

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

ДЕМИДЕНКО ІРИНА ФЕДОРІВНА

УДК: 619:578.835.1

ВИДІЛЕННЯ ТА КЛОНУВАННЯ ЕНТЕРОВІРУСІВ СВИНЕЙ

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія,
інфекційні хвороби та імунологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук

Київ–2015

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України

Науковий керівник доктор ветеринарних наук, академік НААН
Романенко Володимир Пилипович,
Інститут ветеринарної медицини НААН,
завідувач відділу вірусології

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук,
старший науковий співробітник
Герілович Антон Павлович,
Національний науковий центр «Інститут
експериментальної і клінічної ветеринарної
медицини», заступник директора з наукової роботи

кандидат ветеринарних наук, доцент
Калініна Ольга Сергіївна,
Львівський національний університет ветеринарної
медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького,
доцент кафедри мікробіології та вірусології

Захист відбудеться «22» жовтня 2015 р. о 12⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ □41, вул. Генерала Родимцева, 19, навчальний корпус № 1, кімната 97

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ □41, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розісланий « » вересня 2015 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Н. Г. Грушанська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. У медичній та ветеринарній практиці ентеровірусні інфекції здавна привертала увагу вчених із різних країн світу, оскільки РНК-вмісні ентеровіруси з родини *Picornaviridae* мають повсюдне поширення та відіграють важливу роль в інфекційній патології тварин і людини. Згідно з даними G. Oprisan et al. (2002), A. M. Lindberg et al. (2003), S. Chevaliez (2004), M. S. Oberste et al. (2004), P. Simmonds (2006), В. І. Задорожньої (2008), ентеровіруси генетично й антигенно досить різноманітні та підлягають складним мутаційним процесам. Особливістю ентеровірусних інфекцій є те, що схожі клінічні симптоми хвороби етіологічно можуть бути пов'язані з різними серотипами ентеровірусів, унаслідок чого один серотип вірусу здатний призводити до різноманітних клінічних форм захворювання (Лашкевич В. А., 2008; Романенко В. П. та ін., 2007; Бова Т. О. та ін., 2011). Незважаючи на те, що останніми роками вивченню ентеровірусів приділяється велика увага, причини формування вірулентних штамів, закономірності їхньої циркуляції залишаються недостатньо розкритими. Ентеровірусні інфекції тварин і людини, як і інші інфекції, впродовж певного часу зазнають патогенетичних змін унаслідок стимулюючої або пригнічуючої дії абіотичних, біотичних та антропогенних факторів (Мельниченко О. М. та ін., 2014).

Визначення генетичних ознак (маркерів) вірусів, котрі дають змогу диференціювати окремі штами вірусів, їхню стабільність і взаємозв'язки між собою, крім того, наявність простих і доступних методів виявлення генетичної гетерогенності – одна із першочергових умов, яка визначає успіх проведення генетичного дослідження вірусів. На прикладі ентеровірусів людини (Ворошилова М. К., 1966) доведено характерні численні відмінності серед штамів одного й того ж серотипу, котрі відображаються *in vitro* у культурі клітин за цитопатичною дією та бляшкоутворенням. Встановлено (Широбоков В. П. та ін., 1986), що клони, виділені з одного штаму вірусу поліомієліту людини, характеризуються генетичною індивідуальністю та вирізняються за рядом біологічних властивостей.

Щодо досліджень за маркерними ознаками клонованих варіантів ентеровірусів свиней (за класифікацією В. П. Романенка, 1993), то такі дослідження в Україні не проводилися. У зв'язку з цим, проведення виділення ентеровірусів свиней, селекція їх методом бляшкоутворення та отримання клонів, стійких за маркерними ознаками, є актуальними напрямками наукових досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась як самостійний фрагмент у межах планових науково-дослідних робіт лабораторії імуногенетики ентеровірусів свиней Інституту ветеринарної медицини НААН за державними завданнями: «Провести моніторинг ентеровірусів свиней та розробити ефективні методи попередження хвороб, що ними викликаються» (номер державної реєстрації 0106U000929, 2006–2010 рр.) та «Вивчити молекулярно-генетичні властивості ентеровірусів свиней, закономірності мінливості та

гетерогенності ентеровірусних популяцій» (номер державної реєстрації 0111U000466, 2011–2015 рр.).

Мета і задачі дослідження. Мета дослідження – виділення та клонування ентеровірусів свиней.

Для досягнення мети необхідно було вирішити такі задачі:

– виділити ізоляти ентеровірусів свиней різних серотипів від клінічно здорових тварин у неблагополучних та благополучних щодо ентеровірусних хвороб свиней господарствах та здійснити їхню серотипізацію;

– провести селекцію методом бляшок референтних штамів та ізолятів ентеровірусів свиней;

– вивчити морфологічну характеристику виділених клонів ентеровірусів свиней за маркерними ознаками;

– дослідити чутливість перещеплюваних культур клітин СНЕВ, Нер-2 та Vero до референтних штамів, ізолятів та клонів ентеровірусів свиней;

– провести оцінку виділених клонів щодо вихідних штамів/ізолятів ентеровірусів свиней за маркером Ts (терморезистентність);

– дослідити ступінь атенуації виділених клонів за маркером термочутливості (rct);

– отримати моноспецифічні сироватки крові кролів до виділених клонів ентеровірусів свиней і визначити ступінь домінантності їх над вихідними штамми/ізолятами.

Об'єкт дослідження: виділення ентеровірусів свиней, клонування ентеровірусів свиней.

Предмет дослідження: клонування методом бляшок, інфекційна активність, цитопатична дія, терморезистентність, термочутливість, специфічні імунні сироватки крові кролів.

Методи дослідження: вірусологічні (культивування перещеплюваних культур клітин СНЕВ, Нер-2 і Vero; пасажування штамів ентеровірусів свиней у зазначених культурах клітин; визначення інфекційної активності ентеровірусів свиней; отримання клонів методом бляшок); біологічні (вивчення біологічних властивостей отриманих клонів); статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше в Україні здійснено селекцію референтних штамів 1-, 2- і 8-го серотипів та ізолятів, тих же серотипів, ентеровірусів свиней (за класифікацією В. П. Романенка, 1993) із використанням методу бляшкоутворення.

Уперше адаптовано штами (*Konratice*, Перечинський-642, Березнянський-652, Чернігівський-2372, *T80*, *V13*, епізоотичні штами 1-, 2- та 8-го серотипів ентеровірусів свиней та їхні клони до гетерологічної перещеплюваної культури клітин карциноми гортані людини Нер-2 (патент на корисну модель № 101245 від 25.08.2015 р.; заявл. 22.04.2015 № и 201503820).

Доведено, що клони ентеровірусів свиней (клони № 1 і № 2 із штаму *Konratice*, клон № 3 із штаму Перечинський-642, клон № 4 із штаму Березнянський-652, клон № 5 із штаму Чернігівський-2372, клон № 6 із ізоляту 1-го серотипу, клон № 7 із штаму *T80*, клон № 8 із ізоляту 2-го

серотипу, клон № 9 із штаму *V13*, клон № 10 із ізоляту 8-го серотипу), виділені за допомогою методу бляшок, мають стабільні маркерні ознаки, а саме: морфологічні параметри (прозорість, розмір, рівність країв бляшок); вищу терморезистентність та вищий ступінь атенуації порівняно з вихідними штамми.

Встановлено антигенну спорідненість ізолятів ентеровірусів свиней, виділених від клінічно здорових тварин господарств із різним епізоотичним статусом, із референтними штамми *Konratice*, *Перечинський-642*, *Березнянський-652*, *Чернігівський-2372*, *T80*, *V13*.

Отримано моноспецифічні сироватки крові кролів до клонів, які рекомендовано використовувати у реакції нейтралізації при визначенні типової належності штамів при змішаних ентеровірусних інфекціях свиней.

Практичне значення одержаних результатів. Практична цінність роботи полягає у селекції ентеровірусів свиней за допомогою методу бляшок, виділенні стійких за рядом маркерних ознак клонів ентеровірусів свиней, розробленні та застосуванні у вірусологічній практиці методу культивування ентеровірусів свиней у гетерологічній культурі клітин *Her-2*.

