

тоспироз кошек в г. Барнауле / Вестник АГАУ „Ветеринария. Наука на рубеже тыщчелетия”. — №3 . — Барнаул, 2001. — С.115-116. 3. Малахов Ю.А. Лептоспироз животных. — М.: Агропромиздат, 1992. — 239с. 4. Рудь О.І. Дослідження котів на лептоспироз та їх гематологічні зміни при позитивній реакції// Науковий вісник НАУ. — 2002, В. — 55.—С. 246 — 249.

ETIOLOGICAL STRUCTURE OF CATS LEPTOSPIROSIS IN SUMY REGION

Sydorenko Ye.Yu.

Sumy National Agrarian University

Alekseeva G.B.

State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Vet.-San. Expertise,
Kiev

Data of serological investigation of serum samples of cats sick on leptospirosis are presented in the article.

УДК:619:616.98:577.2

ВИПРОБУВАННЯ «ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ РНК ВІРУСУ ДІАРЕЇ ВРХ «BOVI-RNA-TEST-BVDV»

Стегній Б.Т., Герілович А.П., Кучерявенко Р.О.,
Симоненко С.І., Болотін В.І.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної
і клінічної ветеринарної медицини», Харків,

Ушкалов В.О., Постоєнко В.О., Бабкін М.В., Кацимон В.В.,
Кудрявченко О.П., Карпуленко М.С.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології
і штамів мікроорганізмів, Київ

Робота присвячена дослідженню специфічності та чутливості «Тест-системи для виявлення РНК вірусу діареї ВРХ «Bovi-RNA-test-BVDV» розробленої ННЦ «ІЕКВМ», активності її компонентів та відтворюваності отримуваних результатів. Експерименти виконано з використанням молекулярно-генетичних та аналітичних методів досліджень. В експерименті показана висока (до 1 lg ТЦД50/мл) чутливість діагностичному, відсутність крос-реакцій з гетерологічними РНК-вміщуючими вірусами ВРХ та пестивірусами. За підсумком випробувань тест-систему рекомендовано до застосування в практиці ветеринарної медицини.

Вірусна діарея ВРХ (хвороба слизових) — це досить розповсюджена в усьому світі факторна хвороба ВРХ, обумовлена РНК-вміщуючим вірусом роду **Pestivirus**, що супроводжується ураженням значного відсотку поголів'я, абортми, мертвонародженням тощо.

Перше згадування про захворювання відноситься до 1946, коли Olafson у Штаті Нью-Йорк (США) описав розлади травного тракту в телят, аборти та народження нежиттєздатних тварин. У 60-70 роки вірус

був ізольований, схарактеризований, та отримав назву вірус діареї ВРХ. Було доведено його серологічну спорідненість з вірусами КЧС та ПХ, і віднесено до родини *Flaviviridae*, роду ***Pestivirus*** [1].

Вірус добре розмножується в первинних та перещеплюваних культурах клітин. У групі цитопатогенних штамів розрізняють дві підгрупи штамів – подібні до штаму Oregon, які спричиняють появу ЦПД у вигляді вакуолізованих клітин культури та супресію росту клітинного моно шару. Друга – штами подібні за типом ЦПД до референтного штаму NADL, котрі індукують дегенерацію, округлення та відторгнення клітин моношару. Найкращі показники росту вірусної активності з числом проведених пасажів спостерігають при інокуляції вірусу в культури клітин жуйних тварин. Проте є дані щодо адаптації збудника до клітин свиней (РК-15), хом'яків (ВНК) та ін. [2, 3].

Дослідниками захворювання встановлено, що вірус потенційно може інфікувати усі статеві та вікові групи тварин, при цьому ступінь його патогенності залежить від віку, виду та породи тварин. Перехворілі індивіди стають вірусоносіями на все життя. Клініка ВД ВРХ також сильно варіює. Це може бути гостре респіраторне захворювання, ентеральні розлади, розлади репродуктивної системи, висипання на слизових оболонках тощо [3, 4, 5].

