УДК 57.043;578.81

М.Ю. Стегний[1]*, А.Н.Гольцев[2], Б.Т. Стегний[3]

Влияние продолжительности хранения в условиях умеренно низких температур на РНК штаммов вируса диареи крупного рогатого скота

UDC 57.043;578.81

M.Yu. Stegniy[1]*, A.N. Goltsev[2], B.T. Stegniy[3]

Influence of Duration of a Moderate Low Temperature Storage on RNA of Cattle Diarrhea Virus Strains

Изучали влияние продолжительности хранения в условиях умеренно низких температур (от –18 до –30°С) на возможность изменения нуклеотидных последовательностей их генома. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что в наиболее консервативном участке (5'- нетранслируемая область) генома вируса диареи крупного рогатого скота нуклеотидные последовательности не нарушаются как в случае хранения вируса при температурах в диапазоне от –18 до –30°С в течение 13 мес, так и при более длительном хранении (12 лет). В ПЦР с внешними праймерами не удавалось обнаружить продукты полимеразной цепной реакции, а при использовании внутренних праймеров длиной 195 пар нуклеотидов они были получены, что свидетельствует о деградации РНК в процессе хранения при умеренно низких температурах.

Ключевые слова: вирус диареи, умеренно низкие температуры, полимеразная цепная реакция.

Вивчали вплив тривалості зберігання в умовах помірно низьких температур (від –18 до –30°С) на можливість зміни нуклеотидних послідовностей їх геному. Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що в найбільш консервативній ділянці (5'- нетрансльована ділянка) геному вірусу діареї великої рогатої худоби нуклеотидні послідовності не порушуються як у випадку зберігання вірусу при температурах від –18 до –30°С протягом 13 міс, так і при більш тривалому зберіганні (12 років). У ПЦР із зовнішніми праймерами не вдавалося виявити продуктів полімеразної ланцюгової реакції, а при використанні внутрішніх праймерів довжиною 195 пар нуклеотидів продукти були отримані, що свідчить про деградацію РНК у процесі зберігання в умовах помірно низьких температур.

Ключові слова: вірус діареї, помірно низькі температури, полімеразна ланцюгова реакція.

There was studied the effect of storage duration under conditions of moderate low temperature (from –18 down to –30°C) on the possibility to change nucleotide sequence of their genome. Analysis of obtained results testify to the fact that within the most conservative site (15'-untranslated region) of cattle diarrhea virus genome the nucleotide sequences are not impaired both in case of virus storage at temperatures from –18 down to –30°C for 13 months and under longer storage term (for 12 years). In reaction with outer primers there was impossible to reveal the products of polymerase chain reaction and when using inner primers with the length of 195 pairs of nucleotides they were obtained, that confirmed the RNA degradation during storage of moderate low temperatures.

Key-words: diarrhea virus, moderate low temperatures, polymerase chain reaction.

Развитие метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет усовершенствовать лабораторную диагностику вирусных и бактериальных инфекций путем прямого обнаружения нуклеиновых кислот вирусов, прокариотов и эукариотов. В основе ПЦР лежит многократное повторение циклов удвоения (амплификация) специфического участка нуклеотидной последовательности. Главное достоинство метода – очень высокая чувствительность, в одноэтапной ПЦР с внешними праймерами позволяет выявить вирус в образцах

Development of the method of polymerase chain reaction (PCR) enables of improving laboratory diagnostics of virus and bacterial infections by direct revealing of nucleic acids of viruses, prokaryotes and eukaryotes. In the base of PCR there are multiple repetitions of the duplication cycles (amplification) of specific site of nucleotide sequence. The main advantage of the method is very high sensitivity, in one-stage PCR with outer primers it is possible to reveal virus in the samples with titer of 10^4-10^6 CPE $titer_{50/ml}$. Application of repeated PCR with inner

[1]Национальный фармацевтический университет, г. Харьков
[2]Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
[3]Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН, г. Харьков

