

## Список літератури

1. Nayar, G. P., Hamel, A. & Lin, L. (1997). Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can Vet J* 38, – P. 385-386. 2. Sanchez, R. E., Nauwynck, H. J., McNeilly, F., Allan, G. & Pensaert, M. B. (2001). Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different ages of gestation. *Vet Microbiol* 83, – P. 169-176. 3. Segales, J., Allan, G. M. & Domingo, M. (2005). Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 6, – P. 119-142. 4. ICTVdB – The Universal Virus Database, version 4. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB\\_5](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB_5). Allan, G. M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clark, E. G., Ellis, J. A., Haines, D. M., Meehan, B. M. & Adair, B. M. (1998). Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* 10, – P. 3-10. 6. Meerts, P., Van Gucht, S., Cox, E., Vandebosch, A. & Nauwynck, H. J. (2005b). Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol* 18, – P. 333-341. 7. Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segales, J. & Mateu, E. (2007). Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet Microbiol* ( on line doi:10.1016/j.vetmic.2007.06.004). 8. Пейсак, З. Цирковирусы свиней как одна из основных оздоровительных проблем свиноводов в Европе. В сб.: «СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ И НАПРАВЛЕНИЯ В СВИНОВОДСТВЕ. Труды Съезда Свиноводов Украины, 2008 год, Киев, 2009, – С. 128-131. 9. Коцюмбас, І.Я., Патерега, І.П., Чура, Д.О., Малик, О.Г. / Методика токсикологічного контролю нових ветеринарних препаратів // Вет. мед. Укр. – 2001. – № 2. – С. 17-20.

PRE-CLINICAL APPROBATION OF INACTIVATED VACCINE AGAINST PORCINE 2<sup>ND</sup> TYPE CIRCOVIRUS INFECTION

**Buzan A.I., Stegnyy B.T., Koltchik O.V., Vovk S.I., Korovin I.V., Zaremba O.V.**

*National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv,*

**Severin R.A., Golovko V.O.**

*Kharkiv State Zooveterinary Academy*

*Three lab batches of inactivated (by formalin) vaccine against porcine 2<sup>nd</sup> type circovirus (PCV2) infection is prepared from field isolate of agent, which was identified as PCV2 with use of reference strain and serum from P1Wet (Poland). Batch 3 (emulsified vaccine consisting PCV2 inactivated biomaterial, Marcol 52 oil, E139 emulgator and vitamin E) showed most significant immunological changes in vaccinated swine: on 21<sup>st</sup> day after second intradermal vaccination (with 3 week intervals, in dose 0.6 ml) porcine serums (n=4) had an antibodies titres in ELISA 1:400 – 1:800.*

УДК 619:616.578.2:639.371.13

## МОНІТОРИНГ ВІРУСНОЇ ГЕМОРАГІЧНОЇ СЕПТИЦЕМІЇ ФОРЕЛІ В РИБОГОСПОДАРСТВАХ УКРАЇНИ

**Гайдей О.С.,\* Дерябін О.М., Головка А.М.,**

*Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Київ*

Серед особливо небезпечних захворювань риб, згідно класифікації МЕБ, важливе місце займає вірусна геморагічна септицемія форелі, яка завдає рибним господарствам у світі надзвичайно великі збитки [1, 5]. Вірусна геморагічна септицемія (ВГС) – інфекційне захворювання, що уражує близько 45 видів риби і вже зареєстроване у 28 країнах світу, серед яких потенційну небезпеку для України у зв'язку із завезенням рибопосадкового матеріалу, риболовного інвентарю та готової рибної продукції [2], становлять країни-сусіди – Польща та Туреччина.

Збудником ВГС є РНК-вмісний вірус, який відноситься до родини *Rhabdoviridae* роду *Novirhabdovirus* [3, 4]. На сьогодні відомо 4 групи генотипів вірусу, перша та остання з яких підрозділені на 5 та 2 підгрупи відповідно [1, 5]. Сучасна діагностика базується на молекулярно-біологічних (ЗТ-ПЛР), серологічних (ІФА, РІФ) методах діагностики та ізоляції вірусу в чутливій перещеплюваній культурі клітин [2, 5].

Мета роботи: проведення впродовж 2009-2010 років моніторингових досліджень в зареєстрованих рибогосподарствах України щодо вірусної геморагічної септицемії форелі.

**Матеріали і методи.** Об'єктом дослідження була райдужна форель трьох вікових груп: мальки до 2 см, мальки розміром 4-6 см та доросла риба 15 см.

Для аналізу відбирали від дорослих риб нирки та селезінку, а мальки до 2 см використовувались повністю. Всі проби об'єднували з розрахунку – 1 проба з 10 відібраних риб. Гомогенати були приготовані на транспортному середовищі Eagles MEM (буферна система-0,1 M Tris-HCl) у співвідношенні 1:5.

