

Таблиця – Результати вивчення імуногенних властивостей інактивованих вірусів ВПГ

Антиген	№ групи	Доза вірусу, см ³	Рівень антитіл до вірусу грипу H5, log ₂		
			До введення	Після першого введення через 3 тижні	Після другого введення через 3 тижні
Інактивований вірус 5 пасаж, титр у РГА – 0	7	0,2	АТ відсутні	АТ відсутні	2,4±2,19
Інактивований вірус, титр у РГА – 1:1024	8	0,2	АТ відсутні	АТ відсутні	3,2±1,78

Установлено, що одноразове введення птиці інактивованого вірусу високопатогенного грипу без ад'юванту не викликало імунної відповіді, тобто антитіл у сироватці крові виявлено не було. Тільки після другого введення в сироватці крові курей були виявлені специфічні антитіла в титрах 2,4–3,2 log₂.

Висновки. Результати проведених досліджень показали, що кріоконсервування досліджених вірусів за температури мінус 20 °С приводить до значного зниження їх гемаглютинуючої активності. Аналіз гемаглютинуючої активності та імуногенних властивостей інактивованих вірусів ВПГ, що зберігались за неоптимальних умов кріоконсервування, виявив корелятивну залежність цих показників.

Список літератури

1. Вирусные болезни животных [Текст] / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.Ф. Фомина. — М. : ВНИТИБ, 1998. — 928 с.
2. Инфекционная патология животных [Текст] : в 2 т. / Под ред. А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина. — М. : ИКЦ «Академкнига», 2006. — Т. 1. — 911 с.
3. Стегний, М.Ю. Изучение влияния режимов замораживания и хранения штаммов вируса диареи на стабильность нуклеотидных последовательностей их генома методом ПЦР [Текст] / Стегний М.Ю. // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. — Х., 2005. — Вип. 85. — С. 1026–1032.
4. Стегний, М.Ю. Исследование РНК штаммов вируса диареи, подвергнутых воздействию низких температур [Текст] / Стегний М.Ю. // Проблемы криобиологии. — 2005. — Т. 15, № 3. — С. 276–278.
5. OIE. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals [Electronic resource]. — Last update 14.08.2009. — Режим доступа: www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm.

ANALYSIS OF HEMAGGLUTINATION ACTIVITY AND IMMUNOGENIC CHARACTERISTICS OF CRYOPRESERVED VIRUSES

Stegniy M.Yu.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine»,
Kharkiv

There is shown in the paper, that cryopreservation of viral strains in the conditions of medium low temperature causes significant reduce of their hemagglutination activity and immunogenic characteristics.

УДК 619:616.98:578.833.3:616-076

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ – БОЛЕЗНИ СЛИЗИСТЫХ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Стеценко А.В., Герилович А.П.

ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины»,
г. Харьков

В работе рассматриваются три основных метода современной лабораторной диагностики вирусной диареи-болезни слизистых (ВД-БС) крупного рогатого скота – иммуноферментный анализ (ИФА), реакция иммунофлуоресценции (РИФ) и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Представлены краткие литературные данные и результаты собственных исследований по применению методов РИФ и ПЦР для индикации вируса ВД-БС в диагностическом материале.

В последние годы при диагностике вирусной диареи – болезни слизистых крупного рогатого скота в нашей стране и за рубежом широко применяются иммуноферментный анализ (ИФА), реакция иммунофлуоресценции (РИФ) и полимеразная цепная реакция (ПЦР), отличающиеся высокой чувствительностью, специфичностью и экспрессностью проведения исследований (1, 2, 3, 4, 6, 7).

При постановке ИФА используют полистироловые планшеты, сенсibilизированные адаптированным к перевиваемой культуре клеток предварительно концентрированным и очищенным вирусом ВД-БС.

Специфические антитела к пестивирусу получают из специфических иммунных сывороток, приготовленных иммунизацией кроликов, коз или других видов животных. Гаммаглобулины выделяют методом высаливания сернокислым аммонием с последующим использованием ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. После этого проводят конъюгирование антител с ферментом – пероксидазой хрена по методу M. Wilson et P. Nakane (3, 5).

По данным Л. А. Мниковой и соавт (2006), при исследовании методом ИФА 137 фекальных проб и 7 проб суспензии слизистой оболочки тонкого отдела кишечника павших телят раннего возраста из хозяйств Московской, Тверской и Тульской областей Российской Федерации антиген вируса диареи был выявлен, соответственно, в 8 и 14,3 % случаев (3).

Более доступными и чувствительными методами обнаружения вируса диареи являются реакция иммунофлуоресценции (РИФ) и полимеразная цепная реакция (ПЦР), разработанные в ННЦ «ИЭКВМ» (1, 4).

Материалы и методы. Реакцию иммунофлуоресценции (РИФ) при выявлении антигена вируса диареи в пробах диагностического материала ставили прямым методом, используя диагностикумы, изготовленные в отделе вирусологии по описанной ранее методике (1).

Для выявления вируса диареи методом ПЦР изоляцию суммарной РНК проводили с помощью коммерческого набора «Рибо-Сорб-50», а обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора «Реверта-Л» производства фирмы Амплисенс (Российская Федерация).