* *Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:* ул. Пушкинская, 53, г. Харьков, Украина 61002; тел.:+38 (0572) 47-16-82, факс: +38 (0572) 47-01-64

[1]National University of Pharmacy, Kharkov, Ukraine
[2]Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine
[3]Institute of Experimental and Clinical Veterinary of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkov, Ukraine

* *To whom correspondence should be addressed:* 53, Pushkinskaya Str., Kharkov, Ukraine 61002; tel.: +380 572 47 1682, fax: + 380 572 47 0164

с титром 10^4-10^6 $ТЦД_{50/мл}$. Применение повторной ПЦР с внутренними праймерами (nested-PCR, гнездовая ПЦР) повышает чувствительность до 0,01 $ТЦД_{50/мл}$ [2]. Результат может быть получен в течение одного рабочего дня.

Полимеразная цепная реакция стала технологичной с началом использования ДНК-полимераз, выдерживающих многократный нагрев до 96°С, что позволяет проводить ее в автоматическом режиме в амплификаторе, обеспечивающем поддержание заданной температуры в реакционной смеси. Возможности ПЦР в идентификации ДНК и РНК-содержащих вирусов возросли в связи с выделением новой полимеразы из термофильного микроорганизма *Thermus thermofillus*, которая включает и полимеразную, и обратно транскриптазную активности. В связи с этим упрощается выявление РНК- содержащих вирусов в ПЦР.

Новый этап развития биотехнологии противовирусных препаратов и диагностических наборов требует высококачественного вирусного сырья, на основе которого эти препараты производятся. Было показано [4], что длительное хранение вирусных штаммов в условиях умеренно низких температур ведет к нарушению целостности их ультраструктуры, снижению биологической активности и иммуногенных свойств. По сравнению с вирусами парагриппа-3, вирус диареи крупного рогатого скота (ВД КРС) оказался более устойчивым при хранении в данных условиях и при кратковременном хранении заметных изменений ультраструктуры вируса не было выявлено. Следующим этапом исследований было изучение влияния продолжительности хранения штаммов вируса диареи на нуклеотидные последовательности их генома методом ПЦР.

По современной классификации ВД КРС относится к роду пестивирусов семейства *Flaviviridae* [1] вызывает вирусную диарею и болезнь слизистых чаще всего у телят в возрасте до полутора лет. Возможно также поражение взрослых животных. Смертность телят, самопроизвольные аборты, снижение продуктивности молочного животноводства наносят значительный экономический ущерб сельскому хозяйству [5]. В 90-х годах прошлого века в эпизоотических вспышках заболевания были обнаружены изоляты вирусов ВД КРС, которые имели гомологию всего лишь 70% в наиболее консервативной части генома (5'-нетранслируемая область) с референтными штаммами вируса. По этой причине было предложено разделить штаммы ВД КРС на два генотипа, к первому отнесли референтные штаммы, ко второму – вновь выявленные [5]. Определены антигенные различия между представителями двух генотипов.

primers (nested-PCR) increases sensitivity up to 0.01 CPE $titer_{50/ml}$ [2]. The result may be obtained within one working day.

PCR became technological procedure with the beginning of using DNA-polymerases, surviving multiple heating up to 96°C that allows to perform it automatically (with amplifier) providing the maintenance of set temperature in reaction mixture. PCR opportunities in identifying DNA and RNA-containing viruses have enhanced due to isolation of new polymerase from thermophilic microorganism *Thermus thermofillus* comprising both polymerase and reversible trans-criptase activities. In this connection the revealing of RNA-containing viruses with PCR is getting simpler.

New stage of biotechnological development for antivirus products demands high quality of virus raw materials, on those base these preparations are produced. It has been shown that long-term storage of viral strains under conditions of moderate low temperatures leads to the disorder in the integrity of their ultrastructure, reduction of biological activity and immunogenic properties in comparison with the viruses of para-grippe 3, diarrhea virus of cattle occurred to be more resistant during storage under mentioned conditions and at short-term storage there were not found manifested changes in virus ultra-structure. Next research stage is the studying of the effect of storage duration for strains of diarrhea virus (DV) on nucleotide sequences of their genome by means of PCR.

