



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **38365** (13) **U**  
(51) МПК (2006)  
**A61K 35/66**  
**C12N 1/36**  
**A61D 19/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ГЕНЕТИЧНОГО МАРКЕРУВАННЯ ЕНТЕРОВІРУСІВ СВИНЕЙ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН ВНК-21**

1

(21) u200811493  
(22) 24.09.2008  
(24) 12.01.2009  
(46) 12.01.2009, Бюл.№ 1, 2009 р.  
(72) РОМАНЕНКО ВОЛОДИМИР ПИЛИПОВИЧ,  
УА, ДЕРКАЧ ІРИНА МИХАЙЛІВНА, УА  
(73) ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ  
УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК, УА

2

(57) Спосіб генетичного маркування ентеровірусів свиней, а саме терморезистентності та стійкості до середовищ із різними значеннями рН, який **відрізняється** тим, що генетичне маркування ентеровірусів свиней проводять у культурі клітин ВНК-21/clon13, яка є гетерологічною по відношенню до них.

Запропонована корисна модель належить до галузей біології, генетики та ветеринарної вірусології і може бути використаний при поглибленому вивченні біологічних, генетичних, біотехнологічних властивостей, дає змогу удосконалити лабораторну діагностику ентеровірусних хвороб свиней, зокрема вірусологічні дослідження, сприятиме у своєчасному проведенні профілактичних та лікувальних заходів.

Ентеровіруси свиней (ЕВС) є збудниками особливо небезпечних хвороб свиней ентеровірусної етіології: хвороби Тешена, вірусного гастроентериту, ентеровірусної пневмонії [1-3].

У таксономічному відношенні нині існує 23 серотипи ентеровірусів свиней роду Enterovirus родини Picornaviridae [4-5]. У 1972-1993 роках В.П. Романенко зі співавт. на основі вивчення біологічних, морфологічних, фізико-хімічних та антигенних властивостей вірусів, виділених, на території України, Росії, Молдови, використавши колекцію референтних штамів ЕВС (віднесених у 1971 році Dunne H. et al. до 8 серотипів [6]), що люб'язно була передана у 1971 році доктором Derbyshire (Пірбрайт, Великобританія), доповнили класифікацію Dunne H. et al. [6] 14-ма новими серотипами ентеровірусів свиней [1-5, 7].

Виділення та ідентифікація, а також вивчення генетичних маркерів ентеровірусів свиней проводилися у гомологічних первинних або перещеплюваних лініях клітин нирки ембріону свині [7-10], що у нашому випадку виступає близьким за технічним рішенням аналогом корисної моделі, яка пропонується.

Культурально-морфологічною схожістю на культуру клітин СНЕВ, що широко використовується

ся при генетичному маркуванні ЕВС, характеризується культура клітин ВНК-21 - перещеплювала культура клітин нирки новонародженого хом'ячка. Згідно паспорту якості перещеплюваної лінії клітин Колекції культур клітин для ветеринарної медицини та біотехнології ННЦ "ІВЛВМ", культура клітин ВНК-21/clon13 є чутливою системою для вірусів: псевдосказу, віспи ВРХ, простого герпесу, реовірусу 3, везикулярного стоматиту (Індіана), краснухи, аденовірусу 25, ящуру, Коксаки, сказу, арбовірусів.

Суть корисної моделі в тому, що, виявивши чутливість до ентеровірусів свиней культури клітин ВНК-21/clon13, пропонується спосіб генетичного маркування ентеровірусів свиней на культурі клітин ВНК-21/clon13. Досліджуються виокремлюючі для ЕВС генетичні маркери - терморезистентність і стійкість до середовищ з різними показниками рН - у культурі клітин ВНК-21 в порівнянні з культурою клітин СНЕВ.

У дослідженнях використовували референтні штами ентеровірусів свиней колекції лабораторії генетики і імунології ІВМ УААН (ентеровіруси свиней 1-8-го серотипів англійської колекції, надіслані в 1970 році В.П. Романенку д-ром Derbyshire J. (Pirbright, Великобританія) та 14 нових, класифікованих В.П. Романенком, раніше невідомих, серотипів ентеровірусів, які захищені авторськими свідоцтвами СРСР). Культуру клітин СНЕВ використовували з колекції культур Інституту ветеринарної медицини УААН; культуру клітин ВНК-21/clon 13 - люб'язно передана нам з Колекції культур клітин для ветеринарної медицини та біотехнології ННЦ "ІВЛВМ", м.Харків.

Приклад 1

(13) **U**

(11) **38365**

(19) **UA**

Паралельно у культурах клітин СНЕВ і ВНК-21/cloп 13 вивчали термореzистентність референ-тних штамів ентеровірусів свиней.

