

Ільїна О.В.

**ІНДИКАЦІЯ ІЗОЛЯТИВ ПАРВОВІРУСУ ТА ВІРУСУ ЧУМИ ЗА ДОПОМОГОЮ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ ТА ПОЛІМЕРАЗНО-ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ**

*Рецензент – кандидат ветеринарних наук, доцент Пархоменко Л.І.*

**Ключові слова:** електронна мікроскопія, полімеразно - ланцюгова реакція, парвовірус собак, вірус чуми

**Вступ.** Ідентифікацію вірусу чуми та парвовірусу собак проводять за допомогою сучасних методів діагностики, а саме полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) та електронної мікроскопії, що дозволяє виявляти РНК або ДНК вірусів у зразках тканин, визначати їх морфологічну структуру та встановлювати асоційований перебіг хвороби [1, 2]. Так, Mochizuki M. за допомогою ревертазної ПЛР встановив, що парвовірус, вірус чуми є етіотропними агентами вірусної інфекції у собак. При дослідженні фекальних зразків від 84 собак із клінічним проявом хвороби реєстрували коронавірус (55,4 %), парвовірус (25 %), вірус чуми (9,5 %), аденовірус (2,5 %) [3]. Методом прямої електронно - мікроскопічної індикації вірусних патогенів у фекаліях, мазках із глотки та кон'юнктиви від собак і кішок встановили у 21,2 % - аденовірус, у 20,2 % - парвовірус, у 18,5 % - вірус чуми. Необхідно відмітити, що серед 31,3 % хворих собак реєстрували змішані інфекції: у 25,3 % встановили аденовірус із парвовірусом, у 2,1 % - аденовірус із вірусом чуми, у 2,3 % - парвовірус із вірусом чуми, у 1,6 % - аденовірус із парвовірусом і вірусом чуми [4].

Методом ПЛР виявляли генетичний матеріал вірусу чуми у церебральній рідині 7-місячної собаки, а інші дослідники виділили ДНК парвовірусу собак із мозкової тканини та кишечника від котів з ознаками ураження нервової системи [5]. Також у зразках сечі, крові, слині та носових змивах собак був ампліфікований фрагмент гену нуклеопротеїну вірусу чуми [6, 7]. Жигарев С.Н. при дослідженні матеріалу методом ПЛР у 68 собак (35,8 %) реєстрував

парвовірус [8]. Метод ПЛР є найбільш чутливий, який дозволив виявити генетичний матеріал парвовірусу у 24 собак, порівняно із методом електронної мікроскопії, який виявляв вірус у 10 тварин [9].

Відомо, що віріони парвовірусу собак мають ікосаедральну форму, не мають оболонки, розмір коливається від 18 до 28 нм. Проте віріони вірусу чуми більшого розміру, від 150 до 300 нм, мають зовнішню оболонку розміром 5-8 нм з виступами завдовжки 9-13 нм, форма – від сферичної до ниткоподібної. Деякі автори вказують, що діаметр віріонів досягає 100–700 нм [10, 11].

Hurtado A. виявив вірусні частки розміром 25 нм з характерною морфологією парвовірусу у диких типів VP2, AN9, AN14, A2, а ізоляти AN24 та A3 були представлені аморфними зруйнованими віріонами [12]. Burtonboy G. та інші дослідники методом негативного контрастування із використанням хлориду цезію 1,43 г/см<sup>3</sup> виявляли віріони розміром 24 нм [13], а Галкіна Т.С. за допомогою 4 % фосфорновольфрамової кислоти виявляла віріони діаметром 18- 22 нм [14].

**Метою роботи** була індикація парвовірусу та вірусу чуми у зразках, культивованих у курячих ембріонах, за допомогою електронної мікроскопії та полімеразно-ланцюгової реакції.