According to modern classification of cattle DV, referred to pestiviruses of the *Flaviviridae* [1], causes virus diarrhea and diseases of mucous membranes in calves aged under 18 months. The infection of more aged animals is also possible. Calves' death, spontaneous abortions, reduction of productivity of dairy farming have been done economic harm to agriculture. In the 90s of last century in epizootic outbreak of disease there were found the isolates of cattle DV, having only 70% homology in the most conservative part of genome (5'-untranslated region) with reference virus strains. Therefore it was proposed to divide cattle DV strains into two gene types: to the first one reference strains were referred, to the second one newly revealed ones [5]. Anti-gene differences between representatives of two gene types were determined.

Up to now the cattle DV strains are not divided into serotypes, however immune sera versus the strains of the first gene type do not neutralize infection properties of all the strains for the second gene type, that finally may be the cause of ineffective vaccination and appearance of diseases epizooties [5].

Research aim was to investigate the effect of storage duration under moderate low temperature (–18÷30°C) of cattle DV genome on the possibility to alter its nucleotide sequence.

До настоящего времени штаммы ВД КРС не подразделяют на серотипы, однако иммунные сыворотки против штаммов первого генотипа не нейтрализуют инфекционные свойства всех штаммов второго генотипа [4], что в конечном итоге может быть причиной неэффективной вакцинации и возникновения эпизоотий болезни [5].

Цель исследования – изучение влияния длительности хранения ВД КРС в условиях умеренно низких температур (от –18 до –30°С) на возможность изменения нуклеотидных последовательностей его генома.

Материалы и методы

Исследовали производственные штаммы вируса диареи "Орегон-С24V", эпизоотический "УНДІЕВ-25", предоставленные НИИ экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН, используемые для получения вакцин и диагностикумов.

Штаммы хранили при температуре от –18 до –30°С от 13 мес до 12 лет. ПЦР проводили в отделе вирусологии Государственного ветеринарного института г. Пулавы (Польша) согласно Договору о творческом сотрудничестве. После хранения в условиях умеренно низких температур вирус культивировали в течение трех дней на клетках MDBK (Государственный ветеринарный институт, г. Пулава, Польша) с добавлением 10%-й лошадиной сыворотки при температуре 37°С и 4% CO_2. Через 3-е суток наблюдали цитопатический эффект (ЦПЭ), культуральные сосуды с проявившимся ЦПЭ помещали в холодильник при –70°С. На первом этапе исследований после размораживания культуры тотально экстрагировали РНК с применением TRI (Total RNA Isolation System) фирмы "Sigma" по методике [3].

Второй этап – проведение обратной транскрипции РНК и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). При синтезе первой цепи комплементарной ДНК (к-ДНК) на вирусной РНК использовали РНК-зависимую ДНК- полимеразу из вируса миелобластоза птиц (AMV) по общепринятой методике [2]. Амплификация к-ДНК осуществлялась с применением специфичных для каждого вируса праймеров при оптимальных условиях.

Для вируса диареи ПЦР проводили с праймерами 324F (atg cccttagtaggactagca) и 326R (gtacat ggcacatgga gttga), локализованными в области 108-395 нуклеотидной последовательности, и праймерами 188F (gta gtcgtcagtg gttcg)-366R (atctc tgct gtacat ggc acatgga gttga), расположенными на участке 188-383 нуклеотидной последовательности.

Согласно [5] геном ВД КРС представляет собой однонитевую плюс-РНК величиной около 12500 нуклеотидов, хотя у некоторых изолятов вируса

Materials and methods

There were investigated industrial strains of diarrhea virus "Oregon-C24", epizootic one "UNDIEV-25" provided by R&D Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, used for obtaining vaccines and diagnostic preparations.