Згідно методики Wallis та Melnick, проби віру-сів з 1М MgCl<sub>2</sub> і без 1М MgCl<sub>2</sub> прогрівали при тем-пературі 56°C протягом 60хв. Дослідні проби охо-лоджували на льоду та титрували одночасно з контрольними непрогрітими пробами ентеровіру-

сів. Інфекційну активність визначали методом де-сятикратних послідовних розведень. Титр вірусу обчислювали за методом L. Reed і H. Muehch. За різницею титрів проб вірусів прогрітих у присутно-сті 1М MgCl<sub>2</sub>, без 1М MgCl<sub>2</sub> і непрогрітих проб віру-сів робили висновок щодо термореzистентності ентеровірусів свиней.

Результати досліджень наведені у таблиці 1.

Таблиця

Термостійкість ентеровірусів свиней у культурах клітин СНЕВ та ВНК-21

№ п/п	Назва штаму	Серотип	Культура клітин	Титр ентеровірусів свиней, Іg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>		
				Непрогрітого (конт-рольного)	Прогрітого без 1М MgCl <sub>2</sub>	Прогрітого в присут-ності 1М MgCl <sub>2</sub>
1	Тальфан	1	СНЕВ	9,5±0,25	8,92±0,08	9,17±0,08
			ВНК-21	8,42±0,08	6,09±0,08	8,17±0,08
2	Т 80	2	СНЕВ	9,58±0,08	7,58±0,08	9,08±0,08
			ВНК-21	7,92±0,08	6,92±0,08	7,58±0,08
3	F 34	3	СНЕВ	9,08±0,08	6,42±0,08	8,92±0,08
			ВНК-21	8,17±0,09	7,17±0,17	8,08±0,08
4	F 78	4	СНЕВ	8,59±0,08	7,42±0,08	8,42±0,08
			ВНК-21	8,42±0,08	5,83±0,17	8,42±0,08
5	F 12	5	СНЕВ	8,08±0,08	6,58±0,08	7,42±0,08
			ВНК-21	8,42±0,08	7,58±0,08	8,08±0,08
6	F 7	6	СНЕВ	9,0±0,15	8,42±0,17	8,92±0,08
			ВНК-21	7,92±0,08	7,08±0,08	8,08±0,08
7	V-13	8	СНЕВ	8,33±0,17	7,83±0,17	8,33±0,17
			ВНК-21	4,92±0,08	3,92±0,08	5,08±0,08
8	"Перечинський-642"	1	СНЕВ	8,58±0,08	7,83±0,17	8,33±0,08
			ВНК-21	8,42±0,08	7,08±0,17	8,08±0,08
9	"Березнянський 652"	1	СНЕВ	8,42±0,08	6,42±0,08	8,08±0,08
			ВНК-21	8,67±0,17	5,33±0,17	8,17±0,17
10	M2323	10	СНЕВ	8,83±0,17	8,08±0,08	8,67±0,08
			ВНК-21	6,92±0,08	6,08±0,08	7,08±0,08
11	К 9	11	СНЕВ	8,33±0,17	7,5±0,29	8,42±0,08
			ВНК-21	8,08±0,08	7,08±0,08	7,42±0,08
12	К 22	12	СНЕВ	8,42±0,08	7,42±0,08	8,42±0,08
			ВНК-21	8,42±0,08	7,92±0,08	8,42±0,08
13	Л 90	13	СНЕВ	8,92±0,08	7,42±0,08	8,58±0,08
			ВНК-21	8,08±0,08	7,08±0,08	8,08±0,08
14	М 116	14	СНЕВ	8,58±0,08	7,58±0,08	8,58±0,08
			ВНК-21	8,08±0,08	7,08±0,08	7,58±0,08
15	Ч 73	15	СНЕВ	8,42±0,08	7,08±0,08	8,42±0,08
			ВНК-21	8,08±0,08	7,08±0,08	7,58±0,08
16	Г 95	16	СНЕВ	9,42±0,08	8,42±0,08	8,92±0,08
			ВНК-21	6,92±0,08	6,08±0,08	6,92±0,08
17	Б 111	17	СНЕВ	9,42±0,08	6,08±0,08	8,92±0,08
			ВНК-21	7,08±0,08	6,17±0,08	7,08±0,08
18	Ч 184	18	СНЕВ	8,92±0,08	6,08±0,08	8,92±0,08
			ВНК-21	8,42±0,08	7,17±0,08	8,42±0,08
19	Д 229	19	СНЕВ	8,92±0,22	8,08±0,08	8,58±0,08
			ВНК-21	7,08±0,08	6,42±0,08	6,92±0,08
20	И 249	20	СНЕВ	8,08±0,08	7,42±0,08	7,92±0,08
			ВНК-21	7,42±0,08	6,42±0,08	7,08±0,08
21	П 142	21	СНЕВ	8,42±0,08	7,42±0,08	8,08±0,08
			ВНК-21	6,92±0,08	5,42±0,08	6,08±0,08
22	В 151	22	СНЕВ	9,42±0,08	8,42±0,08	8,92±0,08
			ВНК-21	8,08±0,08	7,08±0,08	7,58±0,08
23	И 393	23	СНЕВ	8,08±0,08	7,92±0,08	8,08±0,08
			ВНК-21	7,08±0,08	5,92±0,08	6,42±0,08

