



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101245** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
C12N 5/00
G01N 31/16 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | | | |
|--|-----------------------------|---------------------|---|
| (21) Номер заявки: | u 2015 03820 | (72) Винахідник(и): | Демиденко Ірина Федорівна (UA), Романенко Володимир Пилипович (UA) |
| (22) Дата подання заявки: | 22.04.2015 | (73) Власник(и): | ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA) |
| (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: | 25.08.2015 | | |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: | 25.08.2015, Бюл.№ 16 | | |

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ЕНТЕРОВІРУСІВ СВИНЕЙ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН НЕР-2

(57) Реферат:

Спосіб культивування ентеровірусів свиней у культурі клітин Нер-2 включає зараження інфікуючою дозою моношару культури клітин, визначення репродукції ентеровірусів свиней у культурі клітин за рівнем прояву цитопатичної дії, отримання на 72-96 год. (ЦПД +++) вірусовмісної сировини шляхом триразового заморожування-відтаювання культуральної суспензії. Для отримання культуральної суспензії ентеровірусів свиней з високим інфекційним титром як перещеплювана культура клітин для репродукції та накопичення ентеровірусів свиней використовують гетерологічну перещеплювану культуру клітин Нер-2.

UA 101245 U

Корисна модель належить до області біології, генетики та ветеринарної вірусології і може бути використана для дослідження біологічних, генетичних та серологічних властивостей ентеровірусів свиней, а також знайде застосування у виробничих лабораторіях ветеринарної медицини та науково-дослідних установах, сприятиме проведенню лікувальних та профілактичних заходів щодо ентеровірусних хвороб свиней.

Найближчим аналогом є вивчення репродукції ентеровірусів свиней у культурі клітин СНЕВ та ВНК-21. Культуральні властивості штамів вірусів є одним із основних параметрів при якісній оцінці їх імунобіологічних властивостей. Культури клітин являють собою зручну модель для вивчення репродуктивної здатності вірусів та накопичення необхідних об'ємів вірусної біомаси. Завдяки мономорфності клітинних культур одержують вірусну суспензію з мінімальною кількістю сторонніх домішок [1, 2].

Найбільш широкоживано при культивуванні ентеровірусів свиней використовують як первинні, так і перещеплювані культури клітин та їх клоновані варіанти: нирки свині - PS, PS-EK, PK-15, IB-RS-2, СНЕВ [3-5], тестикули свиней - ST [6].

Унікальністю розробленого нами способу використання культури клітин Нер-2 для індикації репродукції ентеровірусів свиней є те, що вона чутлива до ряду вірусів: аденовірус 3, герпесвірус, поліовірус 1, респіраторний синцитіальний вірус, везикулярний стоматит, арбовірус, вірус корі, Коксаки ЕСНО, вірус хвороби Ньюкасла, вірус парагрипу 2 і 3 - є чутливою до ентеровірусів свиней та, що є важливим, гетерологічною відношено до них.

Культура клітин Нер-2 (перещеплювана культура клітин з епідермоїдної карциноми гортані людини) має подібні з перещеплюваною культурою клітин СНЕВ культурально-морфологічні властивості.

В основу корисної моделі поставлена задача дослідити культуральні властивості штамів, ізолятів та клонів ентеровірусів свиней у гетерологічній культурі клітин Нер-2 порівняно з гомологічною культурою клітин СНЕВ та розширити спектр перещеплюваних клітинних ліній для виділення та культивування ентеровірусів свиней.

Поставлена задача вирішується шляхом культивування ентеровірусів свиней на гетерологічній перещеплюваній культурі клітин Нер-2.

Дану культуру клітин адаптували в лабораторії імуногенетики ентеровірусів свиней IBM НААН до живильного середовища, яке включало рівне співвідношення середовищ DMEM і 199 (90 %) та сироватку ВРХ (10 %).

