

Serological method was used to study blood sera in the microscopic agglutination test (MAT) using antigens of twenty one serogroup of Leptospira.

Results of research and discussion. *As a result of growth quality it was found that the Leptospira growth observed not in all samples of water. Best growth was registered among Icterohaemorrhagiae and Grippytyphosa serogroup of Leptospira. As a result of biological tests on golden hamsters revealed that prevailed antibody against serological group Icterohaemorrhagiae in titers 1:50.*

Conclusions and prospects for further research:

1. *Tests of the water regarding growth quality showed that not every growth rate and reproduction leptospira possible for various reasons (change in pH, presence of pollutants or chemicals, etc.).*

2. *The dominant serologic group of Leptospira is serogroup Icterohaemorrhagiae (serovar copenhageni).*

Keywords: *leptospirosis, wild rodents, pathogenic Leptospira, microscopic agglutination test (MAT).*

References

1. Uhovs'kij V. V., Kucherjavenko O. O., Stepna O. O. Prirodni vognishha leptospirozu v Ukraïni // Buleten «Veterinarna biotehnologija». – 2014. – № 24. – S. 262 – 266.
2. Malahov Ju. A. Leptospiroz zhivotnyh / Ju. A. Malahov, A. N. Panin, G. L. Soboleva. – Ja.: DIA-press. – 2000. – S. 404 – 408.
3. Smythe L. Leptospirosis worldwide / L. Smythe // Weekly Epidemiological Recovery. – 1999. – Vol.74. – P. 237 – 242.
4. Nastanova z laboratornoi diagnostiki leptospirozu. 1996. – S. 12 – 16.

УДК 636.09:616.98:578.825:578.74

СИТЮК М. П., канд. вет. наук
Інститут ветеринарної медицини НААН

ВИЗНАЧЕННЯ АНТИГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВІРУСУ ХВОРОБИ АУЄСКІ СВИНЕЙ – ШТАМ «ПЕТРІКІВСЬКИЙ-2006»

У статті наведені результати виділення збудника хвороби Ауєскі з патологічного матеріалу від поросят. Проведено його ідентифікацію шляхом визначення чутливості до хлороформу, постановкою біологічної проби на кролях та встановленням ступеню антигенної спорідненості з виробничими штамами. Проведено депонування штаму “Петріківський – 2006” вірусу хвороби Ауєскі у Державному науково-контрольному інституті біотехнологій і штамів мікроорганізмів.

Ключові слова: *вірус хвороби Ауєскі, індикація, ідентифікація, депонування*

Вступ. Хвороба Ауєскі (ХА) вже 110 років відома людству як контагіозне вірусне захворювання усіх видів домашніх тварин, диких та хутрових звірів [1, 2]. Характерними ознаками ХА є ураження головного та спинного мозку та проявом зуду, розчосів, останній симптом не характерний

для свиней [3]. За даними Потоцького М. К. (2009) симптоматика хвороби Ауескі у свиней вирізняється залежно від віку й вірулентності вірусу [2].

Збудник пантропний. Його можна виділяти з верхніх дихальних шляхів, легень і через 48 годин з головного мозку, селезінки, нирки, слинних залоз, мигдаликів, шкіри лімфовузлів. На 8-у добу вірус зникає з центральної нервової системи.

Чутливими до вірусу хвороби Ауескі є кролі, норки, коти і як біологічна модель ці тварини використовуються при постановці біопроби [4].

В лабораторних умовах вірус ХА культивують в первинних та перещеплюваних культурах клітин різного походження [5–7]. В антигенному відношенні збудник ХА однорідний [4, 5]. Серед діагностичних тестів по виявленню специфічних гуморальних антитіл в сироватках крові використовують РН, РНГА, РДП, ІФА, РРИД, РІА [4], однак МЕБ рекомендує використовувати РН та ІФА [8].

Мета. Виділити, ідентифікувати та вивчити антигенні властивості ізоляту вірусу хвороби Ауескі – «Петріківський-2006», виявити антигенну спорідненість з виробничими штамми. Отримати гіперімунну сироватку проти вірусу хвороби Ауескі.

Матеріали і методи досліджень. Патологічний матеріал (шматочки головного мозку, легень, нирки, лімфатичних вузлів, мигдалин), що був відібраний нами від 3-х вимушено забитих і 2-х трупів поросят групи дорощування з господарства Петріківського р-ну Дніпропетровської області у 2006 році.

