

ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСУ ПАРАГРИПУ-3 ТА ОТРИМАННЯ АНТИГЕНУ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ РЗГА

Рибачук Ж. В., к. вет. н., доцент
Романишина Т. О., к. вет. н., доцент

Постановка проблеми. 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 і 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. 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 діагностикумів, до складу яких входять штучні антигени та контрольні сироватки.

Аналіз останніх досліджень. У всьому світі, в тому числі і в економічно розвинутих країнах, втрати від інфекційних респіраторних захворювань молодняку дуже великі [2, 6]. В Україні та у країнах ближнього зарубіжжя проблема респіраторних захворювань телят займає одне з перших місць серед патології сільськогосподарських тварин. За даними В.М. Апатенко, О.Г.Петрова, А.Г. Глотова захворюваність на гострі респіраторні хвороби у великих тваринницьких господарствах може досягати 80,0 % та більше від сприйнятливого 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 і респіраторно-синцитіальний, рідше адено-, корона-, торо-, рео-, парво- і ріновірусів, 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 розповсюженості, однак вони здатні викликати в польових умовах самостійну інфекцію [1, 7].

Метою роботи було виготовлення фабричного антигену діагностикуму для парагрипу-3, шляхом адаптації вірусу ПГ-3 до культур клітин трахеї теляти та тестикулів поросяти.

Об'єкт та методика досліджень. Робота виконувалася на факультеті ветеринарної медицини, в навчально-дослідній лабораторії кафедри мікробіології, вірусології та епізоотології Житомирського національного агроекологічного університету.

Для досліджень використовували штаб вірусу ПГ-3 «М-87», отриманий в регіональній державній лабораторії ветеринарної медицини. Ізоляцію вірусу проводили на перещеплювальних 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/см³), культуру тестикулів поросяти на середовищі такого складу – 90% середовище 199, 10% сироватки великої рогатої худоби та гентаміцин (10 мкг/см³) до формування суцільного моношару. Через

2–3 доби після пересіву формувалася 90–100% моношар, який використовували для зараження

Досліджувані культури заражали штамом вірусу ПГ-3 «М-87». При цьому ростове середовище зливали. Моношар промивали версеном з гентаміцином і вносили 5 см³ з 100 ТЦД₅₀ вірусу на 200 см³ матрац, ставили в термостат при 37,5°C на 40–60 хвилин і періодично через кожні 10 хв 3–4 рази повільно омивали моношар клітин вірусним матеріалом. Через годину інокулят видаляли і в матрац вносили середовище аналогічне до ростового, але без додавання сироватки [5]. Сформували дві дослідні групи з двох заражених вірусом культур - по п'ять матраців на кожен культуру і по три матраци для контролю (дві контрольні групи). Усі матраци інкубували при 37,5°C 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) вмістиме дослідних матраців 2 рази переморожувалось при -18°C і розморожувалось при кімнатній температурі (з метою підвищення виходу вірусу з клітин) та перевірялась гемаглютинувальну активність вірусу в реакції гемаглютинації (РГА) з еритроцитами морської свинки.

Результати дослідження. При розмноженні вірусу ПГ-3 у культурах клітин трахеї теляти цитопатичні зміни обмежувались руйнуванням моношару, появою гранульованих або пікнотизованих круглих клітин, які швидко відшаровувались від скла. Дегенеративні клітинні процеси почали виникати в деяких матрасах уже на 2-3-ю добу після зараження. За їх проявом та дією вірусу ми спостерігали візуально, звертаючи увагу на зміну кольору середовищ та деструкцію моношару клітин.

Також, реєстрували мікроскопічно цитопатичну дію вірусу, яка починалася з появи вікон у моношарі і закінчувалася повною деструкцією клітин. Багатоядерні клітини виникали в результаті злиття декількох клітин, а також цитофагії. В їх основі лежить здатність уражених вірусом клітин продукувати особливу речовину – синцитин, який сприяє розплавленню стінок клітин і викликає зближення ядер [3].