Суть корисної моделі полягає в тому, що ентеровіруси свиней проявляють характерну для них цитопатичну активність у культурі клітин Нер-2, тобто появу у зараженому ентеровірусами свиней моношарі дрібних фокусів круглих клітин через дві-три доби після зараження, які через 8-12 годин перетворюються у вогнища круглих клітин (50-70 % моношару), а ще через 12-24 годин повною руйнацією моношару та сповзання його зі скла.

Цитопатичну дію ентеровірусів свиней в культурі клітин Нер-2 оцінювали в плюсах:

- + - деструкція окремих клітин культури неспецифічної конфігурації (до 25 %) - результат вважали негативним;

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

- ++++ - повна деструкція або зміна всіх клітин культури (100 %).

Позитивним результатом вважається ураження моношару культури клітин на два і більше плюсів. Для звільнення клітинно-зв'язаного вірусу, вірусовмісну суспензію дезінтегрували 3-разовим заморожуванням-відтаюванням. Для контролю неспецифічної дегенерації клітин, залишали 4 пробірки (матраци) із незараженим моношаром культури клітин, в яких змінювали ростове середовище на підтримуюче (без додавання сироватки ВРХ).

У дослідженнях використовували референтні штами ентеровірусів свиней колекції лабораторії імунології ентеровірусів свиней IBM НААН, виділені в лабораторії імунології ентеровірусів свиней IBM НААН ізоляти та клони ентеровірусів свиней. Культуру клітин Нер-2 використовували з колекції культур Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України.

Приклад 1. Здійснення способу

Для здійснення способу референтні штами, ізоляти та клони ентеровірусів свиней паралельно титрували у культурах клітин СНЕВ та Нер-2. Усі операції із зараженням культур клітин здійснювали у захисному укритті - боксі (клас 2 безпеки). Після видалення середовища росту у пробірки з моношаром вносили по 0,2 мл вірусної суспензії (відповідно по 4 пробірки на кожний вірус) та 0,8 мл підтримуючого середовища. Пробірки інкубували у стаціонарному положенні під кутом 5 при +37 °С. Культури щоденно мікроскопували, враховуючи появу цитопатичної дії.

Усі дослідні віруси культивували в кожній культурі клітин впродовж п'яти послідовних пасажів. При ураженні моношару більше ніж на 70 %, пробірки знімали з досліду і піддавали замороженню.

Результати дослідів оформлені у вигляді таблиці 1.

5

Таблица 1

Репродукція ентеровірусів свиней на різних культурах клітин

| Назва штаму/ізоляту/клону ентеровірусів | Цитопатична дія у культурі клітин Нер-2, год. | | Цитопатична дія у культурі клітин СНЕВ, год. | |
|---|---|--------|--|--------|
| | 1 пас. | 5 пас. | 1 пас. | 5 пас. |
| Konratice | 96 | 72 | 24 | 24 |
| Клон № 1 | 72 | 48 | 24 | 48 |
| Клон № 2 | 72 | 48 | 24 | 48 |
| Перечинський-642 | 96 | 96 | 48 | 24 |
| Клон № 3 | 96 | 72 | 24 | 48 |
| Березнянський-652 | 72 | 72 | 48 | 24 |
| Клон № 4 | 72 | 48 | 48 | 48 |
| Чернігівський-2372 | 120 | 96 | 48 | 24 |
| Клон № 5 | 96 | 72 | 48 | 72 |
| Ізолят 1-го серотипу | 120 | 120 | 72 | 48 |
| Клон № 6 | 120 | 96 | 72 | 96 |
| T-80 | 96 | 72 | 24 | 24 |
| Клон № 7 | 72 | 48 | 24 | 48 |
| Ізолят 2-го серотипу | 120 | 96 | 48 | 48 |
| Клон № 8 | 96 | 72 | 48 | 72 |
| V13 | 96 | 72 | 48 | 24 |
| Клон № 9 | 72 | 48 | 48 | 72 |
| Ізолят 8-го серотипу | 120 | 96 | 48 | 48 |
| Клон № 10 | 96 | 48 | 48 | 72 |

Цитопатична дія референтних ентеровірусів проявлялась на культурі клітин Нер-2 в першому пасажі через 120-72 год., ізолятів - через 120-96 год., а клонів виділених з референтних штамів через 72-96 год. і клонів виділених із ізолятів - через 96-120 год. Після адаптації до КК Нер-2, в п'ятому пасажі відмічали скорочення терміну появи цитопатичної дії вихідних штамів та ізолятів, а також виділених з них клонів на 24 год.

