

УДК 619:616.988.14:616-018:636.7
© 2018

М.Л. РАДЗИХОВСЬКИЙ,
кандидат ветеринарних наук

Житомирський національний
агроєкологічний університет,
Україна
E-mail: nickvet@ukr.net

Старий бульвар 7, м. Житомир

ПОРІВНЯННЯ ЧУТЛИВОСТІ
ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ ЛІНІЙ
КУЛЬТУР КЛІТИН
ДО КОРОНАВІРУСУ СОБАК

Висвітлюються дані про можливість застосування перещеплюваних ліній культур клітин СПЕВ, ВНК-21, РК-13 і їх чутливість для культивування та накопичення коронавірусу собак, отриманого з польового ізоляту. Визначено терміни й інтенсивність прояву цитопатогенної дії на різних лініях культур клітин. Перед проведенням культуральних досліджень лабораторно підтверджено моноінфікованість шляхом проведення ІФА. Цитопатогенну дію вірусу відмічали через 48 год після внесення його на культуру клітин. У лінії культур клітин ВНК-21 та РК-13 реєстрували більш інтенсивний процес руйнування клітин, де на 5–6 добу майже стабільно фіксували 90–100%-кову цитопатогенну дію вірусу, а титр інфекційної активності зростає з кожним новим пасажем вірусного матеріалу.

Ключові слова: коронавірус собак, польовий ізолят, культуральні властивості, цитопатогенна дія, СПЕВ, ВНК-21, РК-13.

Постановка проблеми. Віруси не зростають на штучних поживних середовищах, а розмножуються тільки внутрішньоклітинно. Культури клітин – найбільш досконала з лабораторних систем для культивування вірусів. Методика культивування клітин особливо успішно стала розвиватися після 40-х років минулого століття. Цьому сприяли такі обставини, як відкриття антибіотиків, що запобігають бактеріальній контамінації культур клітин; відкриття Хуангом (1943) і Ендерсом (1949) здатності вірусів викликати специфічну деструкцію клітин (цитопатичний ефект) – зручний метод індикації вірусів у культурах клітин і, нарешті, Дульбекко і Фогт (1952) запропонували методику трипсинізації тканин і отримання одношарових культур клітин [1, 2].

Коронавірус являє собою одноланцюговий РНК-вмісний вірус, який здатний інфікувати людей та значну кількість ссавців, у тому числі й собак. Філогенетична характе-

ристика коронавірусів включає такі різновиди, як альфа-, бета-, гама- та дельта-коронавірус [3]. Стосовно собак, то на сьогодні відомий альфа-вірус, тропізм якого характеризується ураженням шлунково-кишкового тракту, і нещодавно ідентифікований бета-коронавірус, який вражає респіраторну систему. У рідких випадках коронавірус проявляє пантропність, у таких випадках захворювання важко діагностуються і часто призводять до швидкої загибелі собак [4–6].

Натепер більшість коронавірусів, виділених від собак, культивують *in vitro* на культурах клітин, отриманих з органів собак і котів [7, 8].

Відомо, що віруси розмножуються лише у живих клітинах, і виділення збудника в зараженій культурі клітин є одним з основних методів у діагностиці вірусної інфекції, а також у разі визначення інфекційних властивостей вірусів [9]. Проблема полягає в недостатньо глибокому вивченні біологічних

властивостей коронавірусу собак, зокрема культуральних властивостей та можливостей отримання і накопичення культурального антигену, придатного для удосконалення діагностики даного захворювання в собак.

Метою нашої роботи було виділення ізолятів коронавірусу собак з патологічного матеріалу та визначення найбільш чутливу лінію культур клітин для подальших наукових досліджень з вивчення біологічних властивостей збудника.

