

с. 2. Микуленок, В. Г. Использование стандартных и адресных комбикормов в рационах крупного рогатого скота : учебно-методическое пособие / В. Г. Микуленок, А. В. Жалнеровская. - Витебск : ВГАВМ, 2014. – 57 с.

Статья передана в печать 10.08.2018 г.

УДК 619:616.988.14:616-018:636.7

СРАВНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК К ПАРВОВИРУСУ СОБАК

*Радзиховский Н., *Дышкант О., **Бахур Т., ***Столярова Ю.

*Житомирский национальный агроэкологический университет, Украина

**Белоцерковский национальный аграрный университет, Украина

***УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Развитие современной медицины и фармацевтики в значительной мере определяется наличием эффективных клеточных систем, позволяющих проводить эксперименты, осуществлять диагностику и био-производство с максимальным выходом продукции. В статье представлены данные об индикации полевого изолята парвовируса собак на территории Украины, выделенного в 2016 году из патологического материала павшего животного с характерными клиническими признаками. В данной статье описывается возможность применения перевиваемых культур клеток, а именно СПЭВ, ВНК-21, РК-13 и их чувствительность к полемому изоляту парвовируса собак. Показаны сроки проявления цитопатического действия на разных линиях культур клеток. Перед проведением культуральных исследований была лабораторно подтверждена моноинфицированность методом ИФА. Было определено, что цитопатогенное действие вируса отмечали через 72 часа после заражения, более интенсивный процесс разрушения клеток отмечали в линии культур клеток ВНК-21 и РК-13, где на 7–8 сутки почти стабильно фиксировали 90–100% цитопатогенного действия вируса, а титр инфекционной активности возрастал с каждым новым пассажем вирусного материала, и к пятому – вырос до $3,8 \pm 0,08 \lg \text{TCD}_{50}/\text{см}$. **Ключевые слова:** парвовирус собак, полевой изолят, культура клеток, СПЭВ, ВНК-21, РК-13.

COMPARISON OF SENSITIVITY OF TRANSPLANTABLE CELL CULTURES TO CANINAE PARVOVIRIDAE

*Radzikhovskii N., *Dyshkant O., **Bakhur T., ***Stolarova J.

*Zhitomir National Agroecological University, Ukraine

**Bila Tserkva National Agrarian University, Ukraine

***Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

The development of modern medicine and pharmaceuticals is largely determined by the availability of effective cellular systems, allowing experiments, diagnostics and bio-production with maximum yield. The article presents data on the indication of the field isolate of parvovirus of dogs on the territory of Ukraine, isolated in 2016 from a pathological fallen animal with characteristic clinical features. This article describes the possibility of using transplantable cell cultures, namely BHK-21, RK-13 and SKES cell line and their sensitivity to the field isolate of parvovirus dogs. The timing of the manifestation of cytopathic action on different lines of cell cultures is shown. Before carrying out the culture tests, the monoinfection in the ELISA was laboratory confirmed. It was determined that CPD was noted 72 hours after infection, a more intensive process of cell destruction was noted in the line of BHK-21 and RK-13 cell cultures, where on the 7–8th day 90–100% of the CPD were fixed almost stably, and the titer of infectious activity increased with each new passage of the viral material and increased to $3.8 \pm 0.08 \lg \text{TCD}_{50} / \text{cm}$ by the fifth. **Keywords:** caninae parvoviridae, field isolate, cell culture, SKES cell line, BHK-21 cell line, RK-13 cell line.

Введение. Энтеровирусы (от греческого слова *enteron* – кишка) наиболее многочисленный род, и наиболее распространенным среди собак является парвовирус.

Парвовирусный энтерит собак – высококонтагиозное вирусное заболевание, проявляющееся дегидратацией организма, геморрагическим гастроэнтеритом, миокардитом, лейкопенией и гибелью щенков в первые месяцы жизни. Парвовирус собак близок по антигенным свойствам к вирусу панлейкопении кошек [1–4].

Для выделения, адаптации и накопления парвовируса используют первично-трипсинизированные и перевариваемые культуры клеток. Успешное культивирование вирусов осуществляется в культурах клеток, полученных от чувствительных к этому вирусу животных. Наиболее эффективное размножение парвовируса собак происходит в клетках, полученных из органов собак и кошек, в том числе: в культурах клеток почки кошки или собаки, легкого норки, без проявления цитопатогенного действия. Но, по данным других исследователей, парвовирус собак способен проявлять цитопатогенное действие вируса (ЦПД) в клеточной линии почки кошки [5, 6].