Відповідно час проявлення ЦПД на культуру клітин СНЕВ отриманих клонів з референтних штамів ентеровірусів свиней в першому пасажі становив 24-48 год., ЦПД клонів з ізолятів - 48-72 год. Час проявлення ЦПД на культуру клітин СНЕВ клонів з референтних штамів у п'ятому пасажі подовжився на 24 годин, клонів ізолятів - на 24-48 год.

Приклад 2. Визначення ефективності способу

Ефективність способу визначали за цитопатичною активністю при порівняльному дослідженні інфекційних титрів ентеровірусів у культурі клітин СНЕВ і культурі клітин Нер-2. Результати досліду зведені у таблицях 2 і 3.

20

Таблица 2

Інфекційна активність ентеровірусів свиней у культурі клітин СНЕВ

| Назва ентеровірусів | Титр до клонування Ig ТЦД ₅₀ /см ³ | Назва клону ентеровірусів | Титр після клонування, Ig ТЦД ₅₀ /см ³ |
|----------------------|---|---------------------------|---|
| Konratice | 9,08±0,23 | Клон № 1 | 9,6±0,09 |
| | | Клон № 2 | 9,8±0,18 |
| Перечинський-642 | 8,58±0,09 | Клон № 3 | 9,42±0,09 |
| Березнянський-652 | 8,92±0,30 | Клон № 4 | 9,67±0,09 |
| Чернігівський-2372 | 6,67±0,23 | Клон № 5 | 7,42±0,09 |
| Ізолят 1-го серотипу | 8,17±0,18 | Клон № 6 | 8,83±0,09 |
| T-80 | 8,75±0,14 | Клон № 7 | 9,58±0,09 |

Продовження таблиці 2

| | | | |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|
| Ізолят 2-го серотипу | 8,0±0,14 | Клон № 8 | 8,58±0,09 |
| V13 | 8,58±0,16 | Клон № 9 | 9,42±0,09 |
| Ізолят 8-го серотипу | 8,25±0,25 | Клон № 10 | 9,33±0,18 |

Примітка: $M \pm m$, $n=3$, $P<0,05$

Відповідно таблиці 2, відмічали стабільне підвищення титрів інфекційної активності клонів у КК СНЕВ, як референтних штамів, так і виділених ізолятів.

5 Підвищення інфекційної активності клонів відмічалось і в культурі клітин Нер-2 (табл. 3)

Таблиця 3

Інфекційна активність ентеровірусів у культурі клітин Нер-2

| Назва ентеровірусів | Титр до клонування Ig $TCID_{50}/cm^3$ | Назва клону ентеровірусів | Титр після клонування, Ig $TCID_{50}/cm^3$ |
|----------------------|---|------------------------------|---|
| Konratice | 4,69±0,19 | Клон № 1 | 5,6±0,1 |
| | | Клон № 2 | 5,32±0,19 |
| Перечинський-642 | 3,67±0,09 | Клон № 3 | 4,57±0,07 |
| Березнянський-652 | 4,25±0,25 | Клон № 4 | 5,7±0,3 |
| Чернігівський-2372 | 1,6±0,01 | Клон № 5 | 2,67±0,09 |
| Ізолят 1-го серотипу | 4,0±0,14 | Клон № 6 | 4,75±0,24 |
| T-80 | 4,75±0,24 | Клон № 7 | 5,69±0,07 |
| Ізолят 2-го серотипу | 3,42±0,09 | Клон № 8 | 4,25±0,25 |
| V13 | 4,57±0,07 | Клон № 9 | 5,76±0,07 |
| Ізолят 8-го серотипу | 2,67±0,09 | Клон № 10 | 3,67±0,09 |