Strains were stored at temperatures from –18 to –30°C from 13 months to 12 years. PCR was performed at the department of Virology of State Veterinary Institute (Pulawu, Poland) in accordance with the collaboration agreement. After storage under moderate low temperatures the virus was cultured for 3 days with MDBK cells (State Veterinary Institute, Pulawu, Poland) by adding 10% of equine serum at 37°C and 4% CO_2. In 3 days there was observed cytopathogenic effect (CPE) and cultural vessels with manifested CPE were placed into refrigerator at –70°C. The first research stage was thawing of culture with following extraction of complete RNA using TRI (Total RNA isolation System) of "Sigma" on the methods reported [3].

The second stage is DNA reverse transcription and RT-PCR. During synthesis of the first stage of complementary DNA (c-DNA) on virus RNA there was used RNA-dependent DNA-polymerase from avian myeloblastosis virus (AMV) according to traditional methods [2]. Amplification of c-DNA was performed using the specific for each virus primers under optimal conditions.

For DV PCR was performed with 324F primers (atg cccttagtaggactagca) and 326R (gtacat ggcacatgga gtta), localized within the area of 108-395 of nucleotide sequence and 188F primers (gta gtcgtcagtg gttcg) – 366R (atctc tgct gtacat ggc acatgga gttga), localized within the site 188-383 of nucleotide sequence.

As it has been reported [5] cattle DV genome represents one-chain plus-RNA with the size of 12,500 nucleotides, though in some virus isolates there are possible various deviation from the set value.

Genome segments with the length of 287 and 197 base pairs were subjected to amplification. To reveal amplified sequences electrophoresis in poly-acrylamide gel was applied.

There have been performed 30 cycles of PCR with the following parameters: heating up to 94°C for 10 sec, 50°C for 45 sec. "Oregon-C24V" strains of 25.01.92 and "UNDIEV-25" of 05.02.92 after conducting of the second "blind" passage in MDBK culture were subjected to PCR with the following parameters: 48°C for 45 min, 94°C for 2 min (94°C for 10 sec, 56°C for 30 sec, 68°C for 30 sec)×30; 68°C for 7 min, and pause at 4°C. To determine polymorphism of restriction fragments there were used 3 restriction enzymes: Ava I ("New England Biolab"), Pst I ("Fermentas"), Xho I ("Promega"). Restriction was performed at 37°C for 60 min.

возможны значительные расхождения с данным значением.

Амплификации подвергали сегменты генома, имеющие длину 287 и 195 пар нуклеотидов. Для обнаружения амплифицированных последовательностей применяли электрофорез в полиакриламидном геле.

Было проведено 30 циклов ПЦР с такими параметрами: нагрев до 94°С – 10 с, 50°С – 45 с, 68°С – 45 с. Штаммы "Орегон-С24V" от 25.01.92 и "УНДІЕВ-25" от 05.02.92 после проведения второго слепого пассажа в культуре MDBK подвергались ПЦР с параметрами: 48°С – 45 мин, 94°С – 2 мин (94°С – 10 с, 56°С – 30 с, 68°С – 30 с)×30; 68°С – 7 мин, 4°С – пауза. Для определения полиморфизма рестрикционных фрагментов использовали 3 энзима рестрикции: Ava I ("New England Biolab"), Pst I ("Fermentas"), Xho I ("Promega"). Рестрикцию проводили при температуре 37°С в течение 60 мин.

После рестрикции был выполнен электрофорез в полиакриамидном геле 12,5% Excel Gel ("Pharmacia-Biotech") с охлаждением плиты, на которой размещается гель, до 15°С. Параметры электрофореза: 600 В, 25 мА, 15 Вт.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены результаты гнездовой ПЦР с праймерами 188F и 366R. При этом размер продукта составил 195 пар оснований и получен для всех образцов.

Поскольку после первого пассажа в клеточных культурах, инфицированных штаммами "Орегон-С24V" от 25.01.92 и "УНДІЕВ-25" от 05.02.92, цитопатического эффекта не наблюдали, эти образцы были подвергнуты второму слепому пассажу в линии клеток MDBK, где по истечении 3 дней инкубации отмечали заметное цитопатическое действие в 60-70% клеток, после чего клетки замораживали при –70°С.