Примітка - М±m, n=3; P<0,05

Згідно даних, наведених у таблиці 1, штам ЕВС без 1М MgCl<sub>2</sub> незначно інактивувались при прогріванні на водяній бані до 56°C протягом 1год, а у присутності 1М MgCl<sub>2</sub> інфекційні титри вірусів

не змінювались порівняно з контрольними, що свідчить про термостійкість використаних у дослі-дах штамів ентеровірусів і стабілізацію віріонів двовалентними катіонами магнію.

Приклад 2  
Паралельно у культурах клітин СНЕВ і ВНК-21/clon13 вивчали стійкість референтних штамів

ентеровірусів свиней у середовищах з різними показниками рН.

Таблиця 2

Стійкість ентеровірусів свиней до середовищ з різними значеннями рН у культурах клітин СНЕВ та ВНК-21

№ п/п	Назваштаму	Серотип	Культура клітин	Титр ентеровірусів свиней, Іg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>		
				Контроль	рН2,0	рН 13,0
1	Тальфан	1	СНЕВ	9,08±0,17	9,08±0,17	9,17±0,08
			ВНК-21	8,05±0,05	7,75±0,25	7,67±0,17
2	Т 80	2	СНЕВ	8,33±0,17	8,17±0,33	8,33±0,17
			ВНК-21	7,83±0,17	7,42±0,08	7,33±0,17
3	F 34	3	СНЕВ	8,17±0,17	7,83±0,17	7,83±0,33
			ВНК-21	7,17±0,17	6,5±0,29	6±0,5
4	F 78	4	СНЕВ	8,83±0,17	8,33±0,17	8,83±0,17
			ВНК-21	8,08±0,08	7,33±0,17	7,17±0,17
5	F 12	5	СНЕВ	8,83±0,17	8,33±0,17	8,42±0,08
			ВНК-21	8,17±0,17	7,33±0,33	7,17±0,17
6	F 7	6	СНЕВ	9,08±0,08	8,67±0,17	8,67±0,17
			ВНК-21	8,17±0,17	6,33±0,33	6,67±0,17
7	V-13	8	СНЕВ	7,67±0,17	7,33±0,17	7,67±0,17
			ВНК-21	5,33±0,33	5,33±0,17	5,33±0,33
8	"Перечинсь кий-642"	1	СНЕВ	9,33±0,17	9,33±0,17	9,33±0,17
			ВНК-21	8,83±0,17	8,33±0,17	7,83±0,17
9	"Березнян ский-542"	1	СНЕВ	8,33±0,17	7,83±0,17	7,83±0,17
			ВНК-21	8,25±0,14	7,75±0,14	7,75±0,14
10	М 2323	10	СНЕВ	8,58±0,08	8,33±0,17	8,33±0,17
			ВНК-21	7,08±0,08	6,67±0,17	6,33±0,17
11	К 9	11	СНЕВ	8,83±0,17	8,67±0,17	8,33±0,17
			ВНК-21	8,42±0,08	7,67±0,17	7,67±0,17
12	К 22	12	СНЕВ	8,33±0,17	8,17±0,17	8,33±0,17
			ВНК-21	7,83±0,17	6,67±0,17	6,67±0,17
13	Л 90	13	СНЕВ	9,33±0,17	9±0,29	9,33±0,17
			ВНК-21	7,33±0,17	6,83±0,17	6,67±0,17
14	М 116	14	СНЕВ	9,33±0,17	9,33±0,17	9,33±0,17
			ВНК-21	7,33±0,17	7,08±0,08	6,67±0,17
15	Ч 73	15	СНЕВ	8,42±0,08	8,33±0,17	8,33±0,17
			ВНК-21	8,26±0,08	6,83±0,17	6,67±0,17
16	Г 95	16	СНЕВ	8,26±0,17	7,83±0,17	7,83±0,17
			ВНК-21	6,58±0,08	6,17±0,17	6,33±0,17
17	Б 111	17	СНЕВ	7,33±0,08	7,17±0,17	7,33±0,17
			ВНК-21	6,58±0,08	6,08±0,08	5,67±0,17
18	Ч 184	18	СНЕВ	9,33±0,17	8,83±0,17	8,92±0,08
			ВНК-21	8,17±0,17	7,17±0,08	7,33±0,33
19	Д 229	19	СНЕВ	8,5±0,29	8,33±0,17	8,42±0,08
			ВНК-21	7,08±0,08	6,67±0,17	6,42±0,08
20	И 249	20	СНЕВ	8,17±0,17	8,17±0,17	8,17±0,17
			ВНК-21	7,33±0,17	7,08±0,08	6,67±0,17
21	П 142	21	СНЕВ	8,33±0,17	8,33±0,17	8,33±0,17
			ВНК-21	7,17±0,17	6,33±0,17	7,08±0,08
22	В 151	22	СНЕВ	9,5±0,1	9,33±0,17	9,33±0,17
			ВНК-21	8,17±0,17	7,42±0,08	7,08±0,08
23	И 393	23	СНЕВ	8,17±0,17	8,08±0,08	7,83±0,17
			ВНК-21	7,17±0,17	7,17±0,08	6,83±0,17