Результати дослідження впроваджено у роботу вірусологічних відділів Інституту ветеринарної медицини НААН для виділення, ідентифікації та типування ентеровірусів свиней.

Результати експериментальних досліджень використано при підготовці та написанні «Методичних рекомендацій по клонуванню ентеровірусів свиней у культурі клітин за допомогою методу бляшкоутворення», які затверджені вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН (протокол № 9 від 05 листопада 2013 р.) і науково-методичною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України (протокол № 1 від 19 грудня 2013 р.).

Особистий внесок здобувача. Здобувач особисто виконала пошук та опрацювання літературних джерел, опанувала використані у ході виконання роботи методи дослідження, виконала основний обсяг експериментальних досліджень, проаналізувала та узагальнила матеріал, статистично опрацювала результати дослідів, підготувала наукові статті.

Завдання, формування напрямів досліджень, аналіз результатів та висновки сформовані та обґрунтовані за підтримки наукового керівника доктора ветеринарних наук, академіка НААН Романенка Володимира Пилиповича.

Апробація результатів дисертації. Матеріали наукових досліджень доповідалися та обговорювалися на щорічних засіданнях вченої ради Інституту ветеринарної медицини НААН (м. Київ, 2009–2013 рр.); V Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Екологічні проблеми сільськогосподарського виробництва» (21–24 червня 2011 р., м. Яремче); науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (26 червня 2014 р., м. Київ).

Публікації. Основні положення дисертації опубліковано в 13 наукових працях, з яких 5 статей – у наукових фахових виданнях України (у тому числі 2 – одноосібно), 1 – у науковому виданні іншої держави; 2 – в інших наукових виданнях, 3 тези доповідей, методичні рекомендації та патент на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 133 сторінках комп'ютерного тексту і містить розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, результати власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки, пропозиції виробництву, список використаних джерел та додатки. Робота ілюстрована 20 таблицями, 12 рисунками. Список використаних джерел містить 200 найменувань, із них 82 – латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Наукові дослідження виконано впродовж 2009–2014 рр. на базі лабораторії імуногенетики ентеровірусів свиней Інституту ветеринарної медицини НААН. Деякі досліди виконано у дослідному господарстві Інституту ветеринарної медицини НААН «Пилиповичі», розташованому у Бородянському районі Київської області.

У дослідах використовували:

а) штами ентеровірусів свиней (за класифікацією В. П. Романенка, 1993) із колекції IBM НААН:

– *Konratice, T80, V13*, отримані В. П. Романенком у 1970 р. від доктора I. V. Derbyshire (Pirbright Laboratory, Великобританія);

– вакцинний штам Перечинський-642, задепонований 10.12.1981 р. № 6166/5 ВДНКІ і захищений авторським свідоцтвом СРСР за № 997299 від 14 жовтня 1982 р.;

– діагностичний штам Березнянський-652, задепонований 10.12.1981 р. № 6167/5 ВДНКІ;

– патогенний штам Чернігівський-2372, який використовується для визначення напруженості імунітету після щеплення вірусвакциною проти хвороби Тешена свиней, задепонований 04.07.1984 р. і має реєстраційний номер 286/5;

б) виділені в лабораторії імуногенетики ентеровірусів свиней Інституту ветеринарної медицини НААН ізоляти ентеровірусів свиней, що належать, згідно з класифікацією В. П. Романенка (1993), до 1-, 2- та 8-го серотипів.

Дослідження культуральних властивостей ентеровірусів свиней проведено з використанням перещеплюваних культур клітин: нирки ембріона свині (СНЕВ), нирки африканської зеленої мавпи (Vero) та карциноми гортані людини (Нер-2). Культури клітин вирощували у скляних матрацах об'ємом 1,5 дм³, 1,0 дм³ та 50 см³ стаціонарним методом.

Інфекційну активність досліджуваних ентеровірусів свиней визначали титруванням у пробірках із культурою клітин за загальноприйнятими методами (Сюрін В. М. та ін., 1986; Головка А. М. та ін. 2007) та обчислювали за методом Кербера.

Селекцію відібраних для дослідів штамів та ізолятів ентеровірусів свиней проводили за допомогою методу бляшок (Dulbecco R., 1954) у п'ятьох послідовних пасажах.

Визначення внутрішньотипових відмінностей виділених клонів ентеровірусів свиней проводили за допомогою дослідження їхніх генетичних маркерів: S, p^t, p^f, p^s та p^r (морфологічні ознаки бляшок); Ts (терморезистентність), tct (термочутливість).

Антигенну активність виділених клонів ентеровірусів свиней визначали за титрами специфічних антитіл у сироватках крові імунізованих кролів (метод В. П. Романенка із співавт., 1982) у реакції нейтралізації.

Всі отримані цифрові значення статистично опрацьовано за Г. Ф. Лакінім (1990) із використанням програми MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Виділення ізолятів ентеровірусів свиней

Ізоляти ентеровірусів свиней виділяли із ректальних проб, які відібрали під час епізоотичного обстеження двох свинарських господарств (ПСП «Онікс» с. Книшки Шосткінського району Сумської області, де мали місце випадки захворювання свиней із симптомами ураження нервової системи та шлунково-кишкового тракту; СФГ «Полюс» с. Зозів Липовецького району Вінницької області, яке благополучне щодо ентеровірусних хвороб свиней). При виділенні ізолятів матеріали обробляли хлороформом за методом К. Vogel і А. Mayer (1961), а з метою перевірки належності виділених ізолятів до РНК-вмісних вірусів, а саме ентеровірусів, перевіряли їхню чутливість до дії інгібітора 5-бром-2-дезоксиридину (Mayer A. et al, 1977).

За проведеними дослідями виявлено, що усі досліджувані ізоляти майже не змінювали репродуктивної активності у присутності інгібітора, тобто їхні інфекційні титри у культурі клітин СНЕВ становили у середньому 2,83–3,92 lg ТЦД₅₀/см³ і майже не відрізнялись від контролю (різниця інфекційних титрів у культурі клітин СНЕВ до і після дії інгібітора 5-бром-2-дезоксиридину коливалась у межах 0,08–0,66 lg ТЦД₅₀/см³) та були вищі від «нульового циклу» у середньому на 1,33–2,75 lg ТЦД₅₀/см³, що підтвердило належність до РНК-вмісних вірусів, а саме до ентеровірусів свиней.

Типову належність виділених ізолятів визначено за допомогою реакції нейтралізації у культурі клітин СНЕВ із референтними сироватками до колекційних штамів ентеровірусів свиней лабораторії імуногенетики ентеровірусів свиней Інституту ветеринарної медицини НААН (метод В. П. Романенка із співавт., авт. св. № 100726 від 23.05.1982 р.). За

проведеними дослідженнями із 15 ізолятів відібрано три, які належали до 1-, 2- та 8-го серотипів.

Адаптацію та накопичення відібраних для дослідів ізолятів проведено у перещеплюваній культурі клітин СНЕВ. У ході пасажування у культурі клітин СНЕВ виділених ізолятів відбувалося послідовне підвищення титрів інфекційної активності усіх ізолятів (рис. 1).