В результате проведения обратной транскрипции с полимеразой при последующей амплификации продуктов ПЦР не было получено (рис. 2). Была предпринята попытка реамплификации к-ДНК методом гнездовой ПЦР с внутренними праймерами 188F и 366R, для этого использовали к-ДНК из ПЦР со стартерами 324F и 326R. Опять была выполнена экстракция РНК из этих образцов и из ранее замороженных образцов "Орегон-С24V" от 29.12.02 и "УНДІЕВ-25" от 11.02.03 с последующим проведением одностадийной ПЦР с праймерами 324F и 326R – продуктов ПЦР не было получено. Тогда ту же реакционную смесь использовали для гнездовой ПЦР с праймерами 188F и 366R. Результаты реакции представлены на рис.3.

After restriction there was done electrophoresis in polyacrylamide gel 12.5% Excel Gel (Pharmacia-Biotech) with cooling the plate with the gel down to 15°C. Electrophoresis parameters are 600V, 25mA, 15W.

Results and discussion

Fig. 1 shows the results of nested PCR with 188F and 366R primers. In this case the size of product made 195 base pairs and has been obtained for all samples.

Since after the first passage in cell cultures infected with strains "Oregon-C24V" of 25.01.92 and "UNDIEV" of 05.02.92, no cytopathogenic effect was observed, these samples were subjected to the second passage in MDBK cell line, where 3 incubation days later there was found cytopathogenic effect in 60-70% of cells with following their freezing at –70°C.

After reverse transcription with polymerase at following amplification no PCR products were obtained (Fig. 2).

There has been done the attempt of re-amplification of c-DNA by nested PCR with inner primers 188F and 366R for this c-DNA from PCR with the starters of 324F and 326R were used. Once again there was performed RNA extraction from these samples and those earlier frozen "Oregon-C24" of 29.12.02 and "UNDIEV-25" of 11.02.03 with following one-stage PCR with primers 324F and 326R, no PCR products were obtained. Then the same reaction mixture was used for nested PCR with 188F and 366R primers. Reaction results are presented in Fig. 3.

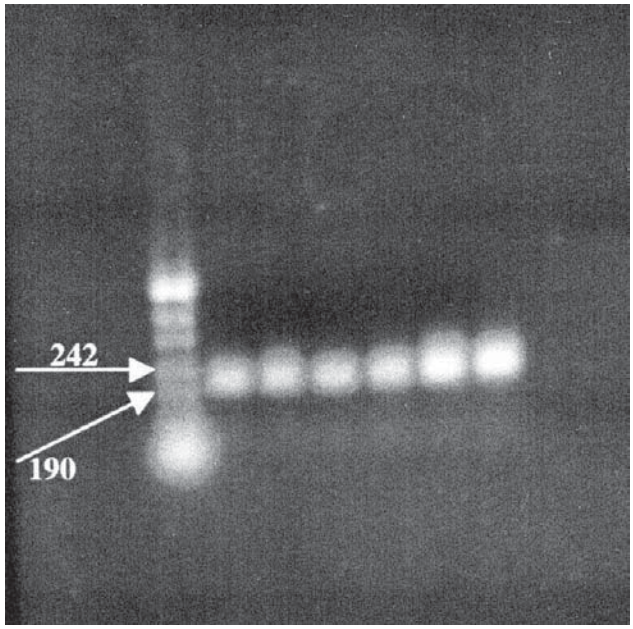

Рис. 1. Результаты гнездовой ПЦР с праймерами 188F и 366R. Размер продукта 195 оснований получен для всех образцов.

Fig.1. Results of nested PCR with 188F and 366R primers. Size of 195 bases product is obtained for all samples.