Реакцию амплификации проводили с помощью набора и системы праймеров BVDV-ULR F/R (комплементарных к 267 п.н. участку уникальных концевых повторов РНК вируса диареи КРС).

Электорофоретический анализ проводили с помощью набора для электрофореза производства НПО «Нарвак» (Москва, Российская Федерация). Концентрация агарозы в геле составляла 1,5% при силе тока 120В (4).

РНК вируса диареи крупного рогатого скота выявляли в пробах глубоко замороженной спермы быков-производителей, вагинальных соскобах от коров и нетелей и в патологическом материале абортirованных плодов и телят раннего возраста.

Результаты исследований. Методами РИФ и ПЦР всего исследовано 204 пробы глубоко замороженной спермы быков-производителей, 67 вагинальных соскобов от коров и нетелей и 108 проб патологического материала от абортirованных плодов и телят раннего возраста (табл.1).

Таблица 1. Результаты исследований диагностических проб на ВД.

Исследуемый материал	Всего проб	Обнаружено вирус диареи			
		в РИФ		в ПЦР	
		проб	%	проб	%
Глубоко замороженная сперма быков-производителей	204	23	11,3	28	13,7
Вагинальные соскобы от коров и нетелей	67	3	4,5	5	7,5
Пат.материал от аборт. плодов и телят	108	30	27,8	35	32,4
Итого	379	56	14,8	68	17,9

Как видно из материалов таблицы, антиген вируса диареи был выявлен в среднем в 14,8 % из 379 исследованных в РИФ проб. В то же время генетический материал (РНК) вируса диареи методом ПЦР был обнаружен в среднем в 17,9 % проб, что примерно на 3 % выше, чем по данным РИФ.

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что 13,7 % проб глубоко замороженная сперма быков-производителей и 32,4 % проб патологического материала от абортированных плодов и погибших телят раннего возраста содержали генетический материал вируса диареи – болезни слизистых крупного рогатого скота.

Выводы. 1. Для экстренной и надежной лабораторной диагностики ВД-БС крупного рогатого скота целесообразно использовать метод иммуноферментного анализа (ИФА), реакцию иммунофлуоресценции (РИФ) и полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

2. Метод ПЦР является более чувствительным чем РИФ при обнаружении при обнаружении вируса диареи крупного рогатого скота в диагностическом материале.

3. Вирус диареи – болезни слизистых (ВД-БС), по-видимому, имеет важное этиологическое значение в пренатальной и постнатальной патологии молодняка крупного рогатого скота в связи со способностью контаминировать сперму быков-производителей и передаваться при искусственном осеменении.

Список литературы

1. Результати комісійних випробувань наборів діагностикумів для реакції імунофлуоресценції при інфекційному ринотрахеїті та вірусній діарей великої рогатої худоби /Чечоткіна Н. П., Кучерявенко Р. О., Стеценко О. В. // Вісн. Сумського ДАУ: наук.-метод. журн. – 1999 – Вип. 4 – С. 197-199.
2. Красочко, П.А. Вирусная диарея крупного рогатого скота / В кн. Болезни крупного рогатого скота // П.А.Красочко, О.Г.Новиков, А.И.Ятусевич и др. // Минск. – 2003. – с. 41-46.
3. Мникова, Л.А., Ишкова, Т.А., Белова, Н.Б. Дифференциальная диагностика рота-, коронавирусного энтеритов, вирусной диареи – болезни слизистых крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа. В сб. Актуальные проблемы инфекционной патологии животных. Мат. междунар. научно-практ. конф., ГНУ ВНИИЭВ им. Я.Р.Коваленко, 16-17 мая 2006 г., М., «Изограф», 2006, с. 294-296.
4. Герилович, А.П. Разработка и апробация методики выявления РНК вируса диареи КРС с помощью полимеразной цепной реакции / А.П.Герилович // Мат. конф. «Современное состояние и перспективы исследований по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб, пчел». – М., 9-10, октябрь 2008. – С. 102-106.
5. Wilson, M., Nakane, P. Immunofluorescence and Related Staining Techniques. Noth – Holland Biomedical Press. Amsterdam, 1978.
6. Materials of European symposium on control of BVD-virus infection in Cattle. Lillehammer, September, 3-5, 1997.
7. Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves // M.Hilbe, H.Stalder, E.Peterhans et al. // J. Vet. Diagn. Invest, 2007, № 19, p. 28-34.

UP-TO-DATE METHODS OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF VIRAL DIARRHEA – BOVINE MUCOUS MEMBRANE DISEASE

Stetsenko O.V., Gerilovych A.P.

NSC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary medicine», Kharkiv

Three main methods of up-to-date laboratory diagnostics of viral diarrhoea – bovine mucous membrane disease – immune enzyme analysis (ELISA), immunofluorescence test and polymerase chain reaction (PCR), are considered in the paper. Literature data and results of own investigations concerning application of immunofluorescence test and polymerase chain reaction (PCR) for indication of viral diarrhoea – bovine mucous membrane disease genetic material in diagnostic material are presented in the paper.