Одночасно з експрес-методами діагностики, проводили декілька послідовних («сліпих») пасажів в чутливих перещеплюваних культурах клітин BF-2 та RTG-2. Пасажи виконували на підтримуючому середовищі Eagles MEM (pH 7, 6) з додаванням 2 % фетальної сироватки телят та 200 мкг/мл гентаміцину. Культивування проводили при температурі 15 °С.

Виділення РНК із зразків та після пасажів в культурі клітин, реакцію зворотної транскрипції та полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) виконували за допомогою комерційних наборів: «Рибозоль-А», «РЕВЕРТА-Л» та «Амплиценс 200-1» («Амплиценс», Росія).

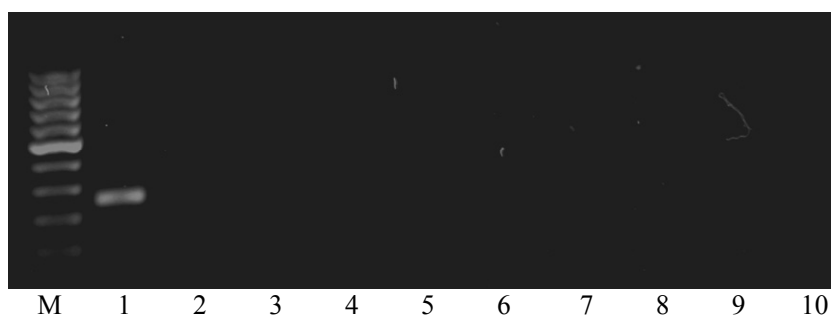
Виявлення в сироватках крові специфічних антитіл до вірусу ВГС виконували за допомогою діагностичної тест-системи «VHS Ag-ELISA» (Чехія) згідно інструкції виробника.

В якості позитивного контролю були використані: референтний штам вірусу геморагічної септицемії форелі (ВВГС) – «DH4p101» [AY546581] (Данія) та місцевий ізолят з Польщі «PL-1», які були люб'язно надані професором Єжи Антиховичем – завідувачем відділу заразних хвороб риб Національного Інституту Ветеринарії (Пулава, Польща). Всі вказані штами відносяться до генотипу I-а ВВГС.

Для проведення ЗТ-ПЛР була використана тест-система «ВГС-ТЕСТ», розробки ДНКБШМ (заявка на патент № u 2010 03941 від 06.04.2010 р.), яка ідентифікує консервативну ділянку гена нуклеопротеїну (N) вірусу геморагічної септицемії форелі. Додатково були використані олігонуклеотидні праймери *OIE-F*, *OIE-R*, які специфічні до гену нуклеопротеїну (N) і рекомендовані МЕБ [5].

**Результати досліджень.** Моніторингові дослідження були проведені у зареєстрованих форелевих господарствах 6 регіонів України: Закарпатської, Чернівецької, Львівської, Рівненської, Волинської областей та АР Крим, оскільки дані регіони межують з країнами, неблагополучними щодо ВГС (Польща, країни Західної Європи, Туреччина). В результаті проведеного обстеження водойм господарств була відібрана риба різних вікових груп, яка мала деякі клінічні ознаки, що характерні для ВГС, а саме: потемніння шкіри, екзофтальмія та порушення координації плавальних рухів, що спостерігається при нервовій формі захворювання. Зразки були відібрані за температури повітря та води, оптимальної для розмноження ВВГС.

Для молекулярно-біологічного аналізу були приготовані 8 об'єднаних зразків (рисунок 1).



**Рис. 1** Електрофоретичний аналіз в 1,5 % гелі агарози продуктів ЗТ-ПЛР: М – маркер «100 bp Ladder» (Fermentas); 1 – референтний штам ВВГС «DN4p101»; 2 – негативний контрольний зразок; 3 – зразок об'єднаного матеріалу риб (Волинська обл.); 4 – зразок об'єднаного матеріалу риб (Закарпатська обл.); 5 – зразок об'єднаного матеріалу риб (Львівська обл.); 6 – зразок об'єднаного матеріалу риб (Рівненська обл.); 7 – зразок об'єднаного матеріалу риб (Чернівецька обл.); 8 – зразок об'єднаного матеріалу риб (Чернівецька обл.); 9 – зразок об'єднаного матеріалу риб (Львівська обл.); 10 – зразок об'єднаного матеріалу риб (АР Крим).

Як видно за результатами електрофоретичного аналізу продуктів ампліфікації – генетичного матеріалу вірусу ВГС в об'єднаних зразках внутрішніх органів форелі (нирки, селезінка) не виявлено (таблиця 1).