Матеріал і методика досліджень. Для виділення коронавірусного антигену з патологічного матеріалу та накопичення вірусного матеріалу використовували перещеплювані лінії культур клітин СПЕВ (нирки ембріона свині), ВНК-21 (фібробласти нирки сирійського хом'яка), РК-13 (нирки кроля) [10]. Методи діагностики: 1) вірусологічні – виділення та ідентифікація вірусів з використанням клітинних культур. Клітини вирощували в скляних і пластикових матриксах об'ємом 25, 50 і 100 мл; 2) мікробіологічний – проведення посівів з патологічного матеріалу для визначення бактеріальної контамінації та антибіотикочутливості виявлених мікроорганізмів [11–13]. Інфекційний титр розраховували за методом Ріда і Менча [14, 15].

Результати дослідження та їх обговорення. Роботу з культурами клітин у стерильних умовах спеціалізованого міні-боксу під ультрафіолетовим випромінюванням проводили у вірусологічній лабораторії факультету ветеринарної медицини Житомир-

ського національного агроєкологічного університету.

Для виділення вірусного ізоляту використовували фрагмент кишечника собаки після евтаназія. Тварина хворіла на коронавірусний ентерит. Кишечник з умістом був відібраний під час проведення патолого-анатомічного розтину і розміщений в посуді з фізіологічним розчином. Розморожений матеріал подрібнювали, розтираючи в ступці зі стерильним кварцовим піском, розводили розчином Хенкса (1:10). Від великих часток звільняли шляхом центрифугування протягом 20–30 хв за 2500 об./хв ($g = 800$). Далі надосадову рідину відбирали, до осаду додавали антибіотики (1000 ОД пеніциліну і стрептоміцину на 1 мл) і поміщали в холодильник за температури 4 °С на 60 хв. Контроль ефективності такої обробки проводили за допомогою посіву на поживні середовища для аеробів, анаеробів і грибів. Після отримання негативного результату бактеріологічного контролю вірусемісний матеріал використовували для зараження культур клітин.

В експерименті використовували культури клітин: нирка хом'яка (ВНК-21), нирка кролика (РК-13) і нирка свині (СПЕВ) – рис. 1.

Для інкубації вірусемісного ізоляту найбільш чутливими виявилися свіжопересіяні, після 24-годинної інкубації, з не менш 70- і не більше 80%-вим моношаром клітин. Контроль за кількістю внесених клітин під час пересівання проводили з використанням камери з сіткою Горяєва. Найбільш

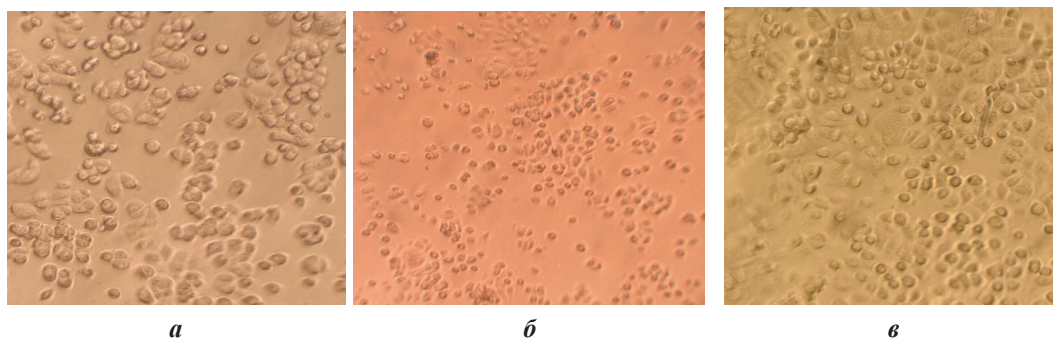


Рис. 1. Культури клітин після пересіву (12 год):
а – РК-13; б – ВНК-21; в – СПЕВ ×56