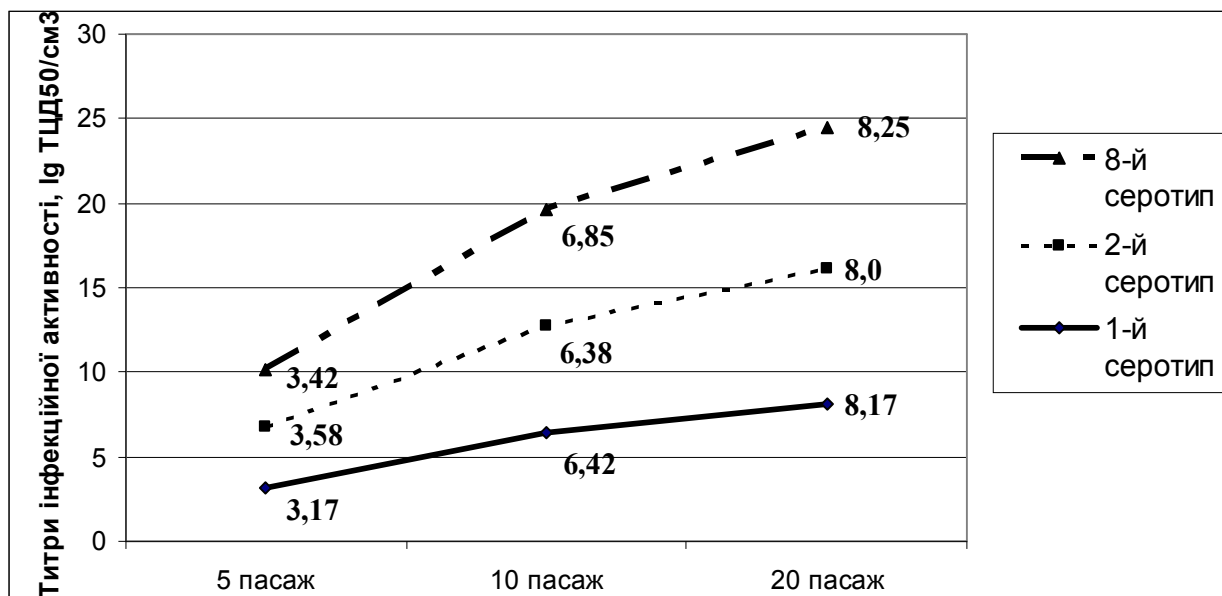


Рис. 1. Інфекційні титри ізолятів ентеровірусів свиней, виділених у перещеплюваній культурі клітин СНЕВ

Отже, для проведення селекції та виділення клонів відібрано референтні штами та прототипні їм ізоляти з відповідними інфекційними титрами у $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$: *Konratice* – $9,08 \pm 0,23$, *Перечинський-642* – $8,58 \pm 0,09$; *Березнянський-652* – $8,92 \pm 0,30$; *Чернігівський-2372* – $6,67 \pm 0,23$ та ізолят 1-го серотипу – $8,17 \pm 0,18$; *T80* – $8,75 \pm 0,14$ та ізолят 2-го серотипу – $8,0 \pm 0,14$; *V13* – $8,58 \pm 0,16$ та ізолят 8-го серотипу – $8,25 \pm 0,25$. **Виділення клонів із штамів та ізолятів ентеровірусів свиней методом бляшок**

За основу вирішення поставлених задач, пов'язаних із проведенням селекції ентеровірусів свиней, використано здатність вірусів утворювати бляшки – обмежені осередки зруйнованих клітин у суцільному моношарі культури під агаровим покриттям, що дає змогу охарактеризувати штами та клонувати ентеровіруси. Проведено десятикратні розведення вірусомісних суспензій від 10^{-1} до 10^{-10} , використовуючи на кожне розведення по два скляні матраци із суцільним моношаром культури клітин СНЕВ.

За проведеними дослідями виявлено, що при використанні менших розведень вірусомісних суспензій (10^{-1} – 10^{-7}) кількість утворених бляшок була значною і не піддавалася точному підрахунку внаслідок нашарування бляшок одна на одну та їхнього швидкого злиття. Встановлено, що найоптимальнішим розведенням вірусомісної суспензії для отримання чітких одиничних бляшок (клонів) є 10^{-10} . Це розведення доцільне при дотриманні правил відбору генетично однорідних клонів, згідно з якими для

виділення клону необхідно відокремити одиничну бляшку із матраців, що містять не більше десяти бляшок, та вилучати вірус із бляшки, котра знаходиться від сусідніх бляшок на відстані не менше 10 мм.

Відмічено, що розмір утворених бляшок для всіх серотипів ентеровірусів свиней був стабільним і не змінювався впродовж усього періоду культивування. Під час селекції виявлено, що штам *Konratice* у першому пасажі продукував два типи бляшок: великі (діаметром 4,0–5,0 мм) та середні (діаметром 3,0 мм). Але при подальшому пасажуванні виділені клони із великих бляшок продукували тільки великі бляшки, а середні – лише середні і більше не давали такого розщеплення. Клони інших штамів та ізолятів були однорідними впродовж усіх п'яти пасажів і такого розщеплення не давали.

Штами ентеровірусів свиней 1-го серотипу утворювали різні за розміром бляшки: великі (*Konratice* – 5,0–3,0 мм), середні (Перечинський-642 – 2,0 мм, Березнянський-652 – 1,5 мм) та дрібні (Чернігівський-2372 – 1,0 мм). Штами 2- та 8-го серотипів утворювали бляшки середнього розміру (*T80* – 1,5 мм, *V13* – 2,0 мм). Проте всі ізоляти ентеровірусів свиней різних серотипів утворювали впродовж усіх п'яти пасажів дрібні бляшки (розміром 1,0 мм).

Різницю між референтними штамми та прототипними їм ізолятами спостерігали також і у терміні формування бляшок. Поява перших бляшок колекційних штамів у першому пасажі спостерігали у середньому через 72–120 год після інфікування культури клітин (Перечинський-642, Березнянський-652, *T80* – 72 год, *Konratice*, *V13* – 96 год, Чернігівський-2372 – 120 год), а появу бляшок ізолятів спостерігали через 96–120 год (ізоляти 2- і 8-го серотипів – 96 год, ізолят 1-го серотипу – 120 год).

Відповідно до проведених досліджень встановлено, що із збільшенням кількості пасажів термін появи бляшок як референтних штамів ентеровірусів свиней, так і ізолятів, змінювався, а саме скорочувався на 24–48 год і становив у п'ятому пасажі для клонів №№ 1, 3, 4, 7 (референтні штамми) – 48 год, для клонів № 2 і № 9 (референтні штамми) – 72 год, для клону № 5 (штам Чернігівський-2372) – 96 год, для клонів № 8 та № 10 (відповідно ізоляти 2- та 8-го серотипів) – 72 год і для клону № 6 (ізолят 1-го серотипу) – 96 год.

Для подальших дослідів відібрано клони кожного штаму та ізоляту ентеровірусів свиней, стабільні за морфологічними характеристиками впродовж усіх п'яти послідовних пасажів, зважаючи на такі маркерні ознаки, як розміри, форма, прозорість або мутність бляшок (табл. 1).

Морфологічна характеристика виділених клонів ентеровірусів свиней

Клони ентеровірусів свиней, 5 пасаж	Морфологічна характеристика бляшок			
	S-маркер	r ^t -маркер	r ^s -маркер	Форма
Клон № 1	Великі (5,0 мм)	+	–	Круглі з рівними краями
Клон № 2	Середні (3,0 мм)	+	–	Круглі з рівними краями
Клон № 3	Середні (2,0 мм)	+	–	Круглі з рівними краями
Клон № 4	Дрібні (1,5 мм)	–	+	Круглі з рівними краями
Клон № 5	Дрібні (1,0 мм)	–	+	Круглі з нечіткими краями
Клон № 6	Дрібні (1,0 мм)	–	+	Круглі з рівними краями
Клон № 7	Дрібні (1,5 мм)	–	+	Круглі з рівними краями
Клон № 8	Дрібні (1,0 мм)	–	+	Круглі з рівними краями
Клон № 9	Середні (2,0 мм)	+	–	Круглі з нечіткими краями
Клон № 10	Дрібні (1,0 мм)	+	–	Круглі з нечіткими краями

Примітка: S-маркер – розмір бляшок, r^t-маркер – мутні бляшки, r^s-маркер – прозорі бляшки.

Як видно із табл. 1, відібрані для подальших досліджень клони однієї лінії впродовж пасажування у культурі клітин СНЕВ були однорідної структури. При цьому клони референтних штамів 1-го серотипу характеризувалися r^t-маркером (клони №№ 1, 2, 3) та r^s-маркером (клони №№ 4, 5, 6). Клон № 8 мав r^s-маркер, так само як і клон № 7, виділений із референтного штаму 2-го серотипу. Однаковим r^t-маркером характеризувались і клони 8-го серотипу (№ 9 та № 10). Клони всіх серотипів утворювали круглі бляшки. Проте у бляшок клонів із референтних штамів (окрім клону № 5) і клонів із ізолятів 1- і 2-го серотипів та референтних штамів були чіткі рівні краї, а у бляшок клонів із референтних штамів та ізолятів 8-го серотипу – нечіткі контури.