**Матеріали і методи досліджень.** Наявність вірусів встановлювали у ембріональних зразках ізолятів, культивованих у курячих ембріонах впродовж I-II пасажів. Електронно-мікроскопічні дослідження ізолятів проводили в інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків). З цією метою вірусні ізоляти парвовірусу СН-5/2, БП-8 та ізоляти із асоціацією вірусу

чуми з парвовірусом БН-3, БП-6 осаджували на 30 % сахарозній подушці з подальшим ультрацентрифугуванням при 25 000 об/хв. (76 000 g) упродовж 1,5 години за температури +5 °С. Отриманий вірусний осад ресуспендували у 0,5 см<sup>3</sup> TSE буфері. Після нанесення контрастуючого розчину (4% водний розчин фосфорно-вольфрамової кислоти, рН 6,7-6,8) зразок досліджували в електронному мікроскопі ПЕМ-125К при 75 кВ [14]. Полімеразно-ланцюгову реакцію виконували у лабораторії молекулярної епізоотології Національного наукового центру „ІЕКВМ”. Ізоляцію сумарної ДНК та РНК проводили за допомогою набору для екстракції ДНК та РНК -РИБО-Сорб-100, а реакцію зворотної транскрипції проводили за допомогою набору РЕВЕРТА-Л виробництва фірми АмпліСенс. Реакцію ампліфікації проводили за допомогою наборів виробництва фірми АмпліСенс «ПарвоВір» та «Полічум». Електрофоретичний аналіз проводили за допомогою набору для

електрофорезу виробництва НПО Нарвак, м. Москва при 1,5 % концентрації агарози у гелі та силі струму 120 В [15].

**Результати і обговорення досліджень.** Визначення морфологічних особливостей ембріональних матеріалів ізолятів проводили за допомогою електронної мікроскопії. Негативне контрастування зразків виявило в ізолятах ЄН-5/2 та БП-8 віріони без капсидної оболонки, округлої форми, розміром 22-25 нм, що розташовувалися групами, попарно. Деякі віріони мали овальну форму розміром від 30 до 27 нм. В ізоляті БН-3 (асоціація вірусу чуми з парвовірусом) виявляли вірусні частки, овальної форми із зовнішньою оболонкою довжиною 150 нм, шириною 90 нм з виступами, характерними для вірусу чуми, та віріони парвовірусу собак розміром 20-25 нм, які знаходилися у різних полях зору. Реєстрували віріони вірусу чуми від 120 до 180 нм (рис. 1, 2).

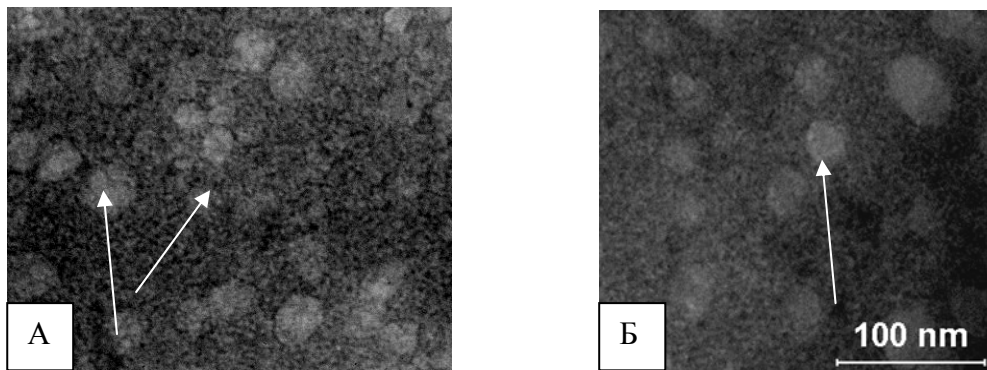


Рис.1. Віріони парвовірусу: А- ізолят ЄН-5/2; Б- ізолят БП-8. Негативний контраст (збільш.× 100000)