При індикації ізоляту вірусу використовували – ламінарний бокс та CO₂ інкубатор фірми JOUAN, інвертований мікроскоп фірми ZEISS AXIOVERT 25, пластикові мікропланшети з плоским та U-подібним дном фірми Sarstedt, скляні матраци об'ємом 50 см³, автопіпетки восьмиканальні та одноканальні фірми ВІОНІТ 50–250 мкл; ростові середовища: ДМЕМ, 199; розчин версену 0,02 % для культур клітин; сироватку крові ВРХ без консерванту нативну; розчин трипсину 0,25 % на фосфатному буфері для культур клітин виробництва ТОВ НВП «Біо-Тест-Лабораторія»; перещеплювану культуру клітин ПТП; хлороформ.

Підготовку суспензії патологічного матеріалу проводили згідно методики, описаної в посібнику Скибіцького В. Г. (2005) [9].

Обробку зразків суспензій головного мозку хлороформом проводили за методиками Майера та Богеля (1980). Суспензію досліджуваного матеріалу (культура клітин ПТП 5-ого пасажу) змішували з хлороформом (5 см³ до 0,5 см³) у стерильному пеніциліновому флаконі при t +4°C протягом однієї години – в умовах термосу. Флакон з вмістом поміщали в холодильник при +4°C на 12 годин. Суміш центрифугували протягом 45 хв при 2000 об/хв. В результаті центрифугування утворилося 3 шари: нижній з хлороформом, середній – осаджений білок, верхній – вірусний матеріал. Вірусним матеріалом, що був оброблений та необроблений хлороформом, було інокульовано культуру клітин ПТП.

Індикацію, ідентифікацію та визначення культуральних властивостей ізолятів вірусів хвороби Ауескі, проводили згідно стандартних методик [10, 11]. Штами вірусу хвороби Ауескі для випробування були взяті з депозитарію ДНКІБШМ: вірулентні «Арський», «18в» та комерційну вакцину проти хвороби Ауескі «Бегонія», виготовлену з маркованого штаму. Кожним штамом вірусу хвороби Ауескі було інокульовано культуру клітин ВНК-21 та проведено 4 послідовні пасажі в скляних матрацах об'ємом 50 см³, з виповненим моношаром. У даному досліді враховували строки початку прояву ЦПД та визначали титри інфекційної активності штамів вірусу хвороби Ауескі при наявності цитопатичної дії.

Для біопроби нами було взято два кролі білої масті, масою тіла 2,0 та 2,3 кг відповідно. Вірусний матеріал в об'ємі 0,1 см³ вводили внутрішньом'язово в попередньо вистрижене та оброблене 70° етиловим спиртом місце латеральної сторони стегна кожному кролю.

Ізолят вірусу хвороби Ауескі «Петріківський-2006» з титром інфекційної активності 10^{7,7} Іg ТЦД₅₀/см³ (вірусовмісна культуральна рідина) було проінактивовано формальдегідом та перевірено у трьох послідовних пасажах повноту інактивації антигену. До інактивованого формаліном вірусу хвороби Ауескі додавали олійний ад'ювант – Montanide ISA 25 у співвідношенні 1 частина ад'юванта до 3 частин вірусвмісної суспензії.

Для гіперімунізації було відібрано 2-х неімунних до вірусу хвороби Ауескі кіз віком 7–8 місяців. Приготовлений антиген вводили кожній козі у кількості 9 разів протягом 3,5 місяців внутрішньом'язово (почергово в ділянку шиї та стегна). Об'єм антигену при кожній імунізації становив 2 см³. Схема імунізації наведена в таблиці 1.

Таблиця 1

Схема гіперімунізації кіз інактивованим вірусом хвороби Ауескі

Кратність імунізації	Інтервал між імунізаціями, діб	Місце введення антигену	Об'єм введеного антигену
1	2	3	4
1	-	внутрішньом'язово	2 см ³
2	21	внутрішньом'язово	2 см ³
3	7	внутрішньом'язово	2 см ³
4	7	внутрішньом'язово	2 см ³
5	7	внутрішньом'язово	2 см ³
6	7	внутрішньом'язово	2 см ³
7	7	внутрішньом'язово	2 см ³
8	7	внутрішньом'язово	2 см ³
9	7	внутрішньом'язово	2 см ³

Результати досліджень та їх обговорення. На початку 2011 року нами було проведено перевірку раніше надісланих патологічних матеріалів з господарства ПП «Омельченко» с. Хутірське Петріківського р-ну Дніпропетровської області від 23.12.2006 року від 5-и загиблих поросят

(шматочки легень, нирки, лімфатичних вузлів, мигдалин) на предмет виявлення вірусу хвороби Ауескі.

З кожного органу було приготовлено 10 % суспензії патологічного матеріалу, які перевіряли в 3-х послідовних пасажах на культурі клітин ПТП в скляних матрацах об'ємом 50 см³ з строком очікування 7–8 діб з метою можливої індикації антигену (табл. 2).

