



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **38364** (13) **U**  
(51) **МПК (2006)**  
**A61K 35/66**  
**A61D 19/00**  
**C12N 1/36**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ІНДИКАЦІЇ РЕПРОДУКТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ЕНТЕРОВІРУСІВ СВИНЕЙ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН ВНК-21**

1

2

(21) u200811494  
(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  
(57) Спосіб індикації репродуктивної активності  
ентеровірусів свиней, який **відрізняється** тим, що  
її проводять у культурі клітин ВНК-21/clon13, що є  
гетерологічною відносно ентеровірусів свиней.

Запропонована корисна модель належить до галузей біології, генетики та ветеринарної вірусології і може бути використана з метою глибокого вивчення біологічних, генетичних, біотехнологічних, серологічних властивостей ентеровірусів свиней, знайде застосування у виробничих лабораторіях ветеринарної медицини та науково-дослідних установах, сприятиме у своєчасному проведенні оздоровчих заходів.

В етіологічній структурі інфекційних хвороб свиней, що перебігають з ознаками ураження нервової системи, чільне місце займають ентеровірусні інфекції [1-2].

Ентеровіруси свиней (ЕВС) належать до родини Picornaviridae роду Enterovirus. Вони є дрібними (25-30нм), РНК-геномними, простими за будовою вірусами [3]. Ентеровіруси свиней нині зводять до 23-х серотипів [4-5]. Перші 8, класифіковані Dunpe H.W. зі співавт. (1971) [6]. Штами ентеровірусів 10-23 серотипів виділено і класифіковано Романенком В.П. зі співавт. (1993), захищено авторськими свідоцтвами СРСР [5, 7].

Виділення і культивування, а також вивчення біологічних, морфологічних, фізико-хімічних та антигенних властивостей ентеровірусів проводилось на первинних і перещеплюваних лініях клітин нирки ембріону свині - гомологічної культури клітин відносно ентеровірусів свиней [1-9].

У вірусологічній практиці відомо, що адаптація вірусів до первинної культури проходить успішніше, якщо вона одержана з органів тварини, природно чутливої до певного вірусу. Отож, вивчення репродукції ентеровірусів свиней у культурі клітин СНЕВ є найближчим аналогом корисної моделі, близьким за технічним рішенням до об'єкту, що заявляється.

Унікальністю розробленого нами способу застосування культури клітин ВНК-21 для індикації репродукції ентеровірусів свиней є те, що дана культура клітин, яка є чутливою до ряду вірусів: псевдосказу, віспи ВРХ, простого герпесу, реовірусу 3, везикулярного стоматиту (Індіана), краснухи, аденовірусу 25, ящуру, Коксаки, сказу, арбовірусів - є чутливою до ентеровірусів свиней і, що важливо, гетерологічною по відношенню до них.

Культура клітин ВНК-21 - перещеплювала культуру клітин нирки новонародженого хом'ячка - має схожі з культурою клітин СНЕВ культурально-морфологічні властивості. Згідно даних паспорту якості перещеплюваної лінії клітин Колекції культур клітин для ветеринарної медицини та біотехнології ННЦ "ІВЛВМ", штаму клітин ВНК-21/clon 13 отриманий у лабораторії біотехнології ННЦ "ІВЛВМ" з перещеплюваної лінії клітин нирки сирійського хом'ячка ВНК clone 13 методом їх адаптації до живильного середовища, яке включало рівне співвідношення середовищ DMEM та 199 (90%) та 10% сироватки крові ВРХ, очищеної поліетиленгліколем [деклараційний патент на Корисна модель 6015 А Україна, МКИ 7 C12N5/00, опубліковано 15.04.2005 Бюл. №4].

Суть корисної моделі у тому, що штамми ентеровірусів свиней проявляють специфічну для ентеровірусів свиней цитопатичну й інфекційну активність у культурі клітин ВНК-21/clon 13.