Отже, із референтних штамів та прототипних їм ізолятів було виділено десять клонів із стабільними маркерними ознаками. Клони №№ 1, 2, 3, 9 утворювали бляшки великих та середніх розмірів (2,0–5,0 мм) та характеризувались r^t-маркером, клони №№ 4, 5, 6, 7, 8 індукували бляшки

дрібних розмірів (1,0–1,5 мм) і характеризувалися р^s-маркером, клон № 10 утворював бляшки дрібних розмірів (1,0 мм) і характеризувався р^t-маркером.

Дослідження культуральних властивостей клонів ентеровірусів свиней

Мета однієї із задач роботи – дослідити в порівняльному аспекті чутливість перещеплюваних культур клітин СНЕВ, Нер-2 та Vero до референтних штамів, ізолятів та виділених клонів ентеровірусів свиней. Інфекційну активність вірусів визначали титруванням у пробірках із перещеплюваними культурами клітин Нер-2, Vero та СНЕВ із суцільним моношаром.

За проведеними дослідженнями виявлено, що культура клітин Vero, на відміну від культур клітин Нер-2 і СНЕВ, упродовж усіх п'яти послідовних пасажів виявилася нечутливою до референтних штамів, ізолятів та виділених клонів ентеровірусів свиней. У гетерологічній культурі клітин Нер-2 цитопатична дія (ЦПД) референтних штамів проявлялась у першому пасажі через 72–120 год, ізолятів – через 96–120 год, а клонів, виділених із референтних штамів, – через 72–96 год і клонів, виділених із ізолятів, – через 96–120 год. Після адаптації вірусів до культури клітин Нер-2 у п'ятому пасажі, спостерігали скорочення терміну появи ЦПД вихідних штамів та ізолятів, а також виділених із них клонів на 24 год. Відповідно час індукції ЦПД у культурі клітин СНЕВ клонами, отриманими із референтних штамів ентеровірусів свиней, у першому пасажі становив 24–48 год, а ЦПД клонів із ізолятів – 48–72 год. У культурі клітин СНЕВ ЦПД клонів із референтних штамів у п'ятому пасажі подовжився на 24 год, а клонів із ізолятів – на 24–48 год. У досліді при культивуванні виділених клонів у гомологічній культурі клітин СНЕВ та гетерологічній культурі клітин Нер-2 характер ЦПД не змінювався і проявлявся дегенеративними змінами клітин: спочатку утворенням поодиноких округлих клітин із подальшим зростанням їхньої кількості аж до повного руйнування моношару впродовж всіх п'яти пасажів.

Визначення інфекційної активності клонів ентеровірусів свиней у культурах клітин СНЕВ і Нер-2. Спостерігали стабільне підвищення титрів інфекційної активності клонів у культурі клітин СНЕВ як референтних штамів, так і виділених ізолятів: титри штаму *Konratice* до клонування становили 9,08 lg ТЦД₅₀/см³, а після клонування підвищилися до 9,6 (клон № 1) та 9,8 lg ТЦД₅₀/см³ (клон № 2); штаму Перечинський-642 зросли із 8,58 до 9,42 lg ТЦД₅₀/см³ (клон № 3); штаму Березнянський-652 – із 8,92 до 9,67 lg ТЦД₅₀/см³ (клон № 4); штаму Чернігівський-2372 – із 6,67 до 7,42 lg ТЦД₅₀/см³ (клон № 5); ізоляту 1-го серотипу – із 8,17 до 8,83 lg ТЦД₅₀/см³ (клон № 6); штаму *T80* – із 8,75 до 9,58 lg ТЦД₅₀/см³ (клон № 7); ізоляту 2-го серотипу – із 8,0 до 8,58 lg ТЦД₅₀/см³ (клон № 8); штаму *V13* – із 8,58 до 9,42 lg ТЦД₅₀/см³ (клон № 9); ізоляту 8-го серотипу – із 8,25 до 9,33 lg ТЦД₅₀/см³ (клон № 10).

Зростання інфекційної активності ентеровірусів свиней спостерігали також і у перещеплюваній культурі клітин Нер-2: титри штаму *Konratice* до клонування становили 4,69 lg ТЦД₅₀/см³, а після клонування підвищилися до

5,6 (клон № 1) та $5,32 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (клон № 2); штаму Перечинський-642 зросли із 3,67 до $4,57 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (клон № 3), штаму Березнянський-652 із 4,25 – до 5,7 (клон № 4) $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; штаму Чернігівський-2372 –із 1,6 до $2,67 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (клон № 5), ізоляту 1-го серотипу – із 4,0 до $4,75 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (клон № 6); штаму T80 – із 4,75 до $5,69 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (клон № 7); ізоляту 2-го серотипу – із 3,42 до $4,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (клон № 8); штаму V13 – із 4,57 до $5,76 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (клон № 9); ізоляту 8-го серотипу – із 2,67 до $3,67 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (клон № 10).

Проведення адаптації клонів ентеровірусів свиней до культури клітин Нер-2. Оскільки дослідження свідчать, що ентеровіруси свиней спричинюють ЦПД у культурі клітин Нер-2 і після проведення клонування мають тенденцію до підвищення інфекційних титрів, тому мета наступного експерименту – пасажування виділених клонів для адаптації їх до культури клітин Нер-2 (рис. 2).

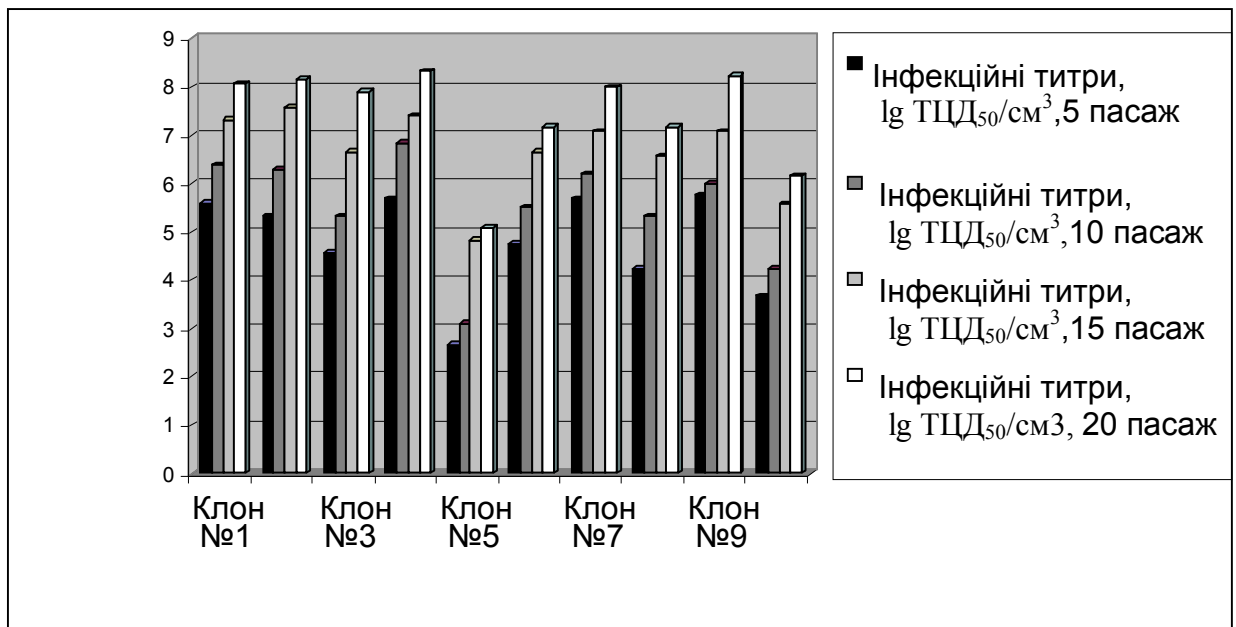


Рис. 2. Динаміка накопичення клонів ентеровірусів свиней у перещеплюваній культурі клітин Нер-2

У ході адаптації до культури клітин Нер-2 спостерігалася стабільна тенденція (впродовж 20 послідовних пасажів) зростання інфекційної активності виділених клонів ентеровірусів свиней. Так, із п'ятого по десятий пасаж у середньому інфекційні титри становили:

- клон № 1 – $5,6 \pm 0,1 - 6,38 \pm 0,13 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
- клон № 2 – $5,32 \pm 0,19 - 6,3 \pm 0,20 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
- клон № 3 – $4,57 \pm 0,07 - 5,32 \pm 0,19 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
- клон № 4 – $5,7 \pm 0,30 - 6,85 \pm 0,18 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
- клон № 5 – $2,67 \pm 0,09 - 3,1 \pm 0,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
- клон № 6 – $4,75 \pm 0,24 - 5,5 \pm 0,20 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
- клон № 7 – $5,69 \pm 0,07 - 6,2 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
- клон № 8 – $4,25 \pm 0,25 - 5,32 \pm 0,19 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;

клон № 9 – $5,76 \pm 0,07 - 6,01 \pm 0,13 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 10 – $3,67 \pm 0,09 - 4,25 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;

із п'ятнадцятого по двадцятий пасажі:

клон № 1 – $7,33 \pm 0,09 - 8,08 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 2 – $7,58 \pm 0,17 - 8,17 \pm 0,18 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 3 – $6,67 \pm 0,23 - 7,92 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 4 – $7,42 \pm 0,09 - 8,33 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 5 – $4,83 \pm 0,03 - 5,08 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 6 – $6,67 \pm 0,09 - 7,17 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 7 – $7,08 \pm 0,09 - 8,0 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 8 – $6,58 \pm 0,09 - 7,17 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 9 – $7,08 \pm 0,09 - 8,25 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 10 – $5,58 \pm 0,17 - 6,17 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Визначення оптимальної множинності зараження культури клітин Нер-2. З метою оптимального терміну накопичення вірусомісного матеріалу виділених клонів із високими титрами інфекційної активності визначено множинність зараження культури клітин Нер-2. Встановлено, що найоптимальнішими дозами зараження культури клітин Нер-2 є $0,1 - 0,01 \text{ТЦД}_{50}/\text{клітину}$, оскільки інфекційні титри клонів становили:

клон № 1 – $8,08 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 2 – $8,17 \pm 0,18 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 3 – $7,92 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 4 – $8,33 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 5 – $5,08 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 6 – $7,17 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 7 – $8,0 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 8 – $7,17 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 9 – $8,25 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 10 – $6,17 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Збільшення дози зараження до $1,0 \text{ТЦД}_{50}/\text{клітину}$ не призводило до збільшення інфекційних титрів у всіх ізолятів. При використанні низької множинності зараження ($0,001 \text{ТЦД}_{50}/\text{клітину}$) отримано нижчі інфекційні титри:

клон № 1 – $6,38 \pm 0,13 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 2 – $6,3 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 3 – $5,32 \pm 0,19 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 4 – $6,85 \pm 0,18 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 5 – $3,1 \pm 0,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 6 – $5,5 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 7 – $6,2 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 8 – $5,32 \pm 0,19 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 9 – $6,01 \pm 0,13 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$;
 клон № 10 – $4,25 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Окрім того, подовжувався період культивування клонів на декілька діб.

Отже, проведені дослідження свідчать, що множинність зараження суттєво впливає на рівень репродукції всіх виділених клонів і на тривалість їхнього максимального накопичення. Тобто для одержання культуральних вірусомісних суспензій із найвищими інфекційними титрами необхідно проводити культивування у середньому 3–4 доби (залежно від серотипової належності) при множинності зараження 0,1–0,01 ТЦД₅₀/клітину.

Порівняння інфекційної активності референтних штамів, ізолятів та клонів ентеровірусів свиней у культурах клітин СНЕВ та Нер-2. Для диференціювання наведених вище даних щодо адаптивних властивостей виділених клонів ентеровірусів свиней до гетерологічної культури клітин Нер-2 порівняно результати дослідів визначення інфекційної активності референтних штамів, ізолятів та їхніх клонів у перещеплюваних культурах клітин СНЕВ та Нер-2. Так, інфекційні титри вихідних 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. Різниця інфекційних титрів становила відповідно для штаму *Konratice* – 4,39 lg ТЦД₅₀/см³, штаму Перечинський-642 – 4,91 lg ТЦД₅₀/см³; штаму Березнянський-652 – 4,67 lg ТЦД₅₀/см³; штаму Чернігівський-2372 – 5,07 lg ТЦД₅₀/см³; ізоляту 1-го серотипу – 4,17 lg ТЦД₅₀/см³; штаму T80 – 4,0 lg ТЦД₅₀/см³; ізоляту 2-го серотипу – 4,58 lg ТЦД₅₀/см³; штаму V13 – 4,01 lg ТЦД₅₀/см³; ізоляту 8-го серотипу – 5,58 lg ТЦД₅₀/см³ (рис. 3).

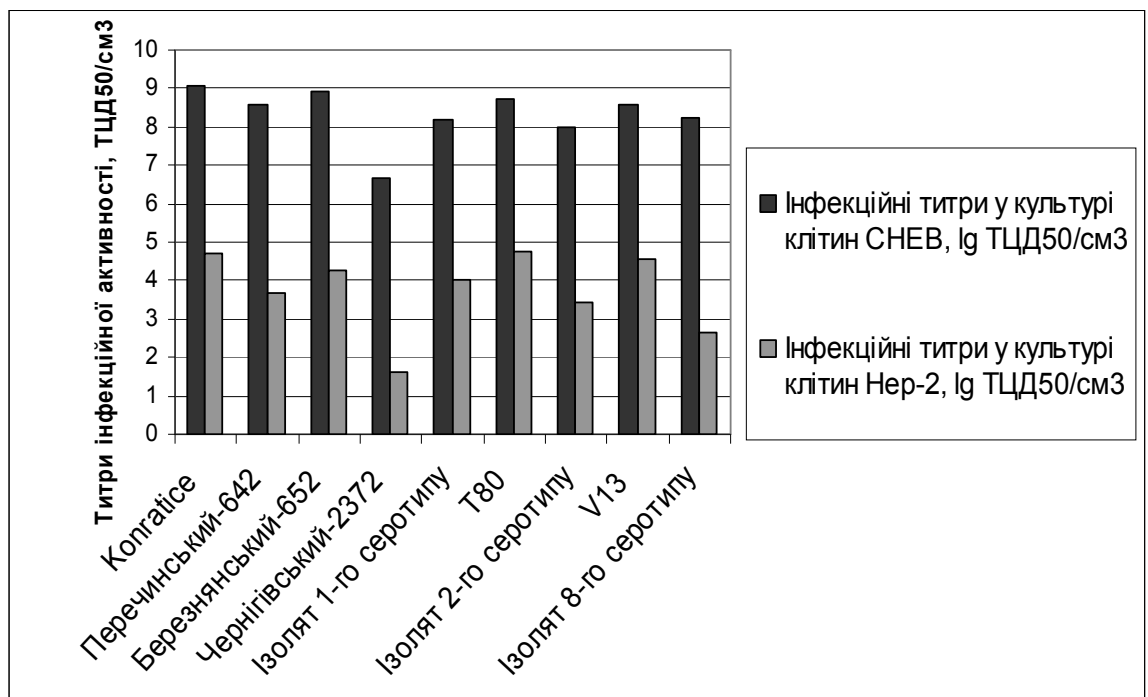


Рис. 3. Інфекційна активність референтних штамів та ізолятів ентеровірусів свиней у перещеплюваних культурах клітин СНЕВ та Нер-2

Після адаптації та визначення оптимальної множинності зараження виділеними клонами культури клітин Нер-2 різниця між інфекційною

активністю у культурах клітин СНЕВ і Нер-2 значно зменшилася та становила для клону № 1 – 1,52 lg ТЦД₅₀/см³; клону № 2 – 1,63; клону № 3 – 1,5; клону № 4 – 1,34; клону № 5 – 2,34; клону № 6 – 1,66; клону № 7 – 1,58; клону № 8 – 1,41; клону № 9 – 1,17; клону № 10 – 3,16 lg ТЦД₅₀/см³ (рис.4).