Примітка: $M \pm m$, $n=3$, $P<0,05$

Оскільки наші дослідження показали, що ентеровіруси свиней викликають цитопатичну дію на культуру клітин Нер-2 і, після проведення клонування, мають тенденцію до підвищення інфекційних титрів, то наступним нашим кроком було провести культуральні пасажі виділених клонів для адаптації їх до КК Нер-2 (фіг. 1- Динаміка накопичення клонів ЕВС у КК Нер-2).

3 результатів, представлених на фіг 1, видно, що в процесі адаптації до культури клітин Нер-2 відмічалась стабільна тенденція (впродовж 20 послідовних пасажів) зростання інфекційної активності виділених клонів ЕВС в даній культурі. Так, з п'ятого по десятий пасаж в середньому інфекційні титри становили: клону № 1 5,6±0,1-6,38±0,13 $TCID_{50}/cm^3$; клону № 2 5,32±0,19-6,3±0,2; клону № 3 4,57±0,07-5,32±0,19 $TCID_{50}/cm^3$; клону № 4 5,7±0,3-6,85±0,18 $TCID_{50}/cm^3$; клону № 5 2,67±0,09-3,1±0,1 $TCID_{50}/cm^3$; клону № 6 4,75±0,24-5,5±0,2 $TCID_{50}/cm^3$; клону № 7 5,69±0,07-6,2±0,2 $TCID_{50}/cm^3$; клону № 8 4,25±0,25-5,32±0,19 $TCID_{50}/cm^3$; клон № 9 5,76±0,07-6,01±0,13 $TCID_{50}/cm^3$; клону № 10 3,67±0,09-4,25±0,25 $TCID_{50}/cm^3$, а з п'ятнадцятого по двадцятий пасажі - клону № 1 7,33±0,09-8,08±0,09 $TCID_{50}/cm^3$; клону № 2 7,58±0,17-8,17±0,18; клону № 3 6,67±0,23-7,92±0,09 $TCID_{50}/cm^3$; клону № 4 7,42±0,09-8,33±0,09 $TCID_{50}/cm^3$; клону № 5 4,83±0,03-5,08±0,09 $TCID_{50}/cm^3$; клону № 6 6,67±0,09-7,17±0,09 $TCID_{50}/cm^3$; клону № 7 7,08±0,09-8,0±0,14 $TCID_{50}/cm^3$; клону № 8 6,58±0,09-7,17±0,09 $TCID_{50}/cm^3$; клон № 9 7,08±0,09-8,25±0,25; клону № 10 5,58±0,17-6,17±0,09 $TCID_{50}/cm^3$.

Провели порівняльну паралель між даними інфекційної активності штамів, ізолятів ентеровірусів свиней і їх клонів у культурі клітин СНЕВ (таблиця 2) і у культурі клітин Нер-2 (таблиця 3), а також між результатами інфекційної активності титрів після адаптації клонів до культури клітин Нер-2 (фіг. 1). Так, інфекційні титри штамів та ізолятів ентеровірусів свиней у культурі клітин Нер-2 були значно нижчими, ніж у культурі клітин СНЕВ, що пояснюється нижчими адаптивними властивостями вірусів до даної культури (фіг. 2 порівняння інфекційної активності штамів та ізолятів ентеровірусів свиней у культурах клітин СНЕВ та Нер-2).