Цитопатична дія проявляється у перетворенні зараженого ентеровірусом моношару клітин у дрібні фокуси круглих клітин через 16-48 год після зараження, а через 4-8 годин виникають вогнища круглих клітин (50-70% моношару). Через 12-24 години моношар клітин повністю руйнується і сповзає зі скла.

(13) **U**  
(11) **38364**  
(19) **UA**

Цитопатична дія ентеровірусів у культурі клітин ВНК-21/clon 13 оцінюється в плюсах:

+ (25%) - деструкція окремих клітин культури;  
++ (50%) - деструкція половини клітин культури;

+++ (75%) - деструкція більшості клітин культури, утворення пустот у моношарі внаслідок відривання клітин від скла;

++++ (#) (100%) - деструкція всіх клітин культури, на склі залишаються невеликі осередки змінених клітин.

З метою отримання максимальної концентрації вірусу пробірки та матраці із зараженою культурою клітин виймають із термостату на кінцевих стадіях (3-4 плюси).

Вірус, який розмножується у культурі клітин, нагромаджується поступово в культуральній рідині. Але частина вірусу може залишатися в незруйнованих клітинах. Для звільнення клітинно-зв'язаного вірусу клітини дезінтегрують 2-3-разовим заморожуванням-відтаванням.

ЦПД вірусів слід відрізнити від неспецифічної дегенерації клітин, що спостерігається при старінні культури. Тому необхідно залишати по 4 пробірки із незараженою культурою, в яких змінюють старе середовище на нове (без сироватки крові ВРХ). Крім того потрібно завжди враховувати, що дегенерацію може зумовлювати токсична дія дослідного матеріалу. Тому за необхідності виключення цього слід провести додатковий пасаж: інфікованою культуральною рідиною заражають нові пробірки з культурою клітин. ЦПД у другому пасажі не проявиться, якщо дегенерація клітин була зумовлена токсичним фактором.

У дослідженнях використовували референтні штами ентеровірусів свиней колекції лабораторії генетики і імунології ІВМ УААН (ентеровіруси свиней 1-8-го серотипів англійської колекції, надісланих 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.  
ЦПА вивчали шляхом паралельного зараження культури клітин СНЕВ і ВНК-21 референтними штамми ентеровірусів у дозі 100 ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Щодоби проводили облік результатів дослідження, результати якого наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Цитопатична активність референтних штамів ЕВС у культурах клітин [СНЕВ і ВНК-21]

№ п/п	Штам	Серотип	Походження	Культура клітин	Термін прояву ЦПД, год				Культура клітин	Термін прояву ЦПД, год				
					24	48	72	96		24	48	72	96	120
1	Тальфан	1	Pirbright	СНЕВ	+	++	#		ВНК	-	+	++	#	
2	T80	2	Pirbright	СНЕВ	+	+++	#		ВНК	-	+	++	#	
3	F34	3	Pirbright	СНЕВ	+	++	#		ВНК	-	+	+++	#	
4	F78	4	Pirbright	СНЕВ	-	+	++	#	ВНК	-	+	++	#	
5	F12	5	Pirbright	СНЕВ	+	++	#		ВНК	-	+	++	#	
6	F7	6	Pirbright	СНЕВ	+	++	#		ВНК	-	+	++	#	
7	V-13	8	Pirbright	СНЕВ	+	++	+++	#	ВНК	-	-	+	++	#
8	"Перечинський-642"	1	Україна	СНЕВ	+	++	#		ВНК	-	+	++	#	
9	"Березнянський-652"	1	Україна	СНЕВ	+	++	#		ВНК	-	+	++	+++	#
10	M2323	10	Україна	СНЕВ	+	++	+++	#	ВНК	-	+	+++	#	
11	K9	11	Україна	СНЕВ	+	++	#		ВНК	-	-	+	+++	#
12	K22	12	Україна	СНЕВ	+	++	+++	#	ВНК	-	-	+	++	#
13	Л 90	13	Україна	СНЕВ	-	+	++	#	ВНК	-	-	+	+++	#
14	M 116	14	Україна	СНЕВ	+	++	#		ВНК	-	+	++	#	
15	4 73	15	Україна	СНЕВ	+	++	+++		ВНК	-	+	++	#	
16	Г 95	16	Україна	СНЕВ	+	++	#		ВНК	-	+	+++	#	
17	Б 111	17	Україна	СНЕВ	+	++	#		ВНК	-	+	+++	#	
18	Ч 184	18	Україна	СНЕВ	+	+++	#		ВНК	-	+	++	#	
19	Д229	19	Україна	СНЕВ	-	+	++	#	ВНК	-	-	+	++	#
20	И 249	20	Україна	СНЕВ	-	+	+++	#	ВНК	-	-	+	+++	#
21	П142	21	Україна	СНЕВ	-	-	+	#	ВНК	-	-	+	++	#
22	В 151	22	Україна	СНЕВ	-	+	+++	#	ВНК	-	-	+	+++	#
23	И 393	23	Україна	СНЕВ	-	+	++	#	ВНК	-	+	++	+++	#