Таблиця 2

Результати зараження культури клітин ПТП суспензіями патологічного матеріалу

№ пасажу	Вид патологічного матеріалу (суспензія)	Час культивування, діб						
		1	2	3	4	5	6	7
1	головний мозок	-	-	-	-	-	-	-
	легені	-	-	-	-	-	-	-
	нирка	-	-	-	-	-	-	-
	лімфовузел	-	-	-	-	-	-	-
2	головний мозок	-	-	-	-	-	-	+
	легені	-	-	-	-	-	-	-
	нирка	-	-	-	-	-	-	-
	лімфовузел	-	-	-	-	-	-	-
3	головний мозок	-	-	-	-	+	+	+
	легені	-	-	-	+	+	+	+
	нирка	-	-	-	-	-	-	-
	лімфовузел	-	-	-	-	-	-	-
4	головний мозок	-	+	+	+	+	+	+
	легені	-	+	+	+	+	+	+
5	головний мозок	-	+	+	+	+	+	+
	легені	-	+	+	+	+	+	+

Примітка: «-» – відсутність ЦПД; «+» – наявність ЦПД

У першому пасажі будь-яких дегенеративних змін відмічено не було. У 2-му пасажі з 1-ї по 6-ту добу також не було помічено змін моношару і лише на 7-му добу по краях матрацу реєстрували початок дегенерації клітин з їх округленням та відшаруванням від дна матрацу, що був інокульований суспензією легень. У 3-му пасажі з 4-ї доби реєстрували цитопатичну дію (ЦПД) в матрацах з суспензією легень, а з 5-ї доби в матрацах з суспензією головного мозку. У матрацах, інокульованих суспензіями нирки та лімфатичних вузлів ЦПД не реєстрували. При проведенні 4-го та 5-го пасажів прояв ЦПД відмічали починаючи з 2-ї доби.

У моношарі клітин матраца, зараженого необробленою суспензією вірусного матеріалу, реєстрували цитопатичну дію в моношарі клітин, а в моношарі клітин матраца, зараженого обробленою суспензією вірусного матеріалу, ЦПД була відсутня, тобто вірус виявився чутливим до хлороформу. Надалі ми провели титрування вірусного матеріалу 6-го пасажу в пластикових планшетах загальноприйнятим методом з використанням на кожне розведення по 4 лунки планшета. За результатом проведених досліджень було встановлено титр антигенної активності на рівні 10^{5,5} lg

ТЦД₅₀/см³. Наступним етапом ідентифікації була перевірка даного вірусу в біопробі на кролях. За тваринами постійно вели спостереження. В обох кролів на 40-у та 45-у годину після інокуляції спостерігали занепокоєння, почервоніння шкіри, розноси, а на 48-у та 54-у години відповідно кролі загинули. Попередньо нами був зроблений висновок, що цей вірус є збудником хвороби Ауескі. Для остаточного підтвердження вірусомісну суспензію було досліджено методом ПЛР в лабораторії молекулярно-генетичних досліджень ІВМ НААН. Результат реакції виявився позитивним, тобто в дослідженому зразку виявлено ДНК вірусу хвороби Ауескі.

Надалі було проведено роботу з визначення інфекційної активності ізоляту «Петріківський-2006» та порівняння його з виробничими штамми. Результати досліджень наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Результати пасажування виробничих штамів вірусу хвороби Ауескі в культурі клітин ВНК-21clone13/04, n=3, M±m

Назва штам	№ пасажу							
	1-й		2-й		3-й		4-й	
	строк появи ЦПД, годин	титр інфекційної активності, lg ТЦД ₅₀ /см ³	строк появи ЦПД, годин	титр інфекційної активності, lg ТЦД ₅₀ /см ³	строк появи ЦПД, годин	титр інфекційної активності, lg ТЦД ₅₀ /см ³	строк появи ЦПД, годин	титр інфекційної активності, lg ТЦД ₅₀ /см ³
Арський	24	7,2±0,08	20	7,95±0,12	20	8,2±0,12	19	8,2±0,12
Петріківський-2006	16	5,45±0,12	16	7,7±0,24	16	7,7±0,24	15,5	7,7±0,24
18 в	40	6,92±0,21	38	7,45±0,12	32	7,7±0,24	31	7,7±0,24
Бегонія	44	3,7±0,24	28	5,45±0,12	25	5,45±0,12	24	5,45±0,12

Визначено, що протягом 4-х послідовних пасажів реєстрували динаміку зменшення строку появи цитопатичного ефекту в культурі клітин ВНК-21clone13/04. Найбільш наглядно скорочення термінів прояву ЦПД відмічали після 2-го пасажу у маркованої вакцини «Бегонія», що на нашу думку пов'язано з вивільненням вірусу від компонентів, що входять до складу захисного середовища при ліофільному висушуванні. При проведенні послідовних пасажів інших штамів реєстрували менш виражені скорочення строків появи ЦПД, від 4-х до 2-х годин, а при дослідженні штамів «Петріківський-2006» останні взагалі були не змінні і становили 16 годин.