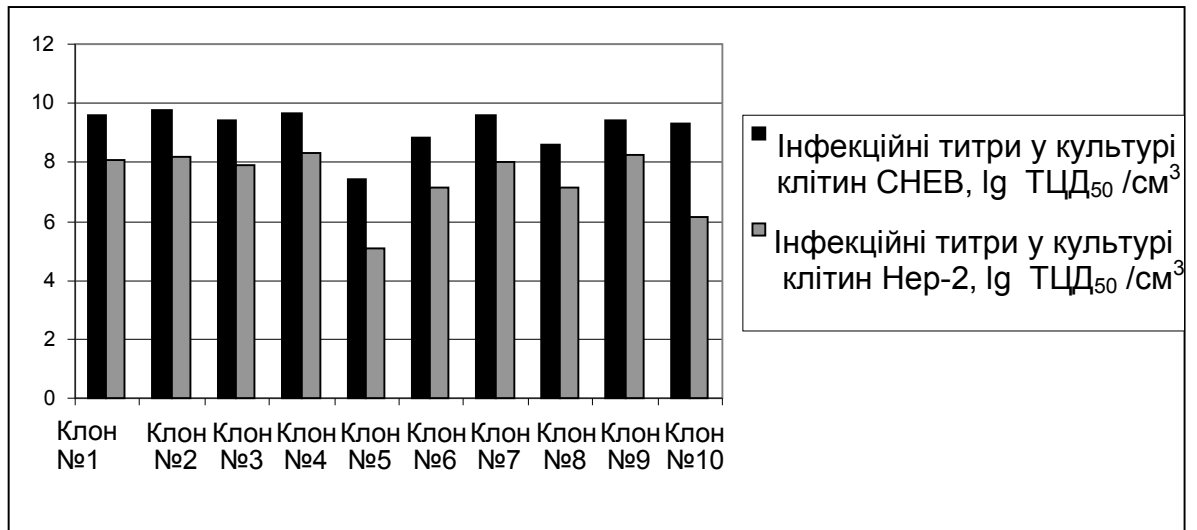


Рис. 4. Інфекційна активність клонів ентеровірусів свиней у перещеплюваних культурах клітин СНЕВ та Нер-2

Отже, доведено, що для репродукції та накопичення ентеровірусів свиней можна використовувати, крім гомологічної культури клітин СНЕВ, і гетерологічну культуру клітин Нер-2, в якій виділені клони накопичуються у достатньо високих інфекційних титрах.

Дослідження Ts-маркера клонів ентеровірусів свиней

Необхідно було перевірити вплив катіонів Mg²⁺ на виділені клони ентеровірусів свиней при їхньому прогріванні впродовж 1 год за температури +56±0,5 °С (метод J. Melnick, C. Wallis, 1961). Інфекційна активність референтних штамів, ізолятів та прототипних їм виділених клонів при прогріванні впродовж 1 год за температури +56±0,5 °С без присутності 1М MgCl₂ зменшувалася суттєво порівняно з контрольними пробами. Але при додаванні 1М MgCl₂ інфекційні титри знижувалися незначно, що свідчить про стабілізацію віріонів катіонами Mg²⁺.

При дослідженні терморезистентності виділених клонів спостерігали збільшення їхньої стійкості до прогрівання у присутності 1М MgCl₂ порівняно з референтними штамми та ізолятами. Так, інфекційні титри після прогрівання з 1М MgCl₂ штаму *Konratice* становили 8,67 lg ТЦД₅₀/см³, а клонів № 1 і № 2 – 8,92 і 9,08 lg ТЦД₅₀/см³ відповідно; штаму Перечинський-642 – 8,33 і клону № 3 – 8,83 lg ТЦД₅₀/см³; штаму Березнянський-652 – 8,33 і клону № 4 – 9,17 lg ТЦД₅₀/см³; штаму Чернігівський-2372 – 6,17 і клону № 5 – 7,17 lg ТЦД₅₀/см³; ізоляту 1-го серотипу – 7,92 і клону № 6 – 8,17 lg ТЦД₅₀/см³; штаму T80 – 8,25 і клону № 7 – 9,08 lg ТЦД₅₀/см³; ізоляту 2-го серотипу – 7,83 і клону № 8 –

8,08 lg ТЦД₅₀/см³; штаму *V13* – 8,08 і клону № 9 – 9,17 lg ТЦД₅₀/см³; ізоляту 8-го серотипу – 7,92 і клону № 10 – 9,17 lg ТЦД₅₀/см³.

Отже, встановлено, що всі виділені клони характеризувалися Ts⁺-маркером, тобто були терморезистентні у присутності катіонів Mg²⁺.

Визначення gct-маркеру клонів ентеровірусів свиней

У дослідках вивчено здатність клонів ентеровірусів свиней репродукуватись у культурі клітин СНЕВ за підвищеної температури (+40±0,5 °С) порівняно з репродукцією у культурі клітин СНЕВ за стандартної температури (+37±0,5 °С), використовуючи загальноприйнятну методику (Ворошилова М. К., 1964). При проведенні дослідів виявлено, що референтні штами ентеровірусів свиней, ізоляти та прототипні їм клони виявилися менш стійкими за температури +40±0,5 °С та мали нижчу інфекційну активність у культурі клітин СНЕВ порівняно з їхньою репродукцією за температури +37±0,5 °С. Проте інфекційні титри клонів за температури +40±0,5 °С були стабільно вищі ніж референтних штамів та ізолятів ентеровірусів свиней: штаму *Konratice* – 7,25, а клонів № 1 і № 2 відповідно – 7,92 і 8,17 lg ТЦД₅₀/см³; штаму *Перечинський-642* – 7,58, а клону № 3 – 7,92 lg ТЦД₅₀/см³; штаму *Березнянський-652* – 7,42, а клону № 4 – 8,08 lg ТЦД₅₀/см³; штаму *Чернігівський-2372* – 4,83, а клону № 5 – 5,08 lg ТЦД₅₀/см³; ізоляту 1-го серотипу – 6,67, а клону № 6 – 7,08 lg ТЦД₅₀/см³; штаму *T80* – 6,58, а клону № 7 – 7,08 lg ТЦД₅₀/см³; ізоляту 2-го серотипу – 6,33, а клону № 8 – 7,42 lg ТЦД₅₀/см³; штаму *V13* – 6,83, а клону № 9 – 7,83 lg ТЦД₅₀/см³; ізоляту 8-го серотипу – 6,58, а клону № 10 – 7,92 lg ТЦД₅₀/см³.

Отримані величини дали змогу обчислити за методикою М. К. Ворошилової (1964) ступінь атенуації виділених клонів, згідно з якою різницю вирахованих за методом Кербера інфекційних титрів клонів за температур +37 і +40±0,5 °С ділили на різницю інфекційних титрів відповідних вихідних штамів та ізолятів. Одержана величина є показником характеристики gct₄₀: показник вище 0,75 властивий атенуєваним штамам (маркер gct₄₀-); від 0,75 до 0,3 – штамам із невисоким ступенем атенуації (маркер gct₄₀±); нижче 0,3 – неатенуєваним штамам (маркер gct₄₀+).

Отже, всі клони, за винятком № 8 та № 10 (із незначним ступенем атенуації), за маркерною ознакою gct⁴⁰ виявилися високоатенуєваними, що може бути використано для створення нових біологічних препаратів.

Дослідження антигенних властивостей клонів ентеровірусів свиней

За проведеними дослідженнями виявлено, що імунні сироватки, одержані на кролях, мали титри віруснейтралізуючих антитіл до референтних штамів ентеровірусів свиней – 1:512–1:2048, до ізолятів – 1:256–1:512, тоді як титри віруснейтралізуючих антитіл до клонів вихідних штамів становили 1:1024–1:4096 і до клонів ізолятів – 1:1024–1:2048.