Примітка: „+”, „++”, „+++”, „#” - результат позитивний; „-” результат негативний

Згідно даних таблиці 1 є деяка відмінність щодо терміну прояву ЦПД ентеровірусів у культурах клітин СНЕВ і ВНК-21, проте вона є незначною. Це можна пояснити тим, що колекційні штами ЕВС десятиліттями підтримуються у культурі клітин СНЕВ, до того ж ВНК-21 є гетерологічною відносно ЕВС культурою клітин.

Приклад 2.

Проводили вивчення цитопатичної активності ентеровірусів свиней паралельно у культурах клітин СНЕВ і ВНК-21/clon 13 на прикладі їх польових ізолятів – проб головного мозку та ректальних змивів поросят, що відібрані від хворих та загинувших тварин з діагнозом хвороби Тешена. Результати дослідження зведено до таблиці 2.

Таблиця 2

Цитопатична активність польових ізолятів ЕВС у культурах клітин СНЕВ і ВНК-21

№ п/п	Номер проби	Культура клітин	Термін прояву ЦПД, год					Культура клітин	Термін прояву ЦПД, год				
			24	48	72	96	120		24	48	72	96	120
1	8	СНЕВ	-	-	+	++	#	ВНК-21	-	-	+	+++	#
2	28	СНЕВ	-	+	++	#		ВНК-21	-	+	++	#	
3	29	СНЕВ	-	+	#			ВНК-21	-	+	+++	#	
4	30	СНЕВ	-	+	++	#		ВНК-21	-	+	++	#	
5	33	СНЕВ	-	+	++	#		ВНК-21	-	+	++	#	
6	38	СНЕВ	-	-	+	++	#	ВНК-21	-	+	++	+++	#
7	39	СНЕВ	-	+	++	#		ВНК-21	-	+	+++	#	
8	40	СУЯВ	-	-	+	++		ВНК-21	-	-	+	++	#
9	43	СНЕВ	-	-	+	++	#	ВНК-21	-	+	++	+++	#
10	44	СНЕВ	-	+	++	+++	#	ВНК-21	-	+	+++	#	
11	45	СНЕВ	-	-	+	++	#	ВНК-21	-	-	+	++	#

Примітка: „+”, „+++”, „#” - результат позитивний; „-” - результат негативний

Цитопатична дія, згідно таблиці 2, була специфічною для ентеровірусів свиней. Ніякої суттєвої різниці щодо морфології клітин культур СНЕВ і ВНК-21, термінів прояву ЦПД не відмічали.

Приклад 3.

Паралельно у культурі клітин СНЕВ і ВНК-21 проводили кількісне визначення ЕВС в одиниці об'єму вірусомісного матеріалу. Інфекційну активність референтних штамів та польових ізолятів ентеровірусів свиней визначали за методом Ріда і Менча (таблиця 3-4).