Також реєстрували і збільшення титру інфекційної активності штамів протягом 3-х пасажів. Особливо титри інфекційної активності значно підвищувалися після 2-го пасажу. На четвертому пасажі інфекційна активність вказаних штамів не відрізнялася від титрів 3-го пасажу. Характер ЦПД проявлявся на початку десимінованим округленням клітин моношару, з подальшим його злуцненням.

За результатами проведених досліджень: 1) ідентифіковано у культурі клітин ПТП ізолят «Петріківський-2006» вірусу хвороби Ауескі; 2)

встановлено чутливість цього ізоляту до хлороформу та інфекційну активність у культурі клітин ВНК 21 4-го пасажу – $7,7 \pm 0,24 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$; 3) виявлено патогенність ізоляту для кролів, які загинули на 48-му та 54-ту години після інокуляції; 4) виявлено наявність специфічної вірусної ДНК у зразках вірусомістної суспензії.

Надалі було проведено експериментальну роботу з одержання гіперімунної сироватки крові проти ізоляту вірусу хвороби Ауескі «Петріківський-2006» на козах (власне розроблений спосіб одержання гіперімунної сироватки).

При кожній наступній реімунації від тварин відбирали кров, одержували сироватку, яку інактивували при $t + 56^\circ\text{C}$ протягом 30 хвилин та досліджували на наявність титру специфічних антитіл у реакції віруснейтралізації. Результати досліджень наведені на рисунку 1.

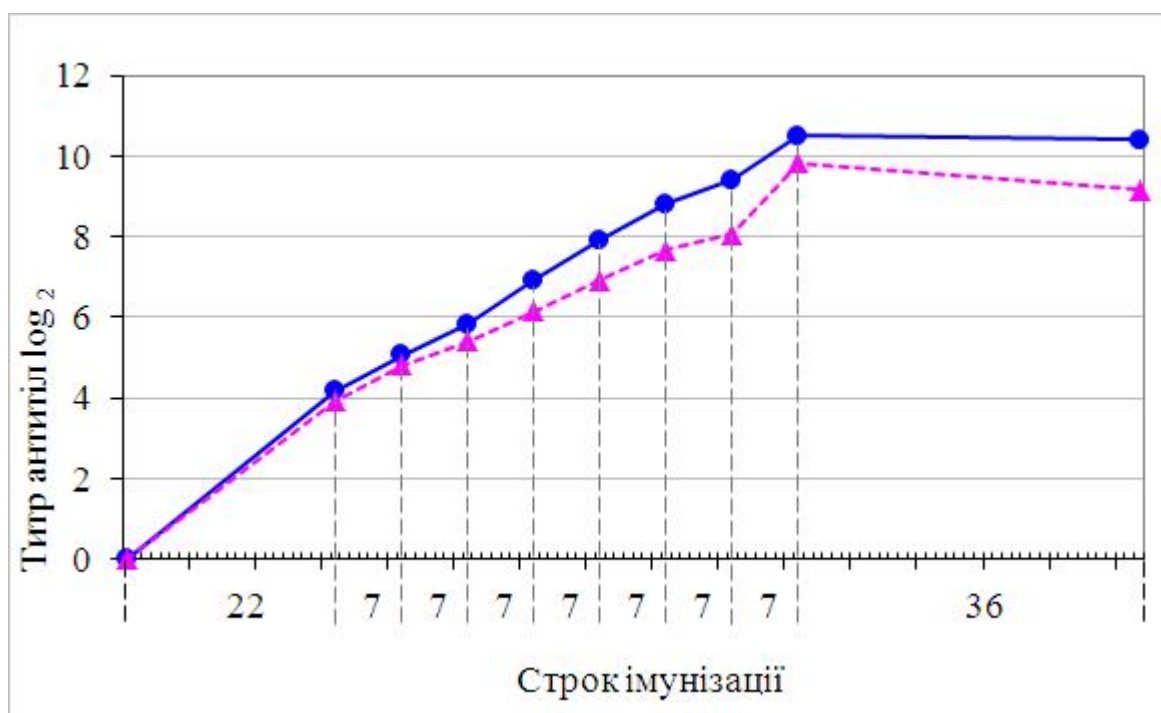


Рис. 1. Динаміка накопичення титрів специфічних гуморальних антитіл проти вірусу хвороби Ауескі в сироватках крові кіз