Примітка: М±m, n=3; P<0,05

Згідно даних, наведених у таблиці 2, штами ЕВС є стійкими при різних значеннях рН середовища у межах 2,0-13,0 незалежно від культури клітин, на якій вивчався даний маркер.

Слід відзначити, що згідно наведених прикладів, більш виразною є різниця значень інфекційної активності ентеровірусів (витриманих у середовищах без 1М MgCl<sub>2</sub> та витриманих у середовищах з різним показником рН у порівнянні з контролями) на культурі клітин ВНК-21/clon13, ніж на культурі

клітин СНЕВ. Це можна пояснити тим, що референтні колекційні штами ентеровірусів свиней 23-х серотипів десятиліттями підтримуються на культурі клітин СНЕВ [1-10].

Проведені дослідження доводять, що штами колекції ентеровірусів свиней лабораторії імунології та генетики ІВМ УААН (8 серотипів англійських штамів і 14 нових, раніше невідомих, виявлених Романенком В.П. і захищених авторськими свідоцтвами СРСР) незалежно від культури клітин, на якій

культивуються, володіють терморезистентністю та стійкістю до середовищ із різними значеннями рН, що переконливо підтверджує їх родинну, родову і видову належність.

Отож, ці маркери є стабільними генетичними ознаками ентеровірусів свиней у внутрішньотиповому і міжтипovому відношеннях і можуть бути використані при виділенні та ідентифікації ентеровірусів свиней.

Запропонований спосіб генетичного маркування ентеровірусів свиней у культурі клітин ВНК-21/clon13 має загальнотеоретичне значення при поглибленому вивченні генетики та біотехнології ентеровірусів свиней, удосконалити діагностику, профілактику та лікування хвороб свиней ентеровірусної етіології. Спосіб знайде застосування у виробничих лабораторіях ветеринарної медицини та НДУ, у господарствах при проведенні оздоровчих заходів.

Використана література:

1. Романенко В.П. // Значення ентеровірусів у патології свиней // Ветеринарна медицина. - 1998. - №5. - С.14-19.
2. Романенко В.П. / Энзоотический энцефаломелит (хвороба Тешена) свиней // Ветеринарна медицина. - К.: 2007. - №4. - С.10-12.
3. Романенко В.П. / Вірусні гастроентерити свиней // Ветеринарна медицина. - 2007. - №12. - С.8-12.
4. Классификация энтеровирусов свиней / Романенко В.Ф., Прусс О.Г., Бокун А.А., Бабич Н.В.,

Полевик Е.Н., Пинчук И.Н. // Вісник аграрної науки. - 1993. - №1. - С.94-101.

5. Таксономия энтеровирусов свиней / Романенко В.Ф., Полевик Е.Н., Прусс О.Г., Бабич Н.В., Бокун А.А., Пинчук И.Н. // Ветеринария. - 1993. - №5. - С.26-29.

6. Dunne H.W Wang T.J., Atterman E.H. Classification of North American porcine enteroviruses: a comparison with European and Japanese strains // Infect. Immunol. - 1971. - V.4. - №5. - P.619-631.

7. Романенко В.Ф. Характеристика биологических свойств энтеровирусов свиней, выделенных на территории УССР: Дис. ... д-ра вет. наук.: 03.00.06. - Ч., 1973.

8. Романенко В.П., Опанасенко В.П. / Чутливість первинних клітин нирок ембріонів свиней та перевивних клітин лінії СНЕВ до ентеровірусів свиней // Вісник сільськогосподарської науки. - 1972. - №1. - С.103-105.

9. Романенко В.Ф., Чаус В.М., Прусс О.Г., Бабич И.В. Устойчивость энтеровирусов свиней в средах с различными значениями рН // Труды 4 съезда укр. микробиол. общества. - К.: 1975. - С.151.

10. Романенко В.П., Чаус В.М., Прусс О.Г. / Дослідження терморезистентності ентеровірусів свиней // Вісник сільськогосподарської науки. - 1973. - №11. - С.93-94.