Проблема энтеровирусной инфекции уже давно привлекала к себе внимание ученых разных стран в медицинской и ветеринарной практике. Актуальность этого вопроса неизменна до сегодняшнего дня. Энтеровирусные инфекции, как и многие другие, в течение определенного отрезка времени

изменяются. Эти изменения являются результатом стимулирующего или угнетающего действия абиотических, биотических и антропогенных факторов [7].

Существует большое количество серотипов энтеровирусов, которые имеют высокую способность к широкому диапазону эволюционных преобразований. Энтеровирусные инфекции характеризуются полиморфизмом клинических признаков. Один и тот же вирус способен вызвать несколько различных клинических синдромов. Несмотря на то, что в последние годы изучению энтеровирусов уделяется большое внимание, причины формирования высоковирулентных вариантов энтеровирусов, а также закономерности их циркуляции остаются недостаточно раскрытыми [8, 9].

Малочувствительными или нечувствительными к заражению энтеровирусами были культуры клеток: фибробластов эмбриона курицы и перепела, почки эмбриона свиньи и эмбриона коровы, тестикулы быка, почки крольчонка, легкого норки и почки быка [10, 11]. Для профилактики парвовирусной инфекции используют ряд вакцин, изготовленных на основе аттенуированных штаммов, адаптированных к культурам клеток, но наличие новых типов, которые отличаются нуклеотидным составом и чувствительностью к культуре клеток, требует постоянного мониторинга чувствительных биологических объектов для усовершенствования специфических биопрепаратов.

Целью работы явилось выделение изолятов парвовируса собак из патологического материала и подбор наиболее чувствительной линии культур клеток для дальнейших научных исследований по изучению биологических свойств возбудителя.

Материалы и методы исследований. Для выделения парвовирусного антигена из патологического материала и наработки вирусного материала, использовали: перевиваемые культуры клеток СПЭВ (почки эмбриона свиньи), ВНК-21 (фибробласты почки сирийского хомяка), РК-13 (почки кроля).

Методы диагностики: 1. Вирусологический, а именно выделение и идентификация вирусов с использованием клеточных культур или куриных эмбрионов, заражением лабораторных животных. Клетки выращивали в стеклянных и пластиковых матрасах объемом 25, 50 и 100 мл.

2. Микробиологический (проведение посевов из патологического материала для определения бактериальной контаминации и антибиотикочувствительности выявленных микроорганизмов) [12–14].

Расчет инфекционного титра вычисляли по методу Рида и Менча [15].

Результаты исследований. Работа проводилась на факультете ветеринарной медицины Житомирского национального агроэкологического университета в специализированной лаборатории. Все работы с культурами клеток проводили в специализированном мини-боксе под ультрафиолетовым излучением.

Для выделения вирусного изолята использовали фрагмент кишечника собаки, павшей от парвовируса. Кишечник с содержимым был отобран во время проведения патологоанатомического вскрытия, помещен в физиологический раствор и заморожен. После разморозки материал измельчали, растирая в ступке со стерильным кварцевым песком, разводя раствором Хенкса (1:10). От крупных частиц освобождались путем центрифугирования в течение 20–30 мин. при 2500 об./мин. ($g=800$). Далее надосадочную жидкость отбирали, к осадку добавляли антибиотики (1000 ЕД пенициллина и стрептомицина на 1 мл) и помещали в холодильник при 4°C на 60 мин. Контроль эффективности такой обработки проводили с помощью посева на питательные среды для аэробов, анаэробов и грибов. После получения отрицательного результата бактериологического контроля, вирусосодержащий материал использовали для заражения культур клеток.

В эксперименте использовали культуры клеток: почка хомяка (ВНК-21), почка кролика (РК-13) и почка свиньи (СПЭВ) (рисунок 1).