Таблиця 3

Інфекційна активність референтних штамів ентеровірусів свиней ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ;  $P < 0,05$ )

№ п/п	Штам	Серотип	Походження	Титр ентеровірусів свиней, Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	
				СНЕВ	ВНК-21
1	Тальфан	1	Великобританія	9,29±0,16	8,23±0,09
2	T80	2	Великобританія	8,96±0,29	7,88±0,16
3	F34	3	Великобританія	8,63±0,22	7,67±0,25
4	F78	4	Великобританія	8,71±0,1	8,25±0,18
5	F12	5	Великобританія	8,46±0,27	8,29±0,2
6	F7	6	Великобританія	9,04±0,17	8,04±0,17
7	V 13	8	Великобританія	8±0,26	5,13±0,24
8	"Перечинський 642"	1	Україна	8,96±0,27	8,63±0,22
9	"Березнянський 652"	1	Україна	8,38±0,18	8,46±0,21
10	M2323	10	Україна	8,71±0,2	7±0,13
11	K9	11	Україна	8,58±0,24	8,25±0,18
12	K 22	12	Україна	8,38±0,18	8,13±0,24
13	L90	13	Україна	9,13±0,22	7,71±0,27
14	M116	14	Україна	8,96±0,27	7,71±0,19
15	4 73	15	Україна	8,42±0,15	7,67±0,3
16	Г 95	16	Україна	8,79±0,35	6,75±0,29
17	Б 111	17	Україна	8,38±0,46	6,83±0,21
18	4 184	18	Україна	9,13±0,22	8,29±0,2
19	D229	19	Україна	8,71±0,27	7,08±0,21
20	И 249	20	Україна	8,13±0,18	7,38±0,18
21	П 142	21	Україна	8,38±0,18	7,04±0,17
22	В 151	22	Україна	9,46±0,12	8,13±0,18
23	И 393	23	Україна	8,13±0,18	7,13±0,18

Таблиця 4

Інфекційна активність польових штамів ентеровірусів свиней ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ;  $P < 0,05$ )

№ п/п	№ проби	Титр ентеровірусів свиней, Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	
		СНЕВ	ВНК-21
1	8	8,67±0,0'8	9,17±0,08
2	28	9±0,15	9,33±0,17
3	29	8,08±0,08	9,42±0,08
4	30	9,42±0,08	9,33±0,17
5	33	9,33±0,17	8,33±0,17
6	38	7,17±0,17	7,83±0,17
7	39	7,25±0,08	7,75±0,14
8	40	7,33±0,33	8,17±0,17
9	43	7,75±0,14	9,08±0,17
10	44	7,92±0,08	9,17±0,08
11	45	7,33±0,17	8,83±0,17

Різниця титрів референтних штамів та польових ізолятів ентеровірусів свиней у у культурах клітин СНЕВ і ВНК-21/clon 13 була незначною з високим ступенем достовірності ( $P < 0,05$ ).

Отже, розроблений нами спосіб індикації репродуктивної активності ентеровірусів свиней у культурі клітин ВНК-21/clon 13 дає можливість поглибити вивчення біології, генетики та біотехнології ентеровірусів свиней, удосконалити профілактичні, діагностичні та лікувальні заходи, підвищити діагностичну цінність вірусологічних досліджень.

Використана література:

1. Романенко В.П. / Значення ентеровірусів у патології свиней// Ветеринарна медицина. - 1998. - №5. - С.14-19.
2. Романенко В.П. / Ензоотичний енцефаломієліт (хвороба Тешена) свиней// Ветеринарна медицина. – 2007. – №4. – С.10–12.
3. Романенко В.Ф. Характеристика біологічних свойств энтеровирусов свиней, выделенных на территории УССР: Дис....д-ра вет. наук.: 03.00.06. – Ч., 1973.
4. Індиканія ентеровірусів свиней / Романенко В.П., Прусс О.Г., Бабич Н.В.// Вісник сільськогосподарської науки. – 1977. – №2. – С.78–82.

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. 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.

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

9. Изучение цитопатологии культур клеток, инфицированных штаммами энтеровирусов свиней / Романенко В.Ф., Курбала М.Я., Козар Ф.Е., Щербина Н.В.// Мікробіологічний журнал. – 1973. – №3. – С.402.