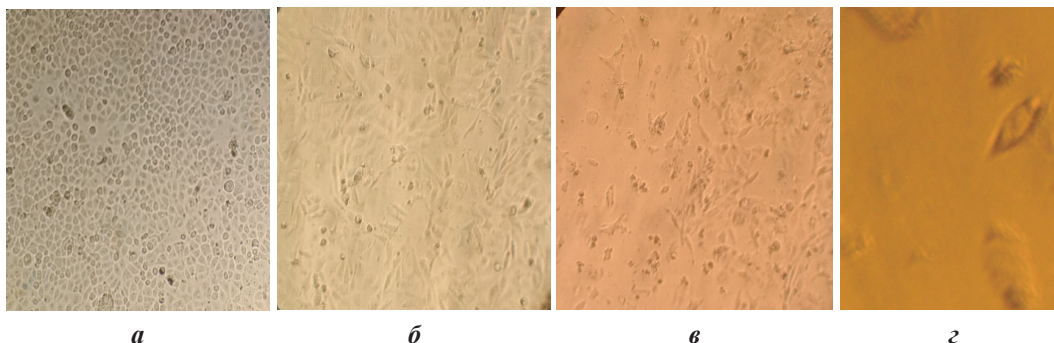


Рис. 2. Вплив коронавірусу на культуру клітин ВНК-21: а – перед зараженням; б – 36–48 год після зараження, стан КК; в – 3–4-та доба після зараження, стан КК; з – 5 та 6 доба після зараження, стан КК $\times 56$

оптимальною була посівна концентрація від $1,0 \times 10^5$ до $2,0 \times 10^5$ кл./мл. Для культивування перещеплюваних ліній культур клітин, використовували живильне середовище, до складу якого входили середовища 199 і ДМЕМ – по 45 %, фетальної бичачої сироватки – 10 % і антибіотики. Підтримуюче середовище для зараженої культури клітин було такого самого складу, як і поживне, тільки без сироватки. Культивування проводили за загальноприйнятими методиками, оцінюючи цитопатогенну дію (ЦПД) по системі чотирьох плюсів під інвертованим мікроскопом за малого збільшення, відносно контролю.

Найпростішими ознаками, які свідчать про розмноження вірусу, є дегенеративні зміни у клітинах, тобто прояв ЦПД вірусу. Утворення видимих морфологічних змін у клітині називають цитопатогенним ефектом або дією. Цитопатогенні зміни в інфікованих культурах клітин залежать від біологічних властивостей і дози досліджуваного вірусу.

Цитопатогенна дія коронавірусу проявлялася в такій послідовності: пригнічення процесів ділення клітин, часткове зморщування їх, затемнення у вигляді аглютинації клітин. Після – розвиток класичних змін: деструкція клітин шляхом їх витягування і набування форм “зірки”; за цим слідував розрив стінки клітини (рис. 2).

Інкубацію коронавірусів на культурах клітин проводили не більше 10 діб за темпе-

ратури $37,5\text{ }^\circ\text{C}$, контролюючи стан моношару клітин кожні 24 год.

У результаті нашого експерименту встановлено, що найбільш чутливою лінією культур клітин для культивування коронавірусу собак були нирка кроля і нирка хом’яка після третього пасажу, а перші три пасажі більш чутливою була культура клітин нирки свині. Репродукцію коронавірусу на культурі клітин контролювали за часом прояви ЦПД, яка безпосередньо залежала від густоти моношару клітин: 70%-вого – через 48 год за 80%-вого – через 72 год, а якщо понад 90%-вий моношар, то деструкція клітин перебігала досить мляво, доводилося інкубувати культуру до 10 діб. У кінці періоду інкубації інфіковану культуру заморожували за температури мінус $24\text{ }^\circ\text{C}$ і відтаювали, щоб зруйнувати структуру клітин і забезпечити повний вихід вірусу.

Чутливість клітинних ліній визначали не тільки за проявом ЦПД вірусу на клітини, а й за рівнем накопичення вірусу в клітинній суспензії. Титр інфекційної активності матеріалу визначали шляхом титрування вірусного матеріалу в культурі клітин на стерильних 96-лункових мікропланшетах.

За інкубації коронавірусу собак на перещеплюваних лініях культур клітин ВНК-21 та РК-13 інфекційний титр становив у середньому від $1,2\text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}$ (перший пасаж) до $3,7 \pm 0,03\text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}$ (третій), а після п’ятого пасажу – до $4,8 \pm 0,04\text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}$.

