	2,50
4		+	24	25	4,50
5		+	24	25	5,50
6		+	24	75	5,33
7		+	24	75	6,66
8		+	24	75	7,25
9		+	24	75	7,24
10		+	24	75	7,33
11		+	24	75	7,33
12		+	24	75	7,50
1	SK-6	+	24	25	1,33
2		+	24	25	2,33
3		+	24	75	4,50
4		+	24	75	5,0
5		+	24	75	5,33
6		+	24	75	5,50

Також розпочали адаптування вірусу до клітинної лінії тварин MA-104 (клітини нирки ембріону макаки-резус), провели п'ять послідовних «сліпих» пасажів.

Підібрані чутливі біологічні системи (культури клітин) різного походження для культивування вірусу діареї ВРХ. Слід зауважити, що вірус реплікувався у не гомологічних клітинах і нами був успішно адаптований до них. Про це свідчить підвищення інфекційної активності вірусу протягом процесу послідовного пасажування 6–10–12 пасажів у дослідних культурах клітин (див. дані таблиці).

Висновки. Встановлена чутливість до ВД ВРХ нових біологічних систем *in vitro* (культур клітин тварин – ВНК-21, SK-6, Vero), які дозволяють розширити діапазон досліджень із збудником захворювання.

У культурі клітин ВНК-21 (нирки новонародженого сірійського хом'яка) титр вірусу сягав значення 7,5 lg ТЦД₅₀/см³ через 96 годин.

Визначена найбільш оптимальна (чутлива) до репродукції вірусу діареї ВРХ культура клітин (із досліджуваних) – Vero (клітини нирки африканської зеленої мавпи), в якій вірус досягав титру інфекційної активності 7,83 lg ТЦД₅₀/см³ через 72 години.

Список літератури

1. Годовський О.В. Вивчення імунобіологічних властивостей збудника та розробка інактивованої вакцини проти вірусної діареї великої рогатої худоби: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук : спец. 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія та вірусологія» / О.В. Годовський. – Харків, 2007. – 20.
2. Южаков А. Г. Филогенетический анализ нецитопатогенных изолятов вируса диареи крупного рогатого скота / А. Г. Южаков, Г. И. Устинова А. Г. Готов // Ветеринария. – 2009. №6. – С. 45.

3. Campbell J. R. Effect of bovine diarrhea virus in the feedlot. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2004. 20(1) P. 39-50.
4. Givens M. D. Epidemiology of prolonged testicular with bovine viral diarrhea virus / M. D. Givens, K. P. Riddell, M. A. Edmondson et al. // *Vet. Microbiol.* 2009. Vol. 139 (1-2). P. 42-51.
5. Gregg K. Risk and prevention of bovine viral diarrhea virus(BVDV) transmission through embryo production via somatic cell nuclear transfer (SCNT) using acolytes from persistently infected donors / K. Gregg, K. P. Riddell, S. H. Chen et al. // *Theriogenology.* 2010. Vol. 74 (1). P. 1-10.

SENSITIVE BIOLOGICAL MODELS SELECTION FOR BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS IN VITRO AND THEIR OPTIMIZATION FOR INITIAL TESTING CONDUCTION OF ANTIVIRAL PROPERTIES OF CHEMICAL AGENT

Klestova Z.S.

Institute of Veterinary Medicine of NAAS, Kyiv

Dremuh J.J.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv

Viral diarrhea – a disease of mucous membranes (VD-DM) – contagious disease that causes RNA-containing virus widespread throughout the world in a population of cattle stock. Economic loss that causes viral diarrhea is due to the long-term persistence of pathogen and its capability to cause immunosuppression, which contributes to the development of other infectious diseases and mixed infections.

The purpose of our research: optimal biological models selection for antiviral properties examination of chemical agent in vitro, that is capable to inhibit infectious characteristics of VD-DM pathogen and to find out recommendations for prospective of their application on animals experiments.

Cell lines were cultivated in a mixture of nutrient media 199 and DMEM (1:1) laced with 10% cattle blood serum. Monolayer cell cultivated in glass and plastic culture vials with a volume of 50 cm³ and in 96-alveolate culture plates. Monolayer cells OWC-21, SK-6, Vero were infected by strain of the virus «BUG-04» in a dose of 0,02-0,5 TSD 50/kl.

We have adapted VD-DM strain of «BUG-04» to the passaged cultures of animals cells: OWC-21, SK-6, Vero with increasing of infectious virus activity, that manifested in them differently (virus titer was from 1,0 up to 7,83 lg TSD 50/cm³). It should be noted that the virus was replicated in non-homologous cells and we have successfully adapted it to them.

Thus, it was selected sensitive biological systems of various animal origin for cultivation VD-DM, which allow to extend the range of studies with pathogen of disease. It was established that from investigated cell cultures the most sensitive to reproduction VD-DM is Vero (*kidney cells of African green monkey*), where virus reached a titer of infectious activity 7,83 lg TSD₅₀ /cm³ after 72 hours.

Keywords: virus of diarrhea of cattle stock, cell cultures, virus titer, strain «BUG-04».

УДК 619:615, 371:616. 98:578,825. 15:578. 833. 3:578,831. 1:597,843. 95:636.9

ВИВЧЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ КОМБІНОВАНОЇ ІНАКТИВОВАНОЇ ВІРУС-БАКТЕРІАЛЬНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ, ВІРУСНОЇ ДІАРЕЇ, ПАРАГРИПУ-3 ТА ПАСТЕРЕЛЬОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ НА ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИНАХ

Кучерявенко В.В., Кучерявенко Р.О., Шутченко П.О., Гадзевич О.В., Медвідь К.О.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, e-mail: vkucheriavenko@ukr.net

У статті викладені результати антигенних та імуногенних властивостей вакцини проти інфекційного ринотрахеїту (ІРТ), вірусної діареї (ВД), парагрипу-3 (ПГ-3) і пастерельозу великої рогатої худоби. На лабораторних тваринах, встановлено, що 2-х кратне введення препарату індукує напрацювання специфічних антитіл до вірусів інфекційного ринотрахеїту, вірусної діареї, парагрипу-3 і пастерельозу. Імуногенність вакцини морфологічно підтверджено зростанням кількості та розмірів периартеріальних лімфоїдних муфт селезінки, появою гермінативних центрів розмноження, збільшенням кількості лімфатичних вузликів і дифузної лімфоїдної тканини у кірковій та паракортикальній зонах.

Ключові слова: імунітет, вакцина, інфекційний ринотрахеїт, вірусна діарея, парагрип-3, пастерельоз, гістоморфологія органів імунного захисту.

В умовах сучасного ведення скотарства характерна висока щільність комплектування тварин, що сприяє швидкому розповсюдженню інфекційних хвороб серед поголів'я. При цьому частіше спостерігаються пневмоентерити, котрі наносять значні економічні збитки тваринництву. Провідну роль в етіології пневмоентеритів великої рогатої худоби відіграють збудники вірусної природи: інфекційного ринотрахеїту, парагрипу-3, вірусної діареї та коронавірусу. Одночасне або послідовне інфікування тварин