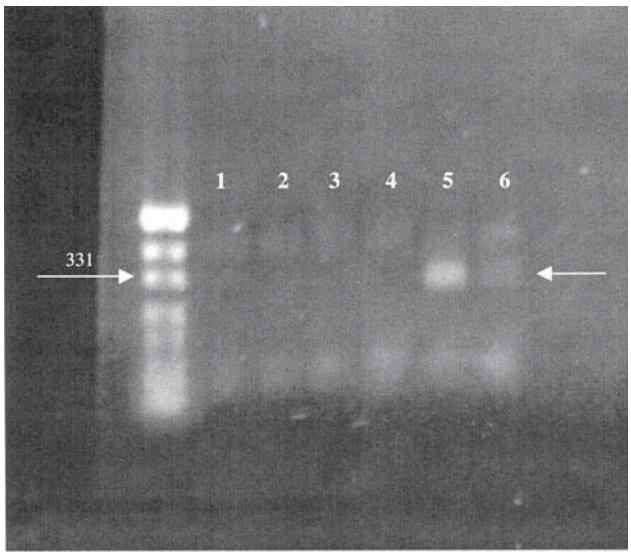

Рис. 2. Результаты одностадийной ПЦР с праймерами 324F и 326R. Образцы 1 – "Орегон-С24V" от 25.01.92; 2 – "Орегон-С24V" 29.12.02; 3 – "УНДІЕВ-25" от 05.02.92; 4 – "УНДІЕВ-25" от 11.02.03 – отрицательные. Образцы 5 и 6 – Институт вирусологии (Польша) – дополнительные территориальные изоляты.

Fig. 2. Results of one-stage PCR with 324F and 326R primers. Samples 1 – "Oregon-C24V" of 25.01.92; 2 – "Oregon-C24V" of 29.12.02; 3 – "UNDIEV-25" of 05.02.92; 4 – "UNDIEV-25" of 11.02.03 are negative. Samples 5 and 6 are additional territorial isolates of the Institute of Virology (Poland).

Рис. 3. Результаты повторной ПЦР с праймерами 188F и 366R. Образцы: 1 – "Орегон-С24V"от 25.01.92; 2 – "УНДІЕВ-25" от 05.02.92; 3 и 4 – Институт вирусологии (Польша), 5 – "Орегон-С24V" от 29.12.02; 6 – "УНДІ-ЕВ-25" от11.02.03; 7 – отрицательный контроль.

Fig. 3. Results of multiple PCR with 188F and 366R primers. Samples 1 – "Oregon-C24V" of 25.01.92; 2 – "UNDIEV-25" of 05.02.92; 3 and 4 are of the Institute of virology (Poland); 5 – "Oregon-C24V" of 29.12.02; 6 – "UNDIEV-25" of 11.02.03; 7 is negative control.

При изучении полиморфизма рестрикционных фрагментов (RFLP) после ОТ-ПЦР (324F и 326R) и гнездовой ПЦР (188F и 366R) применяли три рестрикционных фермента. С помощью фермента Ava I был получен фрагмент величиной около 160 пар оснований для всех анализируемых штаммов. Меньший фрагмент из 37 пар оснований мигрировал из геля. Все 4 образца ВД КРС дали идентичное разделение с этим ферментом.

С помощью фермента Pst I подтверждено наличие рестрикционной точки путем получения фрагмента длиной 153 пары оснований для всех штаммов разного срока хранения. Это означает, что все анализируемые штаммы относятся к первому генотипу ВД КРС.

Специфичность продукта реакции ОТ-ПЦР из некодируемого участка с конца 5' UTR генома вируса определена методом RFLP с применением фермента Xho I. При этом был получен ожидаемый фрагмент длиной около 159 пар оснований. Меньший фрагмент, состоящий из 36 пар оснований, мигрировал из геля.

Идентичность наблюдаемых профилей рестрикционного анализа исследуемых штаммов связана с высоким консерватизмом района 5' UTR в геноме ВД КРС. Для того чтобы получить более полный анализ, необходимо использовать продукт из других участков в геноме ВД, отличающихся большей изменчивостью (NS23 или E2). Это будет следующим этапом наших исследований.