Впродовж 9-ти імунацій в сироватці крові піддослідних тварин спостерігали зростання титру специфічних антитіл проти вірусу хвороби Ауескі. Так, вже через 21 добу після 1-го введення антигену титр антитіл становив $4,17 \pm 0,07 \log_2$. Після наступних 8-ми реімунацій з інтервалом у 7 діб титри антитіл зростали в межах 1-го логарифму, а максимальний рівень антитіл складав $10,5 \pm 0,12$ та $9,83 \pm 0,07 \log_2$ відповідно. Через 36 діб після останньої реімунації титри антитіл в сироватках крові кіз утримувалися на рівні $9,17 \pm 0,07$ та $10,42 \pm 0,07 \log_2$. В результаті проведених досліджень нами було одержано специфічну сироватку крові, котру було використано при депонуванні штаму вірусу хвороби Ауескі «Петріківський-2006», а також при серологічному моніторингу даного захворювання серед домашніх та диких

свиней. На розроблений спосіб гіперімунізації нами було одержано патент України на корисну модель.

Дослідження з визначенням антигенної спорідненості ізоляту «Петріківський-2006» з виробничими штамми вірусу хвороби Ауескі проводили згідно розробленої нами методики [12].

Результати проведених досліджень наведені в таблиці 4.

Таблиця 4

Визначення індексів нейтралізації виробничих штамів вірусу хвороби Ауескі в культурі клітин ВНК-21

Розведення вірусів	Сироватка позитивна до штаму «Петріківський-2006»				Негативна сироватка			
	Петріківський-2006	Арський	18в	Бегонія	Петріківський-2006	Арський	18в	Бегонія
Титр, lgТЦД ₅₀ /см ³ n=3, M±m	5,17 ± 0,04	5,99 ± 0,05	5,68 ± 0,12	3,56 ± 0,1	7,83 ± 0,07	8,9 ± 0,05	8,33 ± 0,14	6,17 ± 0,03
ІН	3,28	2,91	2,65	2,61	–	–	–	–
г	–	0,89	0,81	0,8	–	–	–	–

Примітка: г – показник відношення індексів нейтралізації між досліджуваними штамми

Дані таблиці вказують на те, що індекси нейтралізації для штамів «Петріківський-2006», «Арський», «18в», «Бегонія» становили 3,28; 2,91; 2,65; 2,61 відповідно. За даним прикладом можна зробити висновок про те, що позитивна сироватка крові нейтралізувала 10^{3,28} доз вірусу штаму «Петріківський-2006»; 10^{2,91} – штаму «Арський»; 10^{2,65} – штаму «18в» та 10^{2,61} – доз маркованого штаму вакцини «Бегонія», знизивши їх інфекційні титри. Крім індексу нейтралізації нами був розрахований коефіцієнт г, що підтверджує антигенну спорідненість або відмінність між досліджуваними штамми. Розрахунок показників г показав певну антигенну спорідненість між штамми «Петріківський-2006» та «Арський», яка становила 0,89; між штамми «Петріківський-2006» та «18в» – 0,81; між штамми «Петріківський-2006» та «Бегонія» – 0,8.

Висновки та перспективи подальших наукових досліджень:

1. Уперше одержано специфічну сироватку крові до штаму вірусу хвороби Ауескі «Петріківський-2006» на козах, з титром специфічних гуморальних антитіл на рівні 9,83±0,07 та 10,5±0,12 log₂.

2. За постановки односторонньої реакції нейтралізації встановлено антигенну спорідненість штаму «Петріківський-2006» зі штамми «Арський», «18в» та «Бегонія» на рівні г=0,88; г=0,81; г=0,76, відповідно.

