

ОСОБЛИВОСТІ ПАСАЖУВАННЯ ВІРУСУ ПАРАГРИПУ-3 НА ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ КУЛЬТУРАХ КЛІТИН

Романішина Т.О.

Житомирський національний агроєкологічний 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 патології 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 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 та респіраторно-синцитіальний, рідше адено-, корона-, торо-, рео-, парво- і рінновірусів, 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 поросятя.

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

Для досліджень використовували штам вірусу ПГ-3 «М-87», отриманий в регіональній державній лабораторії ветеринарної медицини. Накопичення вірусу проводили на перещеплюваних культурах трахеї теляти (ТТ) та тестикулів поросятя (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 поросятя 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 (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 см³ з 100 ТЦД₅₀ вірусу на 200 см³ 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 заражені 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.

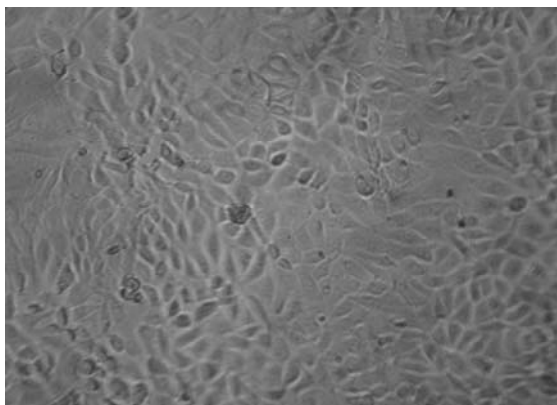


Рис. 1. Моношар КК ТП.

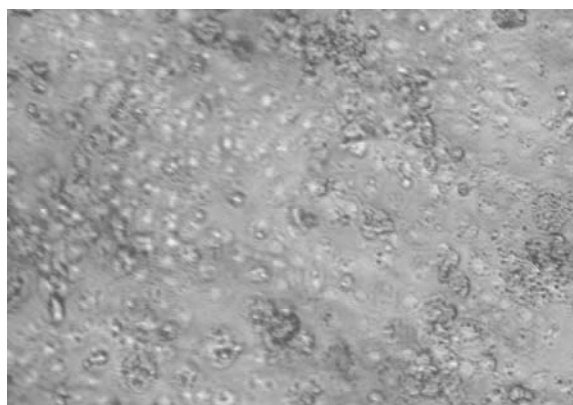


Рис. 2. Моношар КК ТТ.

Результати роботи. 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 (рис. 3).



Рис. 3. Руйнування моношару клітин КК ТТ під дією вірусу ПГ-3

Також, реєстрували мікроскопічно цитопатичну дію вірусу, яка починалася з появи «вікон» у моношарі та закінчувалася повною деструкцією клітин (рис. 4, 5). 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].

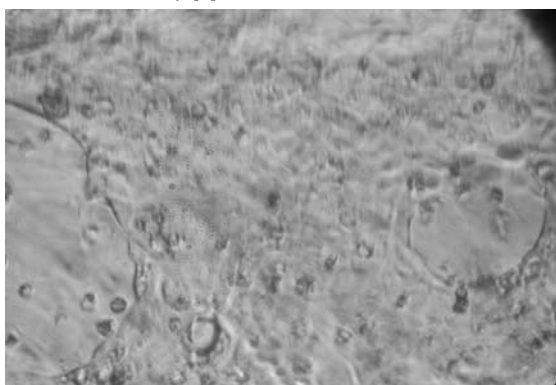


Рис. 4. Моношар КК ТТ на 4-ту добу після внесення вірусу ПГ-3.

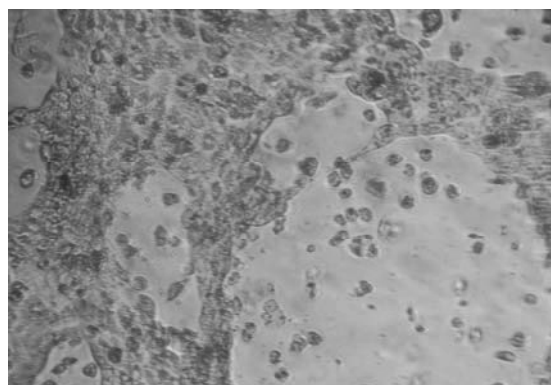


Рис. 5. Моношар на 5-ту добу після вірусу ПГ-3 – злушення моношару

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

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

Для одержання вірусу всі матраси із культурами клітин підлягали послідовному триразовому заморожуванню-відтаюванню, що забезпечувало руйнування стінок клітин і вихід вірусу в 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.

Таблиця – Результати РГА 1-го пасажу вірусу парагрипу-3

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

Як видно з таблиці, 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. Вірус ПГ-3 зумовлює ЦПД на культурі клітин трахеї теляти на 4–5 добу після зараження, при чому гемаглютинуюча активність вірусу в культуральній рідині реєструвалась на рівні 3–4 log₂.

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

Перспективи досліджень. Подальша робота направлена на накопичення вірусомісного матеріалу на перещеплюваній культурі клітин трахеї теляти, підвищення концентрації та активності вірусу парагрипу-3 і створення власних діагностиків для РЗГА та РДП, що дозволить ідентифікувати збудник ПГ-3 серед інших хвороботворних чинників дихальної системи великої рогатої худоби

Список літератури

1. Апатенко, В.М. Проблеми асоційованих інфекцій і шляхи їх вирішення [Текст] / В.М. Апатенко // Наукова спадщина Луї Пастера і вет. медицина України (до 175-річчя від дня народження Луї Пастера) : наук. статті конф. 5-6 лютого 1998 р. – Рівне, 1998. – С. 34. 2. Галатюк, О.Є. Епізоотологічний моніторинг парагрипу-3 великої рогатої худоби [Текст] / О.Є. Галатюк, Ж.В. Рибачук // Наук. вісн. вет. медицини. – Біла Церква, 2012. – Вип. 9 (92). – С. 36–41. 3. Жестеров, В.И. Современные аспекты крупно-маштабного культивирования клеточных субстратов и вирусов [Текст] / В.И. Жестеров, С.Г. Юрков // Вет. и мед. аспекты зооантропонозов. – Покров, 2003. – Ч. 1,2. – С. 38–40. 4. Инфекционные болезни животных [Текст] / Б.Ф. Бессарабов [и др.]; под ред. А.А. Сидорчука. – М. : КолосС, 2007. – 671 с. 5. Калініна, О.С. Ветеринарна вірусологія [Текст] / О.С. Калініна, І.І. Панікар, В.Г. Скибіцький. – К. : Вища освіта, 2004. – 431 с. 6. Мищенко, А.А. Особенности респираторных инфекций телят [Текст] / А.А. Мищенко, Н.А. Гусев // Ветеринария. – 2000. – № 9. – С. 5–6. 7. Острые респираторные вирусные инфекции крупного рогатого скота в Свердловской области [Текст] / О.Г. Петрова [и др.] // Ветеринария. – 2002. – № 2. – С. 11–15. 8. Распространение вирусных респираторных; болезней крупного рогатого скота [Текст] / А.Г. Глотов [и др.] // Ветеринария. – 2003. – № 3. – С. 17–21.

FEATURES OF ISOLATION OF VIRUS OF PARAINFLUENZA-3 ON THE CONTINUOUS CELL CULTURES

Romanishina T.O.

Zhytomyr National Agroecological University, Zhytomyr

Results of own investigations, concerning PF-3 virus strains cultivation, are presented in the article. It has been shown that virus infection activity depends on cell system and cultivation method. Sensible cell system for PF-3 virus reception is calf's trachea cell culture.