За даними вчених з університету Арканзас хвороба може мати декілька форм: гостра, фетальна, персистентна інфекція, системне ураження слизових оболонок [6]. Якщо перші три форми вже давно стали класичними представниками в ряду нозоодиниць більшості держав світу та належать до факторних хвороб, останню форму класифікують, як емерджентну. У зв'язку з цим гостро постають питання щодо створення засобів контролю інфекції, зокрема ранньої діагностики та контролю об'єктів ветеринарного нагляду, особливо ветеринарних імунобіологічних препаратів та сперми ВРХ, що є найбільш вірогідними факторами передачі цього неендемичного варіанту збудника.

Метою цієї роботи було проведення виробничих випробувань «Тест-системи для виявлення РНК вірусу діареї ВРХ «Bovi-RNA-test-BVDV», розробленої в ННЦ «ІЕВМ».

Матеріали і методи. Під час комісійних випробувань оцінювали показники зовнішнього вигляду, активність, специфічність, чутливість компонентів «Тест-системи для виявлення РНК вірусу діареї ВРХ «Bovi-RNA-test-BVDV» та відтворюваність результатів.

Для комісійних випробувань тест-системи щодо специфічності та чутливості було використано зразки сумарної ДНК з вірусовміщуючого матеріалу:

1. Зразки сумарної кДНК вірусу діареї ВРХ (референтні зразки):
 - кДНК штаму Oregon ВД ВРХ (2, 4 та 6 lg ТЦД₅₀/мл),
 - кДНК штаму NADL ВД ВРХ (1, 4 та 6 lg ТЦД₅₀/мл).
2. Зразки сумарної кДНК вірусу діареї ВРХ (польові зразки):
 - кДНК з вірусовміщуючого матеріалу (змиви генітальні та сперма ВРХ), присутність ВД в яких показана за РІФ (10 зразків).
3. Негативні зразки:

– зразки сумарної кДНК від здорових щодо ВД РІФ-негативних-тварин (польові зразки), 10 зразків.

4. Гетерологічні зразки (генетичний матеріал збудників, що не відносяться до вірусу діареї ВРХ):

- вірус лейкозу ВРХ,
- вірус касичної чуми свиней,
- ротавірус ВРХ.

Полімеразна ланцюгова реакція була поставлена згідно з Листівкою-вкладкою до тест-системи. Відхилень від її положень під час роботи не було. З метою визначення відтворюваності результатів, отримуваних при застосуванні ПЛР тест-системи дослідження проб було проведено триразово.

Таблиця 1 – Програма ампліфікації

<i>№ циклу</i>	<i>Температура</i>	<i>Час</i>	<i>Кількість циклів</i>
1	95° С	12 хв.	1
2	95° С	45 сек.	2
	62° С	45 сек.	
	72° С	1 хв.	
3	95° С	45 сек.	2
	60° С	45 сек.	
	72° С	1 хв.	
4	95° С	45 сек.	2
	57° С	45 сек.	
	72° С	1 хв.	
5	95° С	45 сек.	25
	55° С	45 сек.	
	72° С	1 хв.	
6	72° С	5 хв.	1
7	10° С	Пауза	1

Результати досліджень. Випробування були проведені з метою комісійної перевірки чутливості та специфічності тест-системи та відтворюваності отримуваних при її використанні результатів.

На початку роботи комісією було перевірено комплектність ПЛР тест-системи. Усі необхідні для роботи компоненти та інструкція були в наявності.

Тест-система складалася з наступних компонентів:

- реакційний буфер — прозора синя рідина;
- розчини праймерів — прозора безбарвна рідина;
- масло мінеральне — безбарвна або жовтувата в'язка рідина;
- магнію сульфат — прозора безбарвна рідина;
- вода деіонізована — прозора безбарвна рідина;

- буфер TBE — порошок білого кольору;
- агароза для електрофорезу — порошок білого кольору;
- етидію бромід — червона прозора рідина;

За результатами проведеної перевірки чутливості, тобто здатності до визначення всіх зашифрованих завідомо позитивних зразків, було встановлено, що тест-система здатна до виявлення кДНК вірусу діареї ВРХ при титрі в пробі на рівні 1, 4 та 6 lg ТЦД₅₀/мл. Саме такий мінімальний титр 1 lg вірусу ми фіксували в спермі ВРХ та контамінованих культурах клітин наших ранніх роботах.