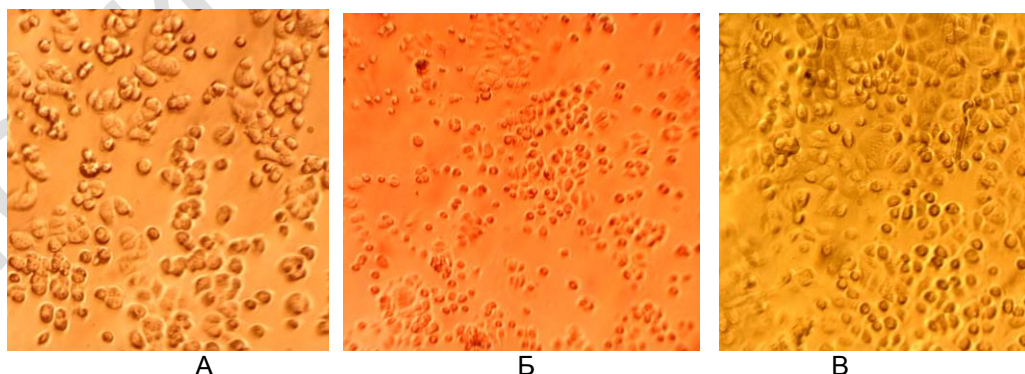


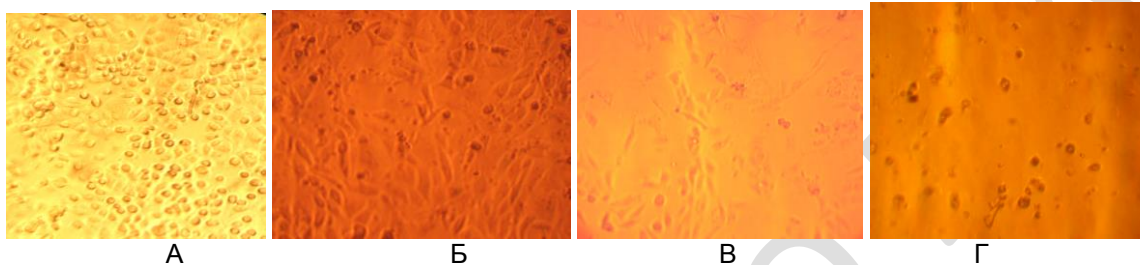
Рисунок 1 – культуры клеток, 12 часов после пересева (x56)
(А – РК-13, Б – ВНК-21, В – СПЭВ)

Было установлено, что для инкубации вирусосодержащего изолята наиболее чувствительными были свежепересеянные клетки, после 24-часовой инкубации, с не менее 70% и не более 80%-ным монослоем. Контроль за количеством внесенных клеток при пересеве проводили, используя камеру с сеткой Горяева. Наиболее оптимальной была посевная концентрация от $1,0 \times 10^5$ до $2,0 \times 10^5$ кл/мл.

Культивирование перевиваемых линий культур клеток проводили, используя питательную среду, в состав которой входили среда 199 и ДМЕМ – 90%, фетальной бычьей сыворотки – 10%, антибиотики. Поддерживающая среда для зараженной культуры клеток была такого же состава, как и питательная, только без сыворотки. Культивирование проводили по общепринятым методикам, оценивая цитопатогенное действие (ЦПД) по системе 4+ под инвертированным микроскопом, сравнивая с контролем.

Простейшим признаком, свидетельствующим о размножении вируса, являются дегенеративные изменения в клетках, то есть проявление ЦПД вируса. Наступившие видимые морфологические изменения в клетке называют цитопатогенным эффектом. Цитопатические изменения в инфицированных культурах клеток зависят от биологических свойств и дозы исследуемого вируса.

Цитопатогенное действие парвовируса проявлялось в такой последовательности: угнетение процессов деления клеток, частичное их сморщивание, образование затемнения в виде агглютинации клеток. После – развитие классических изменений, а именно деструкция клеток путем их вытягивания и приобретения форм «звезды», затем следовал разрыв стенки клетки (рисунок 2).



А – перед заражением; Б – 48-72 – часа после заражения, состояние культуры клеток;
В – 4-5-й день после заражения, состояние культуры клеток;
Г – 7-8-й день после заражения, состояние культуры клеток.

