

относится к грубоволокнистой (ретикулофиброзной) ткани с признаками обызвествления, пластинчатая неваскуляризована, остеонный структуры в ней не образуются. Структурно-функциональной единицей костной ткани является остеоцитарного балки. Последние соединены многочисленной сетью канальцев, покрытые костными клетками плоской формы. Надкостницы представлено единичными хондроцитами и хондромукоидом. По периферии хрящевой ткани находятся фибробласты.

Ключевые слова: тритон, скелетная ткань, надкостница, остеоциты, хондроциты

**FEATURES OF MORPHOLOGY OF SKELETAL TISSUE OF TRITON ORDINARY
(TRITURUS VULGARIS)**

Skrypka M. V., Zapeka I. E., Pasnichenko O. S., Sevasteev A. O.

The bone tissue of the femur and hip joint of Triton (Triturus vulgaris) refers to coarse fibrous (reticulofibrous) tissue with signs of enveloping, lamellar unvascularized, osteon structures in it are not formed. The osteocyte beams are the structural and functional unit of bone tissue. The latter are connected by a numerical mesh of tubules covered with bone cells of a flat form. The periosteum is represented by single chondrocytes and chondromucoid. On the periphery of the cartilage are fibroblasts.

Keywords: newt, skeletal tissue, ossicles, osteocytes, chondrocytes

УДК: 619:578:616.98.

**ІЗОЛЯЦІЯ ТА АДАПТАЦІЯ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ
ІНДИКІВ В СИСТЕМІ IN VITRO**

Мазуркевич В. І., Недосеков В. В.

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Годовський О. В.

ТОВ «БІОТЕСТЛАБ»

Салій О. О.

Київський національний університет технології та дизайну

В даній статті представлені результати дослідження по виділенню польового ізоляту вірусу інфекційного ринотрахеїту індиків. Описана методика ізоляції вірусу та його адаптація до різних культур клітин та ембріонів курей. Представлена ефективність системи ізоляції вірусу інфекційного ринотрахеїту індиків.

Ключові слова: культура клітин, інфекційний ринотрахеїт, первинна ізоляція

Актуальність. Метапневмовірусна інфекція птиці (МПВІП) – високо контагіозне респіраторне захворювання індиків, курей та інших видів домашньої та дикої птиці, яке характеризується ураженням верхніх дихальних шляхів у вигляді запальних процесів [4]. Існуючі методи ідентифікації вірусу дозволяють виявляти його за допомогою Культивуації на трахельній органній культурі (ТОК), ПЦР та ИФА.

Однак, у підготовці зразків для аналізу на першому етапі досліджень провідну роль відіграють методи ізоляції вірусу із досліджуваного матеріалу [1, 2, 8].

В світової практиці, існуючі методи первинної ізоляції вірусу МПВІП передбачають використання ембріонів яєць (in vivo) або культуру клітин

курячої трахеї (in vitro) [6]. В подальшому, виділений вірус, в одній з зазначених двох систем вірус адаптують до репродукції в клітинних системах [3].