When studying polymorphism of restriction fragments after RT- (324F and 326R) and nested PCR (188F and 366R) three restriction enzymes were used. Using Ava I enzyme there was obtained fragment of 160 base pairs for all analyzed strains. Less fragment of 37 base pairs migrated out of gel. All 4 samples of cattle DV showed identical separation with this enzyme.

For enzyme Pst I there has been confirmed the presence of restriction point when obtaining the fragment with the length of 153 base pairs for all strains of various storage terms, that means that all analyzed strains are referred to the first gene type of cattle DV.

Specificity of RT-PCR product from non-coded site of 5'UTR terminal of virus genome is found by RELP method using Xho I enzyme. In this case there has been obtained expected fragment with the length about 159 base pairs. Less fragment consisting of 36 base pairs migrated out of gel.

Identity of the observed profiles of restriction analysis of the strains under study is related to a high conservatism of 5'UTR region in cattle DV genome. In order to obtain more complete analysis it is necessary to use the product from other sites in DV genome, differing by higher changeability (NS23 or E2). This will be the next stage of our research.

Conclusions

Thus, in the most conservative site (5'-untranslated region) of cattle DV genome the nucleotide sequences

Выводы

Таким образом, в наиболее консервативном участке (5'- нетранслируемая область) генома ВД КРС нуклеотидные последовательности не нарушаются как в случае хранения вируса при температурах от –18 до –30°С в течение тринадцати месяцев, так и при более длительном хранении (12 лет).

Поскольку с внешними праймерами, имеющими длину 287 пар нуклеотидов, не удавалось обнаружить продуктов ПЦР, а при использовании внутренних праймеров длиной 195 пар нуклеотидов продукты были получены, это свидетельствует о том, что происходит деградация вирусной РНК в процессе продолжительного хранения в условиях умеренно низких температур.

Литература

1. *Гусева Е.В.* Практический каталог современной классификации возбудителей наиболее распространенных болезней животных и птиц.– Владимир, 2002.– 121 с.
2. *Методические указания* по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных методом полимеразной цепной реакции / Под ред. А.А. Гусева, А.Н.Панина.– Владимир, 1998.– 519 с.
3. *Молекулярная клиническая диагностика*. Методы: Пер. с англ. / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги.– М.: Мир, 1999.– 558 с.
4. *Стегний М.Ю.* Влияние продолжительности хранения вирусов в условиях умеренно низких температур на их ультраструктуру и биологическую активность // Експериментальна і клінічна медицина.– 2004.– №2.– С. 68-71.
5. *Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В.* Вирусные болезни животных.– М., 1998.– 928 с.

Поступила 10.02.2005

are not impaired both during virus storage at temperatures from –18 down to –30°C for 13 months and during longer storage (for 12 years).

Since with outer primers with the length of 287 base pairs it was impossible to find the PCR products, they were obtained when using inner primers with the length of 195 base pairs, this fact testified to the degradation of virus RNA during long-term storage under moderate low temperatures.

References

1. *Guseva E.V.* Practical catalogue of modern classification of agents of the most spread diseases of animals and birds.– Vladimir, 2002.– 121 p.
2. *Methodical manuals* at diagnostic of farming animals diseases by the method of polymerization chain reaction / Ed. by A.A. Guseva, A.N. Panina. – Vladimir, 1998.– 519 p.
3. *Diagnostic molecular pathology* / Ed. by C.S. Herrington, J.O.D. McGee.– Moscow: Mir, 1999.– 558 p.
4. *Stegniy M.Yu.* The influence of virus storage duration in condition of moderated-low temperatures to their ultrastructure and biological activity // Experimentalna i klinychna meditsyna.– 2004.– N2.– P. 68-71.
5. *Syurin V.N., Samuylenko A.Ya., Solovyev B.V., Fomina N.V.* Virus diseases of animals. – Moscow, 1998.– 928 p.

Accepted in10.02.2005