У контрольних же зразках лише на 6-у добу в одному матраці з'явилися кілька невеликих вікон з нечіткими межами, у решти двох появу вікон спостерігали із 7-ї доби, що пояснюється старінням культури клітин.

Дослідні та контрольні матраци культури клітин тестикулів поросяти не відрізнялись між собою.

Для одержання вірусу усі матраци із культурами клітин підлягали послідовному триразовому заморожуванню-відтаюванню, що забезпечувало руйнування стінок клітин і вихід вірусу у культуральну рідину. Індикацію наявності вірусу у культуральній рідині проводили за допомогою РГА.

Результати РГА 1-го пасажу вірусу на культурах клітин трахеї теляти і тестикул поросяти представлені у таблиці 1.

Таблиця 1

Результати РГА 1-го пасажу вірусу парагрипу-3

Активність вірусу, ГАО	Культура клітин ТТ, матраси						Культура клітин ТП, матраси					
	1	2	3	4	5	Контроль	1	2	3	4	5	Контроль
4log ₂	3log ₂	3log ₂	4log ₂	4log ₂	-	-	-	-	-	-	-	-

Як видно з таблиці 1, чутливою до ізоляції вірусу парагрипу-3 виявилася культура клітин трахеї теляти, а до культури клітин тестикул поросяти вірус ПГ-3 не адаптувався.

Таким чином, в нашому досліді встановлено, що оптимальною культурою для культивування вірусу ПГ-3, що забезпечує накопичення його у високих титрах, є культура клітин трахеї теляти, що пояснюємо видовим та тканинним тропізмом параміксовірусів.

Висновки:

1. Вірус ПГ-3 зумовлює ЦПД на культурі клітин трахеї теляти на 4-5 добу після зараження, при чому гемаглютинувальна активність вірусу в культуральній рідині реєструвалась на рівні 3-4 log₂.

2. Для культивування вірусу ПГ-3 з метою одержання максимальної його кількості в інфекційному матеріалі для приготування групоспецифічного антигену як біологічний об'єкт краще застосовувати перещеплювальну культуру клітин трахеї теляти.

Використані джерела інформації

1. Апатенко В.М. Проблеми асоційованих інфекцій і шляхи їх вирішення / В. М. Апатенко // Наукова спадщина Луї Пастера і ветеринарна медицина України (до 175- річчя від дня народження Луї Пастера): наук. статті конференції 5-6 лютого 1998 р. – Рівне. – 1998. – С. 34.

2. Галатюк О.Є. Епізоотологічний моніторинг парагрипу-3 великої рогатої худоби / Галатюк О.Є., Рибачук Ж.В. // Науковий Вісник ветеринарної медицини. – Біла Церква. – 2012. – Вип. 9 (92). – С.36–41.

3. Жестеров В.И. Современные аспекты крупно-масштабного культивирования клеточных субстратов и вирусов / Жестеров В.И., Юрков С.Г. // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов. – Покров, 2003. – Ч. 1,2. – С.38–40.

4. Инфекционные болезни животных / Б.Ф. Бессарабов, Е.С. Воронин, А. А. Сидорчука [и др.]; под ред. А.А. Сидорчука. — М.: Колосс, 2007. – 671 с.

5. Калініна О.С. Ветеринарна вірусологія / Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. — К.: Вища освіта, 2004. — 431 с.

6. Мищенко А.А. Особенности респираторных инфекций телят / Мищенко А.А., Гусев Н.А. // Ветеринария. – 2000. – №9. – С.5–6.

7. Острые респираторные вирусные инфекции крупного рогатого скота в Свердловской области / Петрова О.Г., Татарчук А.Т., Сапожникова Н.И. [и др.] // Ветеринария. – 2002. – №2. – С.11–15.

8. Распространение вирусных респираторных; болезней крупного рогатого скота / Глотов А.Г., Петрова О.Г., Глотова Т.И. [и др.] // Ветеринария.- 2003.-№3. – С. 17–21.