Дані, представлені на фіг. 2, демонструють, що інфекційна активність ентеровірусів свиней у культурі клітин СНЕВ була вищою, ніж у культурі клітин Нер-2 для штаму Konratice на 4,39 $TCID_{50}/cm^3$, штаму Перечинський-642 на 4,91; штаму Березнянський-652 на 4,67 $TCID_{50}/cm^3$; штаму Чернігівський-2372 на 5,07; ізоляту 1-го серотипу на 4,17 $TCID_{50}/cm^3$; штаму T80 на 4,0

ТЦД₅₀/см³; ізоляту 2-го серотипу на 4,58 ТЦД₅₀/см³; штаму V13 на 4,01 ТЦД₅₀/см³; ізоляту 8-го серотипу на 5,58 ТЦД₅₀/см³.

Тоді, як після адаптації до культури клітин Нер-2 клонів ентеровірусів свиней, така різниця між інфекційною активністю у культурі клітин СНЕВ і культурі клітин Нер-2 значно зменшилась та становила для клону № 1-1,52 ТЦД₅₀/см³; клону № 2-1,63; клону № 3-1,5 ТЦД₅₀/см³; клону № 4-1,34 ТЦД₅₀/см³; клону № 5-2,34 ТЦД₅₀/см³; клону № 6-1,66 ТЦД₅₀/см³; клону № 7-1,58 ТЦД₅₀/см³; клону № 8-1,41 ТЦД₅₀/см³; клон № 9-1,17; клону № 10-3,16 Іг ТЦД₅₀/см³ (фіг. 3 - порівняння інфекційної активності клонів ентеровірусів свиней у культурах клітин СНЕВ та Нер-2).

Таким чином, розроблений спосіб культивування ентеровірусів свиней у гетерологічній культурі клітин Нер-2 дає можливість використовувати дану культуру клітин для поглибленого вивчення біології, генетики та біотехнології ентеровірусів свиней, удосконалити діагностичні та вірусологічні методи.

Джерела інформації:

1. Голубев Д.Б. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии / Д.Б. Голубев, А.А. Соминина, М.Н. Медведева. - М.: Медицина, 1976. - 224 с.

2. Білокінь В.С. Клітинні культури: біотехнологічні аспекти використання і збереження / В.С. Білокінь. // Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. - Харків. - 2008. - № 91. - С. 50-54.

3. Knowles N. J. Differentiation of porcine enterovirus serotypes by complement fixation / N. J. Knowles, L. S. Buckley. // Res. Vet. Sci... - 1980. - № 1. - P. 113-115.

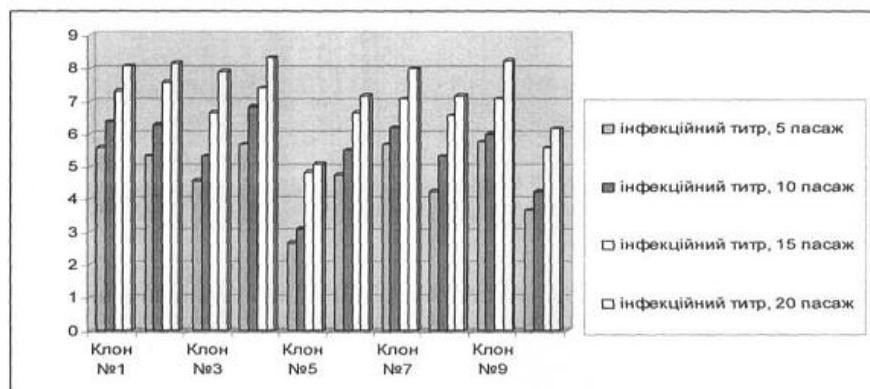
4. Buczek J. Serotypes of enteroviruses isolated from pigs in Poland / J. Buczek, T. Koziol. // Folia-Veterinaria. - 1991. - № 1. - P. 89-97.

5. Вабищевич Ф.С. Антигенное родство и доминантность штаммов корона- и ентеровирусов свиней / Ф.С. Вабищевич, В.А. Прискока. // Матеріали II міжнародного симпозиуму "Біоресурси і віруси". - 1998. - С. 21.