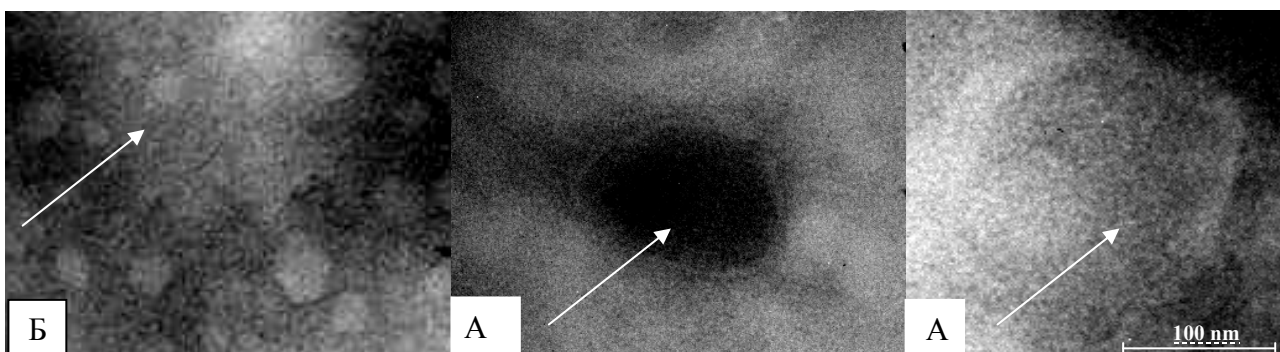
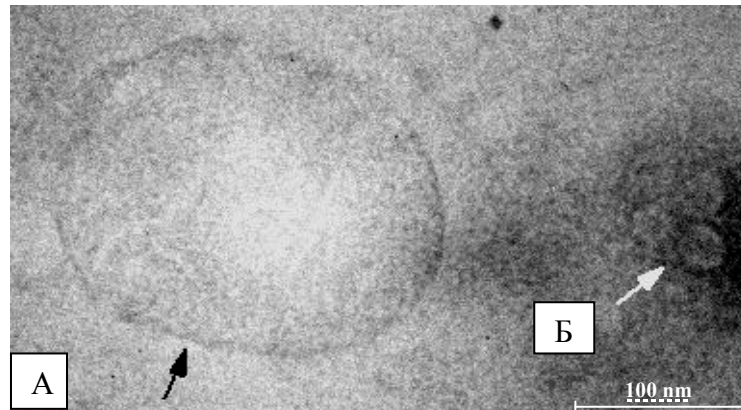


Рис. 2.Віріони ізоляту БН-3 (асоціат); А- віріони вірусу чуми; Б – віріони парвовірусу. Негативний контраст (збільш.× 100000).

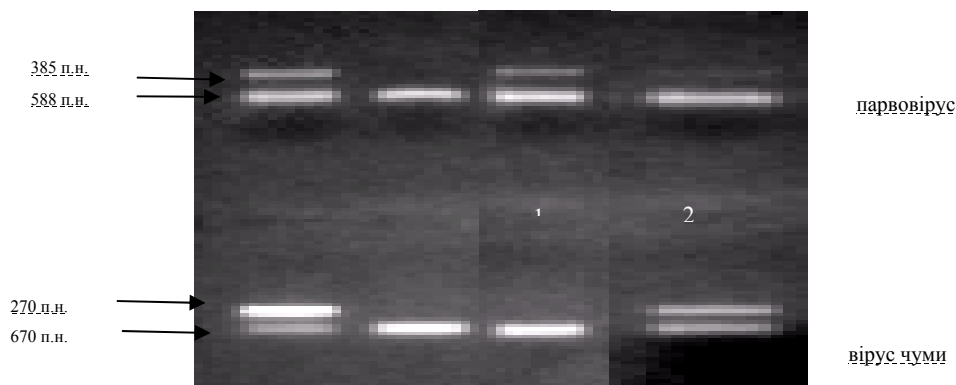
В ембріональному матеріалі ізоляту БП-6 (асоціація вірусу чуми з парвовірусом) спостерігали характерні для вірусу чуми собак віріони овальної форми, розміром 220 нм із зовнішньою оболонкою з виступами.

Поряд із віріонами вірусу чуми у полі зору розташовувались попарно віріони парвовірусу, розміром 22 нм, без капсидної оболонки, округлої форми (рис.3).



**Рис. 3. Віріони ізоляту БП-6 (асоціат): А- вірус чуми; Б- парвовірус. Негативний контраст (збільш.  $\times 100000$ ).**

Для індикації у ізолятах ЄН-5/2 парвовірусу і у БН-3, асоціації вірусу чуми з парвовірусом, проводили ПЛР із специфічними праймерами до кожного з них. Для аналізу використовували ембріональний матеріал ізолятів І-ІІ-го пасажів. Результати ПЛР із матеріалом курячих ембріонів, інфікованих ізолятом парвовірусу ЄН-5/2 та асоціації вірусу чуми з парвовірусом БН-3, представлені на рисунку 4.



**Рис. 4. Результати індикації у ПЛР: 1- ізолят парвовірусу ЄН-5/2; 2- ізолят БН-3 (асоціація вірусу чуми з парвовірусом); К+ - позитивний контроль; К- - негативний контроль.**

За ПЛР наявність РНК вірусу чуми собак та ДНК парвовірусу встановили у відповідній смужі ізоляту БН-3 (асоціація вірусу чуми з парвовірусом), яка розташовувалася на тому ж рівні, що й у позитивному контрольному зразку.