Антигенну спорідненість та домінантність клонів над референтними штамами та ізолятами ентеровірусів свиней визначено у перехресній реакції нейтралізації з використанням постійної дози вірусу (100 ТЦД₅₀/см³) і 20 нейтралізуючих доз імунної сироватки за методами А. І. Собка і

В. А. Прискоки (1985) та В. А. Прискоки та ін. (1987). За результатами дослідів встановлено, що клони ентеровірусів свиней були антигенно споріднені з референтними штамми та ізолятами у середньому на 90 %. Антигенна різниця коливалась у межах 5–14 %, але спостерігалось чітке домінування клонів над вихідними штамми та ізолятами. Так, клон № 1 проявив домінуючі властивості над штамми *Konratice* та Березнянський-652, клон № 2 – над штамми *Konratice*, Березнянський-652, Чернігівський-2372 та ізолятом 1-го серотипу, клон № 3 – над штамми *Konratice*, Перечинський-642, Березнянський-652, Чернігівський-2372 та ізолятом 1-го серотипу, клон № 4 – над штамми *Konratice*, Березнянський-652 та Чернігівський-2372, клон № 5 – над штамми Перечинський-642, Березнянський-652, Чернігівський-2372 та ізолятом 1-го серотипу, клон № 6 – над штамми *Konratice*, Перечинський-642 та Березнянський-652, клон № 7 – над штамом *T-80* та ізолятом 2-го серотипу, клон № 8 – над штамом *T-80* та ізолятом 2-го серотипу, клон № 9 – над штамом *V13* та ізолятом 8-го серотипу, клон № 10 – над штамом *V13* та ізолятом 8-го серотипу.

ВИСНОВКИ

У дисертації на підставі експериментальних досліджень у порівняльному аспекті викладено результати селекції ентеровірусів свиней методом бляшкоутворення, запропоновано метод культивування ентеровірусів свиней у гетерологічній перещеплюваній культурі клітин Нер-2, запропоновано виділені клони ентеровірусів свиней для використання їх у біологічній промисловості.

1. Виділено 15 ізолятів ентеровірусів свиней від клінічно здорових тварин господарств із різним епізоотичним статусом та визначено серотипову належність ізолятів, а саме до 1-, 2-, 3-, 6- та 8-го серотипів відповідно до класифікації В. П. Романенка (1993).

2. Здійснено селекцію референтних штамів ентеровірусів свиней і прототипних їм ізолятів із використанням методу бляшок. Проведенням послідовних пасажів виділено клони ентеровірусів свиней: штамів *Konratice* (клони № 1 і № 2), *T80* (клон № 7), *V13* (клон № 9), Перечинський-642 (клон № 3), Березнянський-652 (клон № 4), Чернігівський-2372 (клон № 5), ізолятів 1-го (клон № 6), 2-го (клон № 8) та 8-го (клон № 10) серотипів.

3. Виділені клони ентеровірусів свиней упродовж п'яти послідовних пасажів характеризувалися стійкими морфологічними маркерами: клони №№ 1, 2, 3, 9 – бляшками великих та середніх розмірів (2,0–5,0 мм) і r^t -маркером, клони №№ 4, 5, 6, 7, 8 – бляшками дрібних розмірів (1,0–1,5 мм) і r^s -маркером, клон № 10 – бляшками дрібних розмірів (1,0 мм) і r^t -маркером.

4. Встановлено найвищу вірусорепродукуючу здатність гомологічної культури клітин СНЕВ для референтних штамів ентеровірусів свиней, ізолятів та їхніх клонів. Адаптовано до гетерологічної культури клітин Нер-2 ентеровіруси свиней 1-, 2- та 8-го серотипів та їхні клони; визначено оптимальну множинність зараження культури (0,1–0,01 ТЦД₅₀/клітину) для отримання культуральних вірусомісних суспензій із найвищими

інфекційними титрами. Гетерологічна культура клітин Vero не чутлива до ентеровірусів свиней 1-, 2- та 8-го серотипів.

5. Виділені клони ентеровірусів свиней характеризуються Ts⁺-маркером та мають вищу терморезистентність порівняно з референтними штамми та ізолятами.

6. Виділені клони ентеровірусів свиней (за винятком клонів № 8 та № 10) за gct₄₀-маркером є високоатенуйованими: їхні інфекційні титри за температури +40±0,5 °C були стабільно вищі ніж референтних штамів та ізолятів.

7. Отримано моноспецифічні сироватки крові кролів із титрами віруснейтралізуючих антитіл до клонів референтних штамів 1:1024–1:4096 та до клонів ізолятів – 1:1024–1:2048. Встановлено вищу антигенну активність виділених клонів ентеровірусів свиней порівняно з вихідними штамми та ізолятами, антигенну спорідненість (у середньому на 90 %) із ними та чітке домінування клонів над вихідними штамми та ізолятами.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Запропоновано для досліджень вірусних популяцій доступний метод селекції отримання клонів, керуючись при цьому «Методичними рекомендаціями по клонуванню ентеровірусів свиней у культурі клітин за допомогою методу бляшкоутворення», які затверджені вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН України (протокол № 9 від 05.11.2013 р.) і науково-методичною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України (протокол № 1 від 19.12.2013 р.).

2. Запропоновано для культивування ентеровірусів свиней гетерологічну перещеплювану культуру клітин Her-2 (патент на корисну модель № 101245 від 25.08.2015 р.; заявл. 22.04.2015 № u 201503820).

3. Запропоновано для наукових та практичних вірусологічних досліджень стійкі клоновані варіанти ентеровірусів свиней.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Демиденко І. Ф. Внутрішньотипова антигенна характеристика штамів ентеровірусів свиней / І. Ф. Демиденко // Ветеринарна біотехнологія. – 2011. – № 18. – С. 60–64.

2. Романенко В. П. Клонування ентеровірусів свиней / В. П. Романенко, **І. Ф. Демиденко** // Вісник аграрної науки. – Київ – 2011. – № 12. – С. 33–36. *(Здобувач особисто виконала експериментальні дослідження, аналіз та узагальнення результатів).*

3. Розповсюдження ентеровірусів свиней у господарствах України / В. П. Романенко, Ю. І. Пущик, В. І. Божок, Л. М. Музикіна, **І. Ф. Демиденко**, О. В. Романяк // Ветеринарна біотехнологія. – 2012. – № 20. – С. 157–164. *(Здобувачу належить частка досліджень щодо вивчення розповсюдження ентеровірусів свиней у господарствах України).*

4. Демиденко І. Ф. Клонування ентеровірусів свиней і порівняльне вивчення генетичних властивостей одержаних клонів / І. Ф. Демиденко // Ветеринарна біотехнологія. – 2013. – № 22. – С. 133–139.

5. **Демиденко І. Ф.** Методичні підходи по відборі проб від свиней в господарствах і виділення з них ізолятів ентеровірусів свиней / **І. Ф. Демиденко**, В. І. Божок // Ветеринарна біотехнологія. – 2014. – № 24. – С. 38–40. *(Здобувач представила наукові розробки щодо методичних підходів із відбору проб і виділення з них ізолятів ентеровірусів свиней).*

Стаття у науковому виданні іншої держави

6. Демиденко І. Ф. Характеристика штаммов ентеровірусів свиней по маркерному признаку D / І. Ф. Демиденко // Ученые записки учреждения образования Витебская государственная академия ветеринарной медицины: научно-практический журнал. – Витебск: УО ВГАВМ, 2011. Вып. 2 – Т. 47, Ч.1. – С. 21–23.

Статті в інших наукових виданнях:

7. Демиденко І. Ф. Внутрішньовидова характеристика штамів ентеровірусів свиней / І. Ф. Демиденко // Сільськогосподарська мікробіологія: здобутки та перспективи: зб. наук. праць (до 50-річчя від дня заснування Інституту сільськогосподарської мікробіології НААН); відповідальний редактор В. В. Волкогон). – Чернігів, 2011. – С. 375–379.

8. **Демиденко І. Ф.** Роль генетичних маркерів у дослідженнях штамів ентеровірусів свиней / **І. Ф. Демиденко**, В. П. Романенко // Науковий вісник НУБіП України. Серія «Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва». – 2013. – Вип. 188, Ч. 4. – С. 27–32. *(Здобувач провела експериментальні дослідження, брала участь в інтерпретації отриманих результатів).*

Тези наукових доповідей:

9. Екологічна роль ентеровірусів свиней / В. П. Романенко, **І. Ф. Демиденко**, Ю. І. Пущик, Л. М. Музикіна: матеріали V Всеукр. наук.-практ. конф. молодих учених [«Екологічні проблеми сільськогосподарського виробництва»], (Яремче, 21–24 червня 2011 р.). – Яремче, 2011. – С. 186–187. *(Здобувач представила дані щодо екологічного значення ентеровірусів свиней у навколишньому середовищі).*

10. Демиденко І. Ф. Сравнительное изучение клонов ентеровирусов свиней по ряду маркирующих признаков / І. Ф. Демиденко // Молекулярная диагностика: сборник трудов. – М: ООО «Изд-во МБА», 2014. – Т.2 – С. 501–503.