Рисунок 2 – Влияние парвовируса на культуру клеток RK-13 (x56)

Инкубацию энтеровирусов на культурах клеток проводили не более 10 суток при $t^0 37,5C^0$, контролируя состояние монослоя клеток каждые 24 часа с помощью микроскопа при увеличении $\times 56$ (рисунок 2). В результате нашего эксперимента было установлено, что наиболее чувствительной линией культур клеток были: почка кроля и почка хомяка после третьего пассажа, а в первые три пассажа более чувствительной была культура клеток почки свиньи. Репродукцию парвовируса на культуре клеток контролировали по времени проявления ЦПД, которое напрямую зависело от густоты монослоя клеток: при 70% – через 48 часов, при 80% – через 72 часа, а если более 90% монослой – деструкция клеток протекала довольно вяло, приходилось инкубировать культуру до 10 дней. В конце периода инкубации инфицированную культуру замораживали при температуре минус $24C^0$ и оттаивали, чтобы разрушить структуру клеток и обеспечить полный выход вируса.

Чувствительность клеточных линий определяли не только по проявлению ЦПД вируса на клетки, а и по уровню накопления вируса в клеточной суспензии. Титр инфекционной активности материала определяли путем титрования вирусного материала в культуре клеток на стерильных 96-луночных микропланшетах. Расчет инфекционного титра вычисляли по методу Рида и Менча. Были получены следующие результаты: в начале эксперимента титр составлял в среднем $1,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}$, после третьего пассажа вырос до $2,7 \pm 0,06 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}$, а после пятого – вырос до $3,8 \pm 0,08 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}$.

Заключение. Установлено, что при выделении полевых изолятов парвовируса собак от больных животных из патологического материала, наиболее чувствительными являются линии перевиваемых культур клеток ВНК-21 та RK-13, где после адаптации вируса цитопатогенное действие проявлялось через 72 часа инкубации; а на 7-8-й день отмечали 90-100% цитопатогенное действие; титр инфекционной активности возрастал с каждым новым пассажем вирусного материала, и к пятому вырос до $3,8 \pm 0,08 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}$.

В настоящее время продолжается широкое использование первичных культур клеток в различных областях медицины и биологии. Это диктует необходимость дальнейшего совершенствования способов получения и культивирования клеточных систем.

Культуры клеток необходимо использовать для приготовления диагностических препаратов тест-систем для выявления вирусов. На основе этого следует разрабатывать тест-системы, с помощью которых возможно определять напряженность иммунитета путем выявления антител.

Литература. 1. *Asymmetric binding of transferrin receptor to parvovirus capsids / S. Hafenstein [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2007. – Vol. 16. – P. 6585–6589.* 2. *Парвовирусы плотоядных и вызываемые ими болезни / Н. А. Власов [и др.]. – Ульяновск, 2000. – 37 с.* 3. *Vihinen-Ranta, M. Pathways of Cell Infection by Parvoviruses and Adeno-Associated Viruses / M. Vihinen-Ranta, S. Suikkanen, R. Colin Parrish // J. Virol. – 2004. – Vol. 78 (13). – P. 6709–6714.* 4. *Паразитарні та інфекційні хвороби м'ясоїдних тварин : навч. посіб. / Ю. Ю. Довгий, М. Л. Радзиховський, О. А. Дубова, Д. В. Фещенко, О. А. Нікітін, Т. І. Бахур, О. В. Дишкант, М. Ю. Довгий ; ред. Ю. Ю. Довгий. – вид. 2-е, переробл. і допов. – Житомир : Полісся, 2016. – 320 с.* 5. *Canine Parvovirus Types 2c and 2b Circulating*