Специфічність тест-системи доведена за відсутністю ампліконів будь-якого розміру в зразках від інтактної ВРХ. Крім того, розроблені праймери не гібридизувались зі зразками кДНК вірусів класичної чуми свиней, рота вірусу ВРХ та провірусною ДНК-матрицею вірусу лейкозу ВРХ (табл. 2).

При постановці ПЛР було відмічено повний збіг результатів випробувань у трьох повторах при аналогічних умовах та при використанні різних ампліфікаторів одного типу.

Таблиця 2 — Результати комісійної перевірки тест-системи.

<i>Зашиф- рований номер</i>	<i>Зразки</i>	<i>Резуль- тат 1 повтору</i>	<i>Резуль- тат 2 повтору</i>	<i>Резуль- тат 3 повтору</i>
1	2	3	4	5
1	кДНК штаму Oregon ВД ВРХ (6 lg ТЦД ₅₀ /мл)	позитив- ний	позитив- ний	позитив- ний
2	кДНК штаму Oregon ВД ВРХ (4 lg ТЦД ₅₀ /мл)	позитив- ний	позитив- ний	позитив- ний
3	кДНК штаму Oregon ВД ВРХ (2 lg ТЦД ₅₀ /мл)	позитив- ний	позитив- ний	позитив- ний
4	кДНК штаму NADL ВД ВРХ (6 lg ТЦД ₅₀ /мл)	позитив- ний	позитив- ний	позитив- ний
5	кДНК штаму NADL ВД ВРХ (4 lg ТЦД ₅₀ /мл)	позитив- ний	позитив- ний	позитив- ний
6	кДНК штаму NADL ВД ВРХ (1 lg ТЦД ₅₀ /мл)	позитив- ний	позитив- ний	позитив- ний
7	кДНК з вірусовміщуючого матеріалу*	позитив- ний	позитив- ний	позитив- ний
8	кДНК з вірусовміщуючого матеріалу*	позитив- ний	позитив- ний	позитив- ний
9	кДНК з вірусовміщуючого матеріалу*	позитив- ний	позитив- ний	позитив- ний
10	кДНК з вірусовміщуючого матеріалу*	позитив- ний	позитив- ний	позитив- ний
11	кДНК з вірусовміщуючого матеріалу*	позитив- ний	позитив- ний	позитив- ний
12	кДНК з вірусовміщуючого матеріалу**	позитив- ний	позитив- ний	позитив- ний

1	2	3	4	5
13	кДНК з вірусовміщуючого матеріалу**	позитивний	позитивний	позитивний
14	кДНК з вірусовміщуючого матеріалу**	позитивний	позитивний	позитивний
15	кДНК з вірусовміщуючого матеріалу**	позитивний	позитивний	позитивний
16	кДНК з вірусовміщуючого матеріалу**	позитивний	позитивний	позитивний
17	сумарна кДНК від здорової щодо ВД тварини***	негативний	негативний	негативний
18	сумарна кДНК від здорової щодо ВД тварини***	негативний	негативний	негативний
19	сумарна кДНК від здорової щодо ВД тварини***	негативний	негативний	негативний
20	сумарна кДНК від здорової щодо ВД тварини***	негативний	негативний	негативний
21	сумарна кДНК від здорової щодо ВД тварини***	негативний	негативний	негативний
22	сумарна кДНК від здорової щодо ВД тварини***	негативний	негативний	негативний
23	сумарна кДНК від здорової щодо ВД тварини***	негативний	негативний	негативний
24	сумарна кДНК від здорової щодо ВД тварини***	негативний	негативний	негативний
25	сумарна кДНК від здорової щодо ВД тварини***	негативний	негативний	негативний
26	сумарна кДНК від здорової щодо ВД тварини***	негативний	негативний	негативний
27	вірус лейкозу ВРХ	негативний	негативний	негативний
28	вірус класичної чуми свиней	негативний	негативний	негативний
29	ротавірус ВРХ	негативний	негативний	негативний

* – генітальні змиви;

** – сперма ВРХ;

*** – РІФ-негативний матеріал від клінічно здорових тварин.

Висновки. 1. Специфічність «Тест-системи для виявлення РНК вірусу діареї великої рогатої худоби «Bovi-RNA-Test-BVDV» розробки Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» має належний рівень і визначається наявністю специфічного фрагменту розміром 287 п.н. у «позитивних» зразках і відсутністю цього фрагмента у «негативних» зразках – від інтактних тварин.