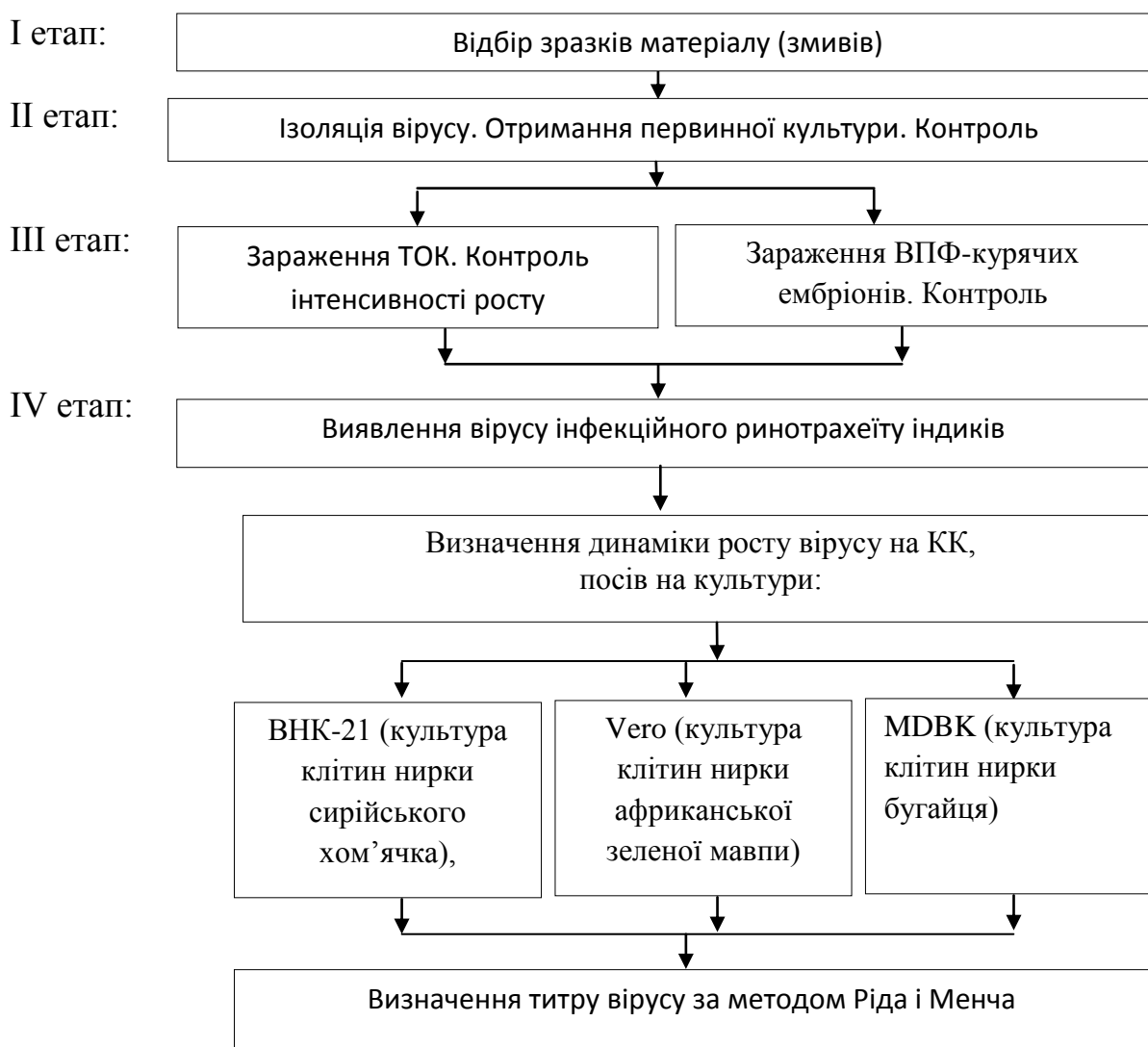
В сучасній вірусологічній практиці використовують культури клітин ВНК-21, MDBK, ФЕК та Vero з різною результативністю, що вимагає підбору ефективної клітинної системи [5, 7].

Мета роботи: виділити вірус інфекційного ринотрахеїту індиків з патологічного матеріалу та адаптувати його до вирощування в культурі клітин Vero для подальшого напрацювання для виготовлення вакцини.

Матеріали та методи. Як відомо, виділення вірусу – це складний мультиступеневий лабораторний процес, який включає в себе ряд послідовних процедур.

Схема досліду з отримання чистої культури вірусу наведена на рис. 1.

Рисунок 1. Схема досліду з встановлення ефективності методу адаптації вірусу МПВІІ до вирощування на культурі клітин Vero.



I етап: Ізоляція вірусу. У досліджах для виділення вірусу використано 152 зразки змивів з носоглотки, клоаки, гортані, трахеї та носових раковин від клінічно здорових індиків із господарств різних форм власності, розташованих

в 16 областях України. З кожного господарства, де у птиці були виявлені клінічні ознаки захворювання на метапневмовірус відбирали 8 проб.