Перспективами подальших наукових досліджень є використання цього штаму для серологічної та вірусологічної діагностики хвороби Ауескі домашніх і диких свиней у реакції віруснейтралізації.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Болезнь Ауески – эпизоотическая ситуация и современная система мер борьбы / А. А. Коломьцев [и др.] // Болезни диких животных : тр. Междунар. науч.-практ. конф., 28–30 сент. 2004 г., г. Покров. – Покров, 2004. – С. 134-145.
2. Потоцький М. К. Хвороба Ауескі (Morbus Aujeszkyi, Paralysis bulbaris infectiosa) / М. К. Потоцький // Вет. медицина України. – 2009. – № 6. – С. 23-25.
3. Пейсак З. Болезни свиней / З. Пейсак; пер. с пол. Д. В. Потапчука. – Брест : ОАО «Брестская типография», 2008. – 424 с.
4. Болезнь Ауески // Вирусные болезни животных / В. Н. Сюрин [и др.]. – Москва: ВНИТИБП, 1998. – С. 603–630.
5. Болезнь Ауески (Morbus Aujeszky) / И. А. Болоцкий [и др.]. // Ветеринария Кубани. – 2009. – № 2. – С. 17–19.
6. Адаптация вируса болезни Ауески на новой культуре клеток / Р. Х. Юсупов [и др.] // Ветеринария. – 2003. – № 11. – С. 22–25.
7. Адаптация вируса болезни Ауески (псевдобешенство) к клеткам невриномы Гассерового узла крысы для биотехнологии вакцин и диагностикумов / Г. Х. Ильясова [и др.] // Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, Крейтцфельда-Якоба и другие прионные болезни; листериоз, болезнь Ауески, болезнь Тешена : материалы Междунар. науч.-практ. конф. 30–31 мая 2001 г., г. Покров. – Покров, 2001. – С. 158–160.
8. МЕБ. Кодекс здоровья наземных животных. Т. 1. Общие положения / МЕБ. – 19-е изд. – 2010. – 471 с.
9. Відбір патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин для лабораторної діагностики вірусних інфекцій, його консервування, транспортування та підготовка до дослідження / [В. Г. Скибіцький та ін.] // Практикум з ветеринарної вірусології : навч. посіб. / [В. Г. Скибіцький та ін.]. – К. : Вища освіта, 2005. – С. 11–17.
10. Лярски З. Диагностика вирусных болезней животных / З. Лярски ; пер. Т. Г. Орловой, Я. С. Ляндесберга ; под ред. и с предисл. В. Н. Сюрин. – М. : Колос, 1980. – 400 с.
11. Прискока В. А. Методические рекомендации по определению антигенного родства, различий и доминантности вирусов в серологических реакциях / В. А. Прискока, А. И. Собко, К. В. Манзий. – К., 1987. – 20 с.
12. Методичні рекомендації по застосуванню мікрометоду реакції нейтралізації для серологічної діагностики хвороби Ауескі // [уклад. М. П. Ситюк та ін.]. – Ніжин : ПП Лисенко М. М., 2013. – 24 с.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ СВИНЕЙ - ШТАММ «ПЕТРИКОВСКИЙ-2006» / Ситюк Н.П.

В статье приведены результаты выделения возбудителя болезни Ауески из патологического материала от поросят. Проведена его идентификация с определением чувствительности к хлороформу, постановкой биологической пробы на кроликах и определением степени антигенного родства с производственными штаммами. Проведено депонирование штамма “Петриковский –2006” вируса болезни Ауески в Государственном научно-исследовательском институте биотехнологий и штаммов микроорганизмов.

Ключевые слова: вирус болезни Ауески, индикация, идентификация, депонирование

DETERMINATION OF ANTIGENIC PROPERTIES OF THE AUJESZKY PORCINE VIRUS “PETRIKIVSKIY-2006” STRAIN / Sytiuk M.

Introduction. *Aujeszky's disease (AD) is known for 110 years by humanity as a contagious viral disease of all kinds of animals, wild and fur-bearing animals. Typical symptoms of AD are lesions of brain and spinal cord, itch and scratch, the last symptom is not characteristic of pigs. According to symptoms of AD in pigs they differ depending on age and the virulence of the virus.*

Pathogen is pantropic. It can be isolated from the upper respiratory tract, lungs and after 48 hours from the brain, spleen, kidney, salivary glands, tonsils, lymph nodes skin. After 8 days, the virus disappears in central nervous system.

Laboratory rabbits, minks, cats are susceptible to the Aujeszky virus therefore they used as a biological model in the formulation of bioassay.

In laboratory conditions AD virus is cultivated in primary and passaged cell culture of different origin. In antigenic ability the AD agent is homogeneous.

The goal of the work. *To extract, identify and study the antigenic properties of the Aujeszky virus isolate "Petrikivskiy-2006".*

Materials and methods of research. *Pathological material (pieces of brain, lungs, kidney, lymphonodes, tonsils) which was selected from 3 destroyed and 2 corpses of rearing pigs from farms of Petrykivka district of Dnepropetrovsk region in 2006.*

For indication of virus isolate was used modern equipment the laminar box and CO₂ incubator of company JOUAN, inverted microscope of ZEISS AXIOVERT and 25 plastic microplates flat and U-shaped bottom of Sarstedt, inc. Newton, NC 28658 Made in USA, Glass mattresses volume of 50 cm³, and eight-channel single-channel automatic droppers of company BIOHIT 50-250 ml; growth medium: DMEM, 199, 0.02 % solution of versen for cell, bovine serum without preservative native, 0.25% trypsin solution in phosphate buffer for cell culture produced by Bio-Test Laboratory; passaged cell culture of POPs; chloroform; 2 white rabbits weighing of 2,0 and 2,3 kg.

Determination of isolate "Petrikivskyy 2006" infectious activity and compare it with production strains. Aujeszky virus strains for testing were taken from the depository DNKIBSHM virulent "Arsk", "188" and a commercial vaccine against Aujeszky "Begonia" production strain. Cell culture BHK-21 has been inoculated with each strain and were 4 successive passages in glass mattresses volume of 50 cm³, with full of monolayer.