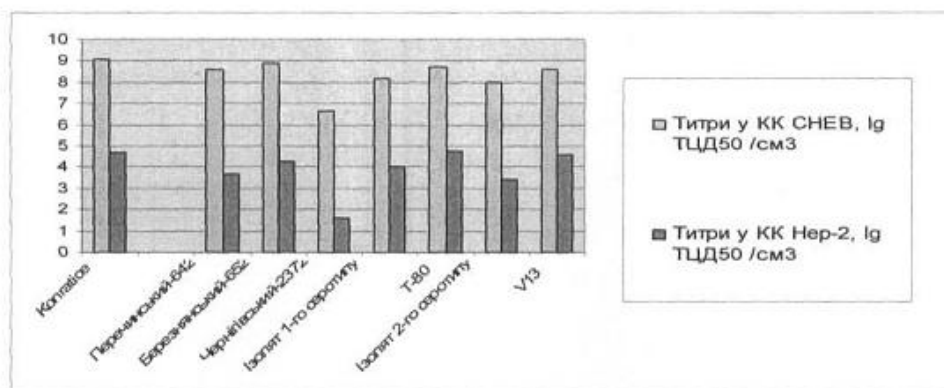
6. Typisierung von 17 porzinen Enterovirusisolationen aus Polioenzephalomyelitis fallen der Jahre 1983-1991 / [Witte K. H., Auerbach J., Loss K. U. et al] // Deutsche-Tierarztliche-Wochenschrift.-1994. - V. 101, № 12. - P. 482-484.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

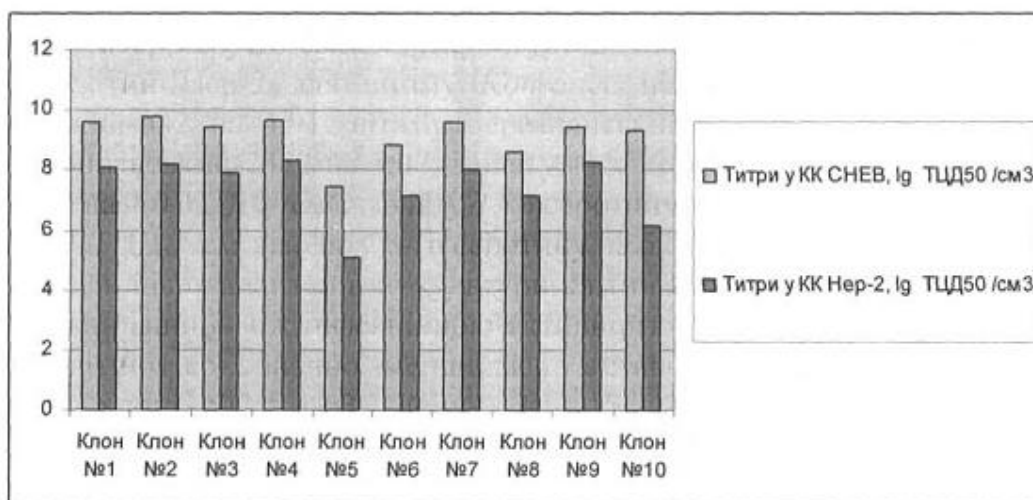
Спосіб культивування ентеровірусів свиней у культурі клітин Нер-2, що включає зараження інфікуючою дозою моношару культури клітин, визначення репродукції ентеровірусів свиней у культурі клітин за рівнем прояву цитопатичної дії, отримання на 72-96 год. (ЦПД +++) вірусомісної сировини шляхом триразового заморожування-відтаування культуральної суспензії, який **відрізняється** тим, що для отримання культуральної суспензії ентеровірусів свиней з високим інфекційним титром як перещеплювана культура клітин для репродукції та накопичення ентеровірусів свиней використовують гетерологічну перещеплювану культуру клітин Нер-2.



фіг.1



фiг.2



фiг.3

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601