Всі зразки, відібраної від кожної голови, об'єднували в одну ємність та центрифугували при 12000 об/хв. при 4°C. Після центрифугування відбирали супернатант, в якому досліджували наявність вірусу методом ПЛР зі зворотною транскрипцією.

За результатами дослідження наявність вірусу була підтверджена в одному зразку який був промаркований як TG-12.

Для первинної ізоляції зразки інокулювали на ТОК (трахеальну органну культуру) та на ВПФ курячі ембріони.

Зараження первинної культури (ТОК). Трахельну органну культуру отримували з 19–20 добових ВПФ курячих ембріонів за методикою, описаною Brenda V. Jones et al 2008.

Для кожного дослідження готували 15 матрасів з культурою клітин, 5 матрасів залишали як контроль патологічної дії вірусу.

Зразки вірусмісного матеріалу інокулювали на первинно трипсинізовану трахеальну органну культуру та інкубували при 37°C протягом 10 діб. Проводили три послідовні сліпі пассажі.

Інтенсивність росту вірусу оцінювали за наявністю ціліостазу.

Зараження ВПФ-курячих ембріонів. В дослідженні використовували 9-ти денні курячі ембріони, інкубовані з ВПФ-яєць (вільних від патогенної флори) виробництва компанії Valo (Німеччина).

Для кожного дослідження відбирали по 15 ембріонів, з них 10 ембріонів заражали зразками вірусу в жовтковий мішок та інкубували при 37° С протягом 6 днів, 5 ембріонів залишали як контроль патологічної дії вірусу. Проведено три послідовні сліпі пассажі.

Зараження перещеплюваних культур клітин (КК). Ізольований вірус вносили паралельно на три види КК: ВНК-21 (культура клітин нирки сирійського хом'ячка), Vero (культура клітин нирки африканської зеленої мавпи), MDBK (культура клітин нирки бугайця).

Для вирощування клітин використовували плашки площею 25 см² при 37° С та середовище Ігла з додаванням 10 % телячої сироватки крові. Моношар клітин вирощували до 85 % та інокулювали зразками вірусу. Адсорбували вірус протягом 1 години при 37° С, після чого замінювали ростове середовище та інкубували в термостаті при 37° С протягом 5 днів. Кожен день проводили контроль репродукції вірусу за допомогою інвертованого мікроскопу та відмічали наявність ЦПД вірусу. Таким чином, проводили 5 послідовних пассажів.

Після кожного пасажу відбирали проби клітин та супернатанту, які містили вірус після появи ЦПД або через 5 днів, якщо не було помітно ЦПД, та визначали титр вірусу в пробах за методом Ріда і Менча і виражали його у тканинних цитопатичних дозах (lg ТЦД₅₀/мл).

Визначення динаміки росту вірусу в КК. Динаміку росту вірусу в різних КК визначали культивуванням плашок з пробами протягом 12, 24, 36, 48, та 60 годин. Після закінчення терміну інкубації відбирали клітини та супернатант і

досліджували титр вірусу за методом Ріда і Менча і також виражали його у тканинних цитопатичних дозах (ТЦД₅₀/мл). Дослідження проводили у триплетах.

Результати досліджень та обговорення. *Ізоляція вірусу.* Після закінчення інкубування, ембріони розтинали та виявляли наявність патологоанатомічних змін у порівнянні із контролем.

У групи дослідних ембріонів не спостерігалось відставання в рості та геморагії на шкірі, також не була відмічена загибель після перших 24-х годин інкубації. Ці данні свідчать про відсутність активної дії вірусу при застосуванні даного методу накопичення.

В той же час 10 % ембріонів загинули і були вибракувані у перші 24 години через смерть від причин, не пов'язаних із зараженням.

ТОК проглядали під мікроскопом щоденно фіксуючи формування ціліостазу протягом трьох послідовних сліпих пасажів.

В результаті проведених досліджень встановлено, що вірус накопичувався в ТОК і не розвивався в ВПФ-КЕ.

Один зразок матеріалу було відправлено в Центр ветеринарної діагностики для підтвердження наявності вірусу МПВП та його ідентифікації. Матеріал, який залишився, застосували в наступних дослідах з адаптації до культур клітин та визначення динаміки росту в них.