To obtain hyperimmune serum we used "Petrikivskyy-2006" isolate of Aujeszky virus with a titer of infectious activity TTSD50 107.7 lg/cm³ (virus content culture broth) which was inactivated by formaldehyde and tested in three consecutive passages completeness inactivation of antigen. By formalin inactivated virus of Aujeszky disease added oil adjuvant Montanide ISA 25 in a ratio of 1 part adjuvant 3 parts virus content suspension. For hyperimmunisation we used 2 goats 7–8 months old. 2 cm³ of prepared antigen was injected every goat 9 times within 3.5 months intramuscularly.

Results of research and discussion. *In early 2011, we conducted a verification of previously submitted pathological material from 5 dead pigs (pieces of lungs, kidney, lymph nodes, tonsils) for viruses of Aujeszky's disease from farms PE "Omelchenko", village Hutirskiy of Petrykivka district of Dnipropetrovsk region in 23.12.2006.*

With each body we have prepared 10% suspension of pathological material that tested in 3 successive passages in cell culture POPs in glass mattresses volume of 50 cm³ of waiting period of 7–8 days with a view to a possible indication antigen.

In the first passage of any degenerative changes were observed. In another passage from the 1st to the 6th day also observed a change monolayer and only on the 7th day on the edges of the mattress recorded beginning degeneration of cells with their nearest and detachment from the bottom of a mattress that was inoculated suspension lungs. In the 3rd passage from the 4th day recorded cytopathic effect (CE) mattresses with a suspension of the lungs, and on the 5th day of suspension mattresses brain. In mattresses inoculated suspensions kidneys and lymph nodes CE did not register. In conducting the 4th and 5th passages manifestation CE noted since the 2nd day.

It was found that monolayer of cells mattress infected untreated viral suspension material recorded CE in monolayer cells and cells in monolayer mattress infected with a virus suspension treated material, CE was missing, that the virus was sensitive to chloroform. Later we had a virus titration material 6th passage in plastic plates using standard methods for each dilution of 4 well plates. The results of the studies found titer antigenic activity at $105.5 \lg \text{TSD}_{50}/\text{cm}^3$.

The next step of identification was testing of the virus in rabbits. In both rabbits in the 40th and 45th hour after inoculation observed redness, straches, and in the 48th and 54th hours respectively rabbits died. For final confirmation virological suspension was investigated by PCR. The reaction was positive.

For 4 consecutive passages recorded the reduction of term occurrence CE in cell culture BHK-21clone13/04. In other successive passages strains recorded less pronounced shortening appearance CE, from 4 to 2 hours, and the study of strain "Petrykivsky-2006" last all variables and were not accounted for 16 hours.

Also recorded and increasing titer of infectious activity of these strains for 3 passages. Especially titers of infectious activity rose significantly after the 2nd passage. The fourth passage infectious activity of these strains did not differ from the titles of the 3rd passage.

As a result of the research: 1) in PTP cell culture isolate "Petrykivsky-2006" was identified as virus of Aujeszky's disease; 2) set the sensitivity of this isolate to chloroform and infectious activity in cell culture BHK 21 of 4th passage was $7.7 \pm 0.24 \lg \text{TCD } 50/\text{cm}^3$; 3) revealed the pathogenicity of isolates for rabbits, which died on the 48th and 54th hours after inoculation; 4) revealed the presence of viral specific DNA in samples virus containing suspension.

During immunization of goats observed growth of specific antibodies against Aujeszky's disease virus. In 21 days after the 1st entry antigen antibody titer was $4.17 \pm 0.07 \log_2$. The maximum level of antibodies was 10.5 ± 0.12 and $9.83 \pm 0.07 \log_2$ respectively.

In determining the antigenic properties of AD deposited strains "Petrikivskyy 2006" "Arskiy", "18b" and "Begonia" at level 0.88, 0.81, 0.76.

Conclusions and prospects for further research:

1. At first the specific serum was obtained against strain Aujeszky "Petrikivskyy 2006" on goats with specific humoral antibody titer of 9.83 ± 0.07 and $10.5 \pm 0.12 \log_2$.

2. Neutralization test shown antigenic relationship of "Petrikivskyy 2006" strain with the strains "Arskyy", "18b" and "Begonia" at level 0.88, 0.81, 0.76 respectively.

Prospects for further research is in using of this strain in serological and virological diagnosis of AD of domestic and wild pigs in virus neutralization reaction.