11. Демиденко І. Ф. Диференційне дослідження клонів ентеровірусів свиней за маркерними ознаками / І. Ф. Демиденко: матеріали наук.-практ. конф. молодих вчених [«Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин»], (Київ, 26 червня 2014 р.). – Київ, 2014. – С. 38–40.

Методичні рекомендації

12. Романенко В. П. Методичні рекомендації по клонуванню ентеровірусів свиней у культурі клітин за допомогою методу бляшкоутворення / В. П. Романенко, **І. Ф. Демиденко**. – Затв. Державною ветеринарною та фітосанітарною службою України, протокол № 1 від 19.12.2013 р. – К.: Вид-во «Бліц-Інформ», 2013. – 24 с. (*Дисертант провела дослідження з культивування та клонування ентеровірусів свиней*).

Патент на корисну модель

13. Пат. 101245 Україна, МПК С12N 5/00. Спосіб культивування ентеровірусів свиней у культурі клітин Нер-2 / **І. Ф. Демиденко**, В. П. Романенко; заявник і патентовласник Інститут ветеринарної медицини НААН України. – № u 201503820; заявл. 22.04.2015; опубл. 25.08.2015, Бюл. № 16.

АНОТАЦІЯ

Демиденко І. Ф. Виділення та клонування ентеровірусів свиней. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія. – Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2015.

У дисертації наведено результати виділення та клонування ентеровірусів свиней різних серотипів. Представлена можливість культивування ентеровірусів свиней у гетерологічній культурі клітин Нер-2. Запропоновано виділення клонів ентеровірусів свиней методом бляшок.

За допомогою дослідження маркерних ознак проведено диференційне порівняння виділених клонів із референтними штамами та ізолятами ентеровірусів свиней. Так, вивчено морфологічну характеристику виділених клонів за маркерами S, p^t, p^f, p^s та p^r; проведено оцінку виділених клонів щодо референтних штамів/ізолятів ентеровірусів свиней за маркером Ts (терморезистентність); досліджено ступінь атенуації виділених клонів за допомогою маркеру rct (термочутливість); визначено імуноспецифічність сироваток крові кролів, одержаних до референтних штамів, ізолятів та клонів, і встановлено ступінь домінантності виділених клонів над вихідними штамами/ізолятами.

Отже, за проведеними експериментами встановлено, що з одного штаму ентеровірусів свиней методом селекції можливо виділити клоновані варіанти, які будуть антигенно спорідненими із вихідним штамом, але більш стійкими до дії різних чинників і матимуть вищу антигенну активність.

Ключові слова: ентеровіруси свиней, штами, ізоляти, клони, серотипи, маркери, культури клітин, бляшки, пасажі, інфекційні титри.

АННОТАЦИЯ

Демиденко И. Ф. Выделение и клонирование энтеровирусов свиней. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология, эпизоотология, инфекционные болезни и иммунология. – Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2015.

В диссертации представлены материалы по выделению и клонированию энтеровирусов свиней различных серотипов (классификация по В. Ф. Романенко, 1993).

Проведено выделение изолятов вирусов из ректальных смывов, отобранных от свиней в благополучном и неблагополучном по энтеровирусным заболеваниям хозяйствах. Доказана, при помощи действия ингибитора нуклеиновых кислот 5-бром-2-дезоксисуридина, принадлежность выделенных изолятов к РНК-содержащим вирусам.

Адаптированы к культуре клеток СПЭВ выделенные изоляты энтеровирусов свиней. Для исследований отобраны штаммы и прототипные им изоляты с соответствующими инфекционными титрами: *Konratice* – $9,08 \pm 0,23 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; *Перечинский-642* – $8,58 \pm 0,09 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; *Березнянский-652* – $8,92 \pm 0,30 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; *Черниговский-2372* – $6,67 \pm 0,23 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и изолят 1-го серотипа – $8,17 \pm 0,18 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; *T80* – $8,75 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и изолят 2-го серотипа – $8,0 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; *V13* – $8,58 \pm 0,16 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и изолят 8-го серотипа – $8,25 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

С помощью метода бляшек проведено селекцию клонов энтеровирусов свиней. Клоны №№ 1, 2, 3, 9 образовывали бляшки больших и средних размеров (2,0–5,0 мм) и характеризовались r^t -маркером, клоны №№ 4, 5, 6, 7, 8 индуцировали бляшки мелких размеров (1,0–1,5 мм) и обладали r^s -маркером, клон № 10 образовывал бляшки мелких размеров (1,0 мм) и характеризовался r^t -маркером.

Охарактеризован процесс адаптации выделенных клонов к гетерологичной культуре клеток Нер-2. Доказано, что для репродукции и накопления энтеровирусов свиней можно использовать, кроме гомологичной культуры клеток СПЭВ, и гетерологичную культуру клеток Нер-2.

При исследовании последующих маркерных признаков выделенных клонов отмечено увеличение их устойчивости к прогреванию в присутствии 1М MgCl_2 по сравнению с референтными штаммами и изолятами. Установлено, что все выделенные клоны характеризовались Ts^+ -признаком, то есть были терморезистентными в присутствии катионов Mg^{2+} . При исследовании rct^{40} -маркера выявлено, что все клоны, за исключением № 8 и № 10 (с незначительной степенью аттенуации), оказались высокоаттенуированными.

Антигенную активность выделенных клонов энтеровирусов свиней определяли по титрам специфических антител в сыворотках крови иммунизированных кроликов в реакции нейтрализации. Установлено, что

иммунные сыворотки имели титры вируснейтрализующих антител к референтным штаммам – 1:512–1:2048, к изолятам – 1:256–1:512, тогда как титры вируснейтрализующих антител к выделенным клонам референтных штаммов составляли 1:1024–1:4096 и к клонам изолятов – 1:1024–1:2048. Антигенное родство и доминантность выделенных клонов с референтными штаммами и изолятами энтеровирусов свиней определяли в перекрестной реакции нейтрализации. Установлено, что антигенная разница колебалась в пределах 5–14 %, но отмечалось доминирование клонов над исходными штаммами и изолятами.

В диссертационной работе теоретически и экспериментально доказано, что с помощью клонирования вирусов методом бляшек возможно получить клоны вирусов, которые обладают более устойчивыми свойствами, чем исходные штаммы.

Ключевые слова: энтеровирусы свиней, штаммы, изоляты, клоны, серотипы, маркеры, культуры клеток, бляшки, пассажи, инфекционные титры.

ABSTRACT

Demydenko I. F. Isolation and cloning of porcine enteroviruses. – In the manuscript.

The thesis for the degree of candidate of veterinary sciences, specialty 10.00.03. – Veterinary Microbiology, epizootology, infectious diseases and immunology. – National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

The thesis presents the results of isolation and cloning of different porcine enteroviruses serotypes. Presented opportunity cultivation porcine enteroviruses in heterologous cell culture of Hep-2. proposed allocation clones porcine enteroviruses using the method of plaques.

Through research carried differentiated characters in comparison of selected clones of isolates and reference strains of porcine enteroviruses. so studied the morphological characteristics of the selected clones by markers S, p^t, p^f, p^s, p^r; selected clones evaluated on reference strains/isolates of porcine enteroviruses by marker Ts (thermo resistant); set the degree of attenuation of selected clones using marker rct (thermal sensitivity); determined the immunospecificity of serum blood of rabbits obtained to reference strains, isolates and clones and set the degree of dominance selected clones of the original strains/isolates.

Therefore, in the experiment conducted was found that one strain of porcine enteroviruses that may select by the method of breeding cloned variants, that are antigenically related with the original strain, but more resistant to various factors and have a higher antigenic activity.

Keywords: porcine enteroviruses, strains, isolates, clones, serotype, markers, cell culture, plaques, passages, infectious titres.