Перед початком дослідження проводили визначення титру ізоляту вірусу МПВІ накопиченого в ТОК за допомогою десятикратних послідовних розведень та вираховували за методом Ріда і Менча. Отриманий результат становив 3,7 lg ТЦД₅₀/см³.

Зараження культури клітин. Дослідження проводили в КК ВНК-21, Vero та MDBK. Результати 5 послідовних пасажів наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Титри інфекційної активності ізоляту отримані в КК

№ пасажу	Титр (lg ТЦД ₅₀ /см ³) в культурі клітин		
	ВНК-21	Vero	MDBK
1	3,5	6,0	2,2
2	3,3	6,5	2,5
3	3,4	6,6	2,8
4	3,1	6,5	2,8
5	3,0	6,6	2,7

З даних таблиці видно що в КК Vero ізолят розвивався в значно вищих титрах (на 3 lg ТЦД₅₀/см³) ніж в ВНК и на 4 lg ТЦД₅₀/см³ ніж в MDBK.

Особливістю репродукції вірусу в клітинній системі Vero є рівень накопичення, який вже починаючи с першого пасажу був на стабільно високому рівні.

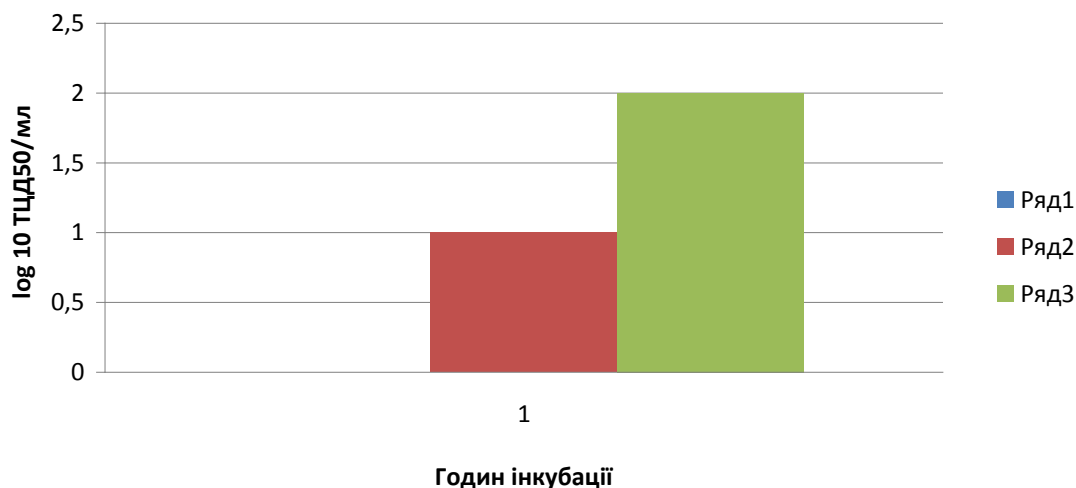
Даний факт свідчить про високу комитованість клітинної системи Vero, що робить застосування даної КК для ізоляції та репродукції вірусу

перспективним напрямком в діагностиці МПВІП.

На наступному етапі нами була проведена низка експериментів по дослідженню динаміки репродукції вірусу.

Визначення динаміки репродукції вірусу МПВІП в КК. Особливості репродукції вірусу в різних КК відображено в Діаграмі 1.

Динаміка репродукції вірусу в клітинних системах



З неведених даних видно, що ізолят накопичувався максимально в КК Vero на 36 годину та залишався на сталому рівні на 48 та 50 годину культивування. В той самий час ізолят повільно накопичувався в інших культурах клітин.