Висновки

Під час виділення польових ізолятів коронавірусу собак від хворих тварин з патологічного матеріалу найбільш чутливими є лінії перещеплюваних культур клітин ВНК-21 та RK-13, де після адаптації вірусу цитопатогенну дію відмічали через 48 год інкубації, а на 5–6-ту добу – 90–100%-ву цитопатогенну дію, при цьому титр інфекційної активності зростає з кожним новим пасажем вірусного матеріалу і до п'ятого становив $4,8 \pm 0,04 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}$.

Отримання культурального антигену з польового ізоляту і накопичення дають можливість його апробації в різних сферах. Нині триває широке використання культур клітин в різних областях медицини і біології для приготування діагностичних препаратів та тест-систем, за допомогою яких можна поставити діагноз і визначити напруженість імунітету шляхом виявлення антитіл.

Бібліографія

1. Сергеев В.А. Вирусы и вирусные вакцины. / В.А. Сергеев, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер. – М., 2007. – 524 с.
2. Тилли Л. Болезни кошек и собак: перевод с англ. / Л. Тилли, Ф. Смит мл.; под ред. Е.П. Копенкина. – М.: ГЭОТАР-Медиа., 2010. – 838 с.
3. Inhibition of RANTES expression by indirubin in influenza / N. Mak, C. Leung, X. Wei [et al.] // *Biochemical Pharmacology*. – 2004. – P. 167–174.
4. Characterization of a recombinant canine coronavirus with a distinct receptor-binding (S1) domain / Andrew D. Regan, Jean K. Millet, Long Ping V. Tse [et al.] // *Virology*. – 2012. – № 430(2). – P. 90–99.
5. Rottier Peter J.M. The Evolutionary Processes of Canine Coronaviruses [Electronic resource] / Peter J.M. Rottier // *Advances in Virology*. – 2011. – Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3265307/>.
6. Pratelli A. Cirone Francesco The Polarity of Entry and Release of Canine Coronavirus From Epithelial Cells / A. Pratelli // *Biomed J. Sci and Tech Res*. – 2018. – № 2(1). – P. 1–2.
7. Genotypic Characterization of Canine Coronaviruses Associated with Fatal Canine Neonatal Enteritis in the United States / Beth N. Licitra, Gary R. Whittaker, Edward J. Dubovi [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2014. – № 12(52). – P. 4230–4238.
8. Peter J.M. Rottier Feline and Canine Coronaviruses: Common Genetic and Pathobiological Features [Electronic resource] / J.M. Peter // *Advances in Virology*. – 2011. – Access mode: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/609465>.
9. Licitra Beth N. Canine Enteric Coronaviruses: Emerging Viral Pathogens with Distinct Recombinant Spike Proteins / Beth N. Licitra, Gerald E. Duhamel, Gary R. Whittaker // *Journal viruses*. – 2014. – № 6. – P. 3363–3376.
10. Каталог колекції клітинних культур / [С.Г. Юрков та ін.]. – Покров: ВНДІВВІМ., 2000. – С. 59–63.
11. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищих медичних навчальних закладів / За ред. В.П. Широкобокова. – Вінниця: Нова книга, 2011. – 952 с.
12. Поліщук В.П. Посібник з практичних занять до курсу “Загальна вірусологія” / В.П. Поліщук, І.Г. Будзанівська, Т.П. Шевченко. – К.: Фітосоціоцентр, 2005. – 204 с.
13. Колешко О.И. Микробиология с основами вирусологии / О.И. Колешко, Т.В. Заверзенова. – Иркутск, 1999. – 452 с.
14. Белоусова Р.В. Практикум по ветеринарной вирусологии / Р.В. Белоусова, Н.И. Троценко, Э.А. Преображенская. – М.: Колос, 2006. – 248 с.
15. Белоусова Р.В. Ветеринарная вирусология / Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская, И.В. Третьякова. – М.: Колос, 2007. – 424 с.