Наявність ДНК парвовірусу на рівні 385 п.н. встановили в ізоляту ЄН-5/2.

**Висновки:**

1. За допомогою електронної мікроскопії методом негативного контрастування у ізолятах БН-3, БП-6 була

встановлена наявність віріонів вірусу чуми (150-220 нм із зовнішньою оболонкою та виступами) та парвовірусу (округлої форми, розміром 20-25 нм, без капсидної оболонки).

2. У ізолятах ЄН-5/2, БП-8 спостерігали тільки віріони овальної форми розміром від 22 до 30 нм, без капсидної оболонки, які за морфологічними ознаками можна віднести до парвовірусів.

3. За результатами ПЛР підтверджено, що ізоляти (ЄН-5/2 та БН-3) містять генетичний матеріал парвовірусу, а ізолят парвовірусу БН-3 додатково включає геном вірусу чуми собак.

### Література.

1. Use of real-time PCR to detect canine parvovirus in feces of free-ranging wolves / L. Mech [et al.] // *J Wildl Dis.* – 2012. – Vol. 48(2). – P. 473-476.

2. A sensitive method to detect canine parvoviral DNA in faecal samples by nested polymerase chain reaction / M. Kumar [et al.] // *Journal of Biotechnology.* – 2011. – Vol. 10. – P. 183-187.

3. Mochizuki M. Recent epidemiological status of canine viral enteric infections and Giardia infection in Japan [Text] / M. Mochizuki, M. Hashimoto, T. Ishida // *Vet. Med. Sci.* – 2001. – Vol. 63(5). – P. 573-575.

4. Распространенность инфекционных агентов среди домашних животных в Московском регионе / Н.В. Клицунова [и др.] // *Вет. патология.* – 2005. – № 1. – С. 39-44.

5. Evidence of Parvovirus Replication in Cerebral Neurons of Cats [Text] / Angelika Url [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41(8). – P. 3801-3805.

6. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis [Text] / T. B. Saito [et al.] // *Res. Vet. Sci.* – 2006. – Vol. 80(1). – P. 116-119.

7. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples [Text] /

Y. J. Shin [et al.] // *Vet. J.* – 2004. – Vol. 82(1-2). – P. 83-86.

8. Жигарев С.Н. ПЦР-диагностика парвовирусного энтерита собак и панлейкопении кошек [Текст] / С.Н. Жигарев, В.И. Ермолаев, М.Л. Розыкулыев // *Актуал. вопр. вет. медицины: материалы Сиб. Междунар. вет. конгр.* – Новосибир., 2005. – С. 26-27.

9. Comparison of three rapid commercial canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction [Text] / S. Schmitz [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2009. – Vol. 21(3). – P. 344-345.

10. Парвовирусы плотоядных и вызываемые ими болезни [Текст] / Н. А. Власов [и др.]. – Ульяновск, 2000. – 37 с.

11. Симонова Е.Г. Изучение ультраструктуры вируса чумы плотоядных [Текст] / Е.Г. Симонова, И.В. Никитин, Г.М. Карпов // *Вирусные болезни с.-х. животных: тез. докл. всерос. науч.-практ. конф.* – Владимир, 1995. – С. 61.

12. Identification of Domains in Canine Parvovirus VP2 Essential for the Assembly of Virus-Like Particles [Text] / A. Hurtado [et al.] // *Journal of Virology.* – 1996. – Vol. 70(8). – P. 5422-5429.

13. Canine hemorrhagic enteritis detection of viral particles by electron microscopy [Text] / G. Burtonboy [et al.] // *Arch. Virol.* – 1979. – Vol. 61. – P. 1-11.

14. Галкина Т.С. Иммунобиологические свойства возбудителей парвовирусного энтерита и чумы плотоядных, используемых для изготовления биопрепаратов [Текст]: автореф. дис... канд. вет. наук / Т.С. Галкина. – Владимир, 2008. – 25 с.

15. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини [Текст]: наук.-метод. посібник / під ред. Б.Т. Стегнія та А.П. Геріловича – Х.: ННЦ «ІЕКВМ», 2006. – 110 с.