2. Чутливість даної системи можна вважати задовільною, та такою, що переважає класичні методи ізолювання збудника за чутливістю, ос-

кільки позитивні результати було отримано на всіх позитивних зразках клінічного матеріалу, в розведеннях вірусу діареї великої рогатої худоби з низькою концентрацією специфічної кДНК.

3. Праймери та інші компоненти запропонованої тест-системи є високочутливими, специфічними та відповідають вимогам ТУУ.

4. Відтворюваність методики виявлення РНК вірусу діареї великої рогатої худоби, що лежить в основі роботи ПЛР тест-системи має належний рівень: у всіх трьох повторях розходжень результатів не спостерігалось.

Перспективи подальших досліджень. Як показали комісійні випробування «Тест-системи для виявлення РНК вірусу діареї великої рогатої худоби «Bovi-RNA-Test-BVDV» розробки Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» показники її якості, такі, як чутливість, специфічність та відтворюваність знаходяться на належному рівні. У зв'язку з цим ця тест-система може бути рекомендована до застосування в практичній роботі ветеринарних лабораторій для виявлення РНК вірусу діареї великої рогатої худоби.

Список літератури

1. Livestock Health Series. Bovine Virus Diarrhea BVD [Electronic resource] / Mode of access: [www/ URL: http://www.uaex.edu/Other_Areas/publications/PDF/FSA-3093.pdf](http://www.uaex.edu/Other_Areas/publications/PDF/FSA-3093.pdf) – Title from the screen. 2. Bovine viral diarrhea virus [Electronic resource] / Mode of access: [www/ URL: http://www.vetmed.auburn.edu/~brockkv/bvdv.htm](http://www.vetmed.auburn.edu/~brockkv/bvdv.htm). – Title from the screen. 3. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon [Text] / S-E. Behrens [et al] // J Virol. – Vol. 72. – P. 2364–2372. 4. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon [Text] / B. Charleston [et al] // J Gen Virol. – 2001. – Vol. 82. – P. 1893–1897. 5. Moennig, V. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus [Text] / V. Moennig, B. Liess // Vet. Clin. North Am. – 1995. – Vol. 11, № 3. – P. 477–487. 6. Severe acute bovine viral diarrhea (BVD) in Ontario, 1993–1995 [Text] / S. Carman [et al] // J. Vet. Diagn. Invest. – 1998. – Vol. 10, № 1. – P. 27–35.

TESTING OF “TEST-KIT FOR DETECTION OF BOVINE DIARRHEA VIRUS RNA «BOVI-RNA-TEST-BVDV»

Stegniy B.T., Gerilovych A.P., Kucheryavenko R.O.,
Simonenko S.I., Bolotin V.I.

National Scientific Center “Institute of Experimental
and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv,

Ushkalov V.A., Postoyenko V.A., Babkin M.V., Katsimon V.V.,
Kudryavchenko A.P., Karpulenko M.S.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and strains of
microorganisms, Kyiv

The work has been done is devoted to the study of specificity and sensitivity of “TestKIT for the detection of RNA virus diarrhea of cattle «Bovi-RNA-test-BVDV», developed by NSC IECVM, the activity of its components and the reproducibility of results. The experiments were performed using molecular genetic and analytical research methods. The experiment shows the high (up to 1 lg TCD50/ml) sensitivity of the kit, lack of cross-reactions with heterologous RNA-containing viruses of cattle and pestiviruses. Following testing the kit was recommended for use in the practice of veterinary medicine.