Keywords: *Aujeszky disease virus, indication, identification, registration*

References

1. Bolezn' Aueski – jepizooticheskaia situacija i sovremennaja sistema mer bor'by / A. A. Kolomycev [i dr.] // Bolezni dikih zhivotnyh : tr. Mezhdunar. nauch.-prakt. konf., 28–30 sent. 2004 g., g. Pokrov. – Pokrov, 2004. – S. 134–145.
2. Pototskyi M. K. Khvoroba Auieski (Morbus Aujeszkyi, Paralysis bulbaris infectiosa) / M. K. Pototskyi // Vet. medytsyna Ukrainy. – 2009. – # 6. – S. 23–25.
3. Pejsak Z. Bolezni svinej / Z. Pejsak; per. s pol. D. V. Potapchuka. – Brest : OAO «Brestskaja tipografija», 2008. – 424 s.
4. Bolezn' Aueski // Virusnye bolezni zhivotnyh / V. N. Sjurin [i dr.]. – Moskva : VNITIBP, 1998. – S. 603–630.
5. Bolezn' Aueski (Morbus Aujeszky) / I. A. Bolockij [i dr.]. // Veterinarija Kubani. – 2009. – № 2. – S. 17–19.
6. Adaptacija virusa bolezni Aueski na novoj kulture kletok / R. H. Jusupov [i dr.] // Veterinarija. – 2003. – № 11. – S. 22–25.
7. Adaptacija virusa bolezni Aueski (pseudobeshenstvo) k kletkam nevrinomy Gasserovogo uzla krysy dlja biotehnologii vakcin i diagnostikumov / G. H. Il'jasova [i dr.] // Nejroinfekcii: beshenstvo, gubkoobraznaja jencefalopatija krupnogo rogatogo skota,

Krejtcfeldta-Jakoba i drugie prionnye bolezni; listerioz, bolezni Aueski, bolezni Teshena : materialy Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. 30–31 maja 2001 g., g. Pokrov. – Pokrov, 2001. – S. 158–160.

8. МЕВ. Kodeks zdorov'ja nazemnyh zhivotnyh. T. 1. Obshhie polozhenija / МЕВ. – 19-е изд. – 2010. – 471 s.

9. Vidbir patolohichnoho materialu vid khvorykh i zahyblykh tvaryn dlja laboratornoi diahnostryky virusnykh infektsii, yoho konservuvannia, transportuvannia ta pidhotovka do doslidzhennia / [V. H. Skybitskyi ta in.] // Praktykum z veterynarnoi virusolohii : navch. posib. / [V. H. Skybitskyi ta in.]. – K. : Vyshcha osvita, 2005. – S. 11–17.

10. Ljarski Z. Diagnostika virusnyh boleznej zhivotnyh / Z. Ljarski ; per. T. G. Orlovoj, Ja. S. Ljandesberga ; pod red. i s predisl. V. N. Sjurina. – M. : Kolos, 1980. – 400 s.

11. Priskoka V. A. Metodicheskie rekomendacii po opredeleniju antigenogo rodstva, razlichij i dominantnosti virusov v serologicheskikh reakcijah / V. A. Priskoka, A. I. Sobko, K. V. Manzij. – K., 1987. – 20 s.

12. Metodychni rekomendatsii po zastosuvanniu mikrometodu reaktsii neitralizatsii dlja serolohichnoi diahnostryky khvoroby Auieski // [uklad. M. P. Sytiuk ta in.]. – Nizhyn : PP Lysenko M. M., 2013. – 24 s.

УДК 619:615.98

УШКАЛОВ В.О., д-р вет. наук, проф., член-кор. НААН, e-mail: ushkalov63@gmail.com

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

БЕРДНИК В.П., д-р вет. наук, проф., e-mail: berdник36@gmail.com

Полтавська державна аграрна академія

МАЧУСЬКИЙ О.В., канд. вет. наук, e-mail: vetbio84@gmail.com

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

КОВТУН В.А., канд. вет. наук, e-mail: k.victoriya2012@gmail.com

ННЦ «Інститут бджільництва ім. П. І. Прокоповича»

ТІМЧЕНКО О.В., e-mail: tango_tango@i.ua

Одеська регіональна державна лабораторія ветеринарної медицини

ЦИТРОБАКТЕРІЇ – НАЙБЛИЖЧІ РОДИЧІ САЛЬМОНЕЛ

Проаналізовані дані літератури щодо біологічних характеристик мікроорганізмів роду Citrobacter, які мають багато спільного з Salmonella spp. В сучасному світі ці мікроорганізми, володіючи вираженою біологічною пластичністю, здатні до широкого поширення у зовнішньому середовищі та тривалої персистенції в організмі людини і тварин, в тому числі птиці. Тому, методи виявлення та диференціації Salmonella spp. від споріднених мікроорганізмів роду Citrobacter потребують ретельної лабораторної діагностики.

Ключові слова: мікроорганізми роду Citrobacter, Salmonella spp., диференціація, схожість.