Висновки:

1. Таким чином, проведено моніторингові дослідження циркуляції вірусу МПВІП в господарствах різних форм власності і рівня виробництва. Показано, що від клінічно здорових індиків із господарств різних форм власності, розташованих в 16 областях України були відібрано 152 зразки змивів з носоглотки, клоаки, гортані, трахеї та носових раковин. Вдалося виділити один ізолят, що свідчить про низький рівень циркуляції вірусу МПВІП.
2. Отриманий ізолят TG-12 був виділений в титрі $\geq 3,7 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ на трахеальній органній культурі, що свідчить про її придатність до використання як первинного субстрату (системи *in vitro*) для ізоляції вірусу інфекційного ринотрахеї індиків на відмінну від ВПФ-КЕ.
3. Дослідження рівня репродукції вірусу МПВІП показали, що ізолят RT-12 накопичився в титрах $\geq 6,0 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ на культурі клітин Vero, в той самий час як на інших КК титри були $\leq 3,4 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, що дозволяє використовувати дану систему для подальшого вирощування вірусу у високих титрах для виготовлення вакцин.

4. Дослідження системи репродукції вірусу МПВІП *in vitro* довели перспективність даного напрямку досліджень в діагностиці та накопиченню вірусу для розробки імунобіологічних засобів для профілактики МПВІП.

Список літератури.

1. Isolation and characterization of a subtype C avian metapneumovirus circulating in Muscovy ducks in China/Sun et al.//Veterinary Research-2014-45:74;
2. Isolation and characterization of avian metapneumovirus from chickens in Korea/ Ji-Sun Kwon, Hyun-Jeong Lee, Seung-Hwan Jeong// Journal of veterinary science-2010-№11(1)-59-66;
3. Isolation of Avian Pneumovirus from an Outbreak of Respiratory Illness in Minnesota Turkeys/ Goyal S.M., Chiang S.J., Dar A.M., Nagaraja K.V., Shaw D.P., Halvorson D.A., Kapur V.// Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc-April, 2000. 12(2):166-8;
4. OIE Terrestrial manual, Chapter 3.3.15. Turkey rhinotracheitis (avian metapneumovirus infection);
5. Propagation of avian metapneumovirus subtypes A and B using chicken embryo related and other cell system/ Lia Treptow Coswiga, Marcia Bianchi dos Santosb, Hafez Mohamed Hafezc, Helena Lage Ferreirad, Clarice Weis Arns // Journal of Virological Methods, 2010. № 167. 1–4;
6. The preparation of Chicken tracheal organ culture for virus isolation, propagation, and titration/ Brenda V. Jones and Ruth M. Henion // Methods of Molecular Biology-2008;454:103-7.
7. Культивування вірусу ринотрахеїту індиків в культурі клітин VERO / В. І. Мазуркевич, В. В. Недосеков // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини, 2016. 33 с.
8. Mazurkevich V., Nedosekov V. Phylogenetic relations analysis of vaccine strain TG-12 of avian metapneumovirus Analiza filogenetyczna szczepu TG-12 – ptasiego, szczepionkowego metapneumowirusa // Aktualne problem w patologii drobiu – stare I nowe wyzwania istotne w produkcji drobiarskiej. Wroclaw, 2017. P. 169–173.

ISOLATION AND ADAPTATION OF INFECTIOUS TURKEY RHINOTRACHEITIS VIRUS IN THE IN VITRO SYSTEM

Mazurkevich V. I., Nedosekov V. V., Godovsky O. V., Saliy O. O.

This article presents the results of a study on the isolation of a field isolate of infectious turkey rhinotracheitis virus. The method of isolation of the virus and its adaptation to different cultures of cells and embryos of chickens is described. The efficiency of the system of isolation of the infectious rhinotracheitis virus of turkeys is presented.

Keywords: *cell culture, infectious rhinotracheitis, primary isolation.*

ИЗОЛЯЦИЯ И АДАПТАЦИЯ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА У ИНДЮКОВ В СИСТЕМЕ IN VITRO

Мазуркевич В. И., Недосеков В. В., Годовский О. В., Салий Е. А.

В данной статье представлены результаты исследования по выделению полевого изолята вируса инфекционного ринотрахеита индеек. Описанная методика изоляции вируса и его адаптация к разным культурам клеток и эмбрионов кур. Представлена эффективность системы изоляции вируса инфекционного ринотрахеита индеек.

Ключевые слова: *культура клеток, инфекционный ринотрахеит, первичная изоляция.*