in North American Dogs in 2006 and 2007 / S. Kapil [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2007. – Vol. 45 (12). – P. 4044–4047. 6. Pakkanen, K. Late steps of parvoviral infection induce changes in cell morphology / K. Pakkanen, J. Nykky, M. Vuento // J. Vet. Med. Sci. – 2008. – Vol. 137. – P. 271–274. 7. Кочетков, С. А. Разработка методов выявления генома энтеровируса и парвовирусов КРС : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.02 / С. А. Кочетков. – Владимир, 2010. – 17 с. 8. Investigation of a canine parvovirus outbreak using next generation sequencing / J. Parker [et al.] // J. scientific reports. – 2017. – doi:10.1038/s41598-017-10254-9. – Режим доступа: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-10254-9>. – Дата доступа: 04.06.2018. 9. Демина, А. В. Энтеровирусные инфекции: многообразие клинических проявлений / А. В. Демина, С. В. Нетесов. – Новосибирск, 2009. – 10 с. 10. Галкина, Т. С. Изучение биологических свойств полевых изолятов парвовируса собак / Т. С. Галкина // Ветеринарная патология. – 2007. – № 3. – С. 55–57. 11. Антонов, Б. И. Лабораторные исследования в ветеринарии, бактериальные инфекции / Б. И. Антонов, В. В. Борисова, П. М. Волкова. – М., 1986. – С. 279–326. 12. Амурсьева, Т. В. Инструкция по лабораторной диагностике энтеровирусных инфекций / Т. В. Амурсьева, Н. В. Поклонская, Е. П. Кишкурно. – Минск : ГУ РНМБ, 2005. – 28 с. 13. Собко, А. И. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных / А. И. Собко, А. А. Сюсюкин. – Москва, 1986. – С. 220–240. 14. Рахманин, П. П. Методические указания по применению перевиваемых клеточных культур для диагностики вирусных заболеваний сельскохозяйственных животных / П. П. Рахманин. – Москва, 1988. – 12 с. 15. Reed, L. J. A simple method of estimating fifty percent endpoints / L. J. Reed, H. Muench // Am. J. Hygiene. – 1938. – Vol. 27. – P. 493–497.

Статья передана в печать 23.07.2018 г.

УДК 636.2.034:083.1:612.1

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ ДОЙНЫХ КОРОВ В ПАСТБИЩНЫЙ ПЕРИОД

Рубина М.В.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Приведены результаты исследований содержания дойных коров на пастбище и постоянно в помещении беспривязным способом. Исследуются надои молока, травматизм и заболеваемость коров, изучаются некоторые показатели крови (общий белок, кальций, фосфор и каротин). Установлено, что животные, находившиеся на пастбище, имели более высокие удои, рентабельность молока, ниже заболеваемость. **Ключевые слова:** дойные коровы, продуктивность, биохимические показатели, условия содержания.

EFFICIENT MAINTENANCE OF DAIRY COWS IN GRAZING PERIOD

Rubina M.B.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

The results of research of the content of dairy cows in the pasture and constantly indoors a non-stick method. The milk yield, the injuries and the incidence of cows are investigated, some blood indices are studied (total protein, calcium, phosphorus and carotene). It is established that the animals that were on pasture had higher milk yield, profitability of the received milk, lower incidence. **Keywords:** dairy cows, productivity, biochemical indicators, conditions of keeping.

Введение. Существует много факторов, оказывающих влияние на производство молока. Одними из основополагающих факторов являются система и способ содержания животных, в том числе и система летнего содержания дойного стада. От этого зависит период использования маточного поголовья, ежегодная выбраковка коров, оплодотворяемость коров и телок, экономическая эффективность использования молочного стада и состояние воспроизводства.

Стойлово-выгульная система содержания коров применяется в тех зонах, где используется интенсивное земледелие с большой распаханностью земель. Также такая система может применяться в хозяйствах, которые не располагают обширными площадями земельных угодий, в том числе культурными пастбищами. При стойлово-выгульной системе предусматривается содержание животных круглый год привязно или беспривязно в помещениях, при этом необходимо организовывать им ежедневный активный моцион на выгульных площадках. В летний период все корма рациона, включая и зеленые корма, животным скармливают в помещениях из кормушек или на выгульно-кормовых площадках. Выгульные площадки разделяют на секции, учитывая разное физиологическое состояние коров. Чтобы обеспечить животных более доступными зелеными кормами, в хозяйствах применяют зеленый конвейер. Несмотря на то, что стойлово-выгульная система имеет много преимуществ по сравнению с другими системами содержания, практика работы крупных предприятий показала, что при нарушении технологии кормления и содержания животных, а также несоблюдении зооигиенических нормативов и ветеринарно-санитарных правил могут наблюдаться массовые заболевания животных, которые приводят к снижению молочной продуктивности коров в летне-пастбищный период. У животных могут наблюдаться групповые стрессы в борьбе за лидерство, увеличение числа травм, при такой системе трудно обеспечивать высокую воспроизводительную способность животных, поддерживать на высоком уровне ветеринарно-санитарное состояние помещений и территорию