**Таблиця 1** – Результати моніторингу ВВГС в рибогосподарствах України за період 2009-2010 років

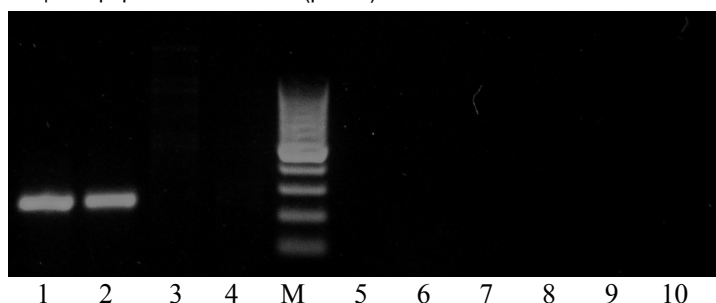
№ п/п	Область	Район	Результати виявлення генетичного матеріалу ВВГС		
			Праймери МEB	Тест-система «ВГС-ТЕСТ»	КК
1	Волинська	Луцький с. Рокині	негативний	негативний	негативний
2	Закарпатська	Мукачівський с. Залужжя	негативний	негативний	негативний
3	Львівська	Миколаївський	негативний	негативний	негативний
4	Рівненська	Здолбунівський	негативний	негативний	негативний
5	Чернівецька	Вижницький с. Банилів	негативний	негативний	негативний
6	Чернівецька	Куманський	негативний	негативний	негативний
7	Львівська	Львівський	негативний	негативний	негативний
8	АР Крим	м. Алушта	негативний	негативний	негативний

З метою всебічної оцінки епізоотологічного стану господарств на наявність ВГС було проведено серологічне тестування методом імуноферментного аналізу сироваток крові від райдужної форелі віком 1 рік та спроба ізоляції вірусу в чутливих культурах клітин. Результати проведених серологічних досліджень з використанням комерційної тест-системи «VHSV Ag-ELISA» (Чехія), показали, що сироватки крові, які відібрані від райдужної форелі в господарствах Західної України не містять специфічних антитіл до вірусу ВГС (таблиця 2).

**Таблиця 2** – Результати моніторингу ВВГС методом ІФА

№ п/п	Область	Кількість сироваток	Результат тестування
1	Волинська	2	Негативний
2	Закарпатська	2	Негативний
3	Львівська	2	Негативний
4	Рівненська	2	Негативний
5	Чернівецька	2	Негативний

Після проведення послідовних «сліпих» пасажів в моношарових перещеплюваних культурах клітин BF-2 та RTG-2 з патматеріалами форелі ознак цитопатичної дії (ЦПД) не спостерігалось. Додатково лізати культур клітин були перевірені в ЗТ-ПЛР – вірус геморагічної септицемії форелі не виявлено (рис 2).



**Рис. 2** Електрофоретичний аналіз в 1,5 % гелі агарози продуктів ЗТ-ПЛР: М – маркер „100 bp Ladder” (Fermentas); 1 – референтний штам ВВГС «DN4p101»; 2– ізолят «PL-1» (Польща); 3 – лізат культури клітин BF-2; 4 – лізат культури клітин RTG-2; 5 – зразок об'єднаного матеріалу риб (Закарпатська обл.); 6 – зразок об'єднаного матеріалу риб (Львівська обл.); 7 – зразок об'єднаного матеріалу риб (Рівненська обл.); 8 – зразок об'єднаного матеріалу риб (Чернівецька обл.); 9 – зразок об'єднаного матеріалу риб (Чернівецька обл.); 10 – зразок об'єднаного матеріалу риб (Львівська обл.).

В зареєстрованих господарствах планується проводити щорічний моніторинг вірусної геморагічної септицемії форелі.

**Висновки.** За результатами моніторингових досліджень матеріалів із зареєстрованих форелевих господарств України протягом 2009-2010 років з використанням молекулярно-біологічних (ЗТ-ПЛР), серологічних (ІФА) методів діагностики та ізоляції вірусу в чутливих перещеплюваних культурах клітин BF-2 та RTG-2, встановлено, що рибогосподарства України на 2010 рік благополучні щодо вірусної геморагічної септицемії форелі.

*Список літератури*

1. Гайдей, О. Проблеми лабораторної діагностики вірусної геморагічної септицемії райдужної форелі / О.Гайдей, Л. Дудар. – Ветеринарна медицина [Міжвідомчий тематичний збірник], Харків, 2009. – №92. – С. 98. 2. Arun Ammayappan. Molecular characterization of the Great Lakes viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) isolate from USA / Arun Ammayappan, Vikram N Vakharia. -Virology Journal, 2009. – Vol.6. – P.171-187. 3. Elsayed, E. Isolation of viral hemorrhagic septicemia virus from muskullenge, Esox masquenongy (Mitchill) in Lake St. Claire, Michigan, USA reveals a new sublineage of the American genotype. / Elsayed E., Faigal M. – Journal of Fish Disease, 2006. – Vol.29, P. 611-619. 4. Mohamed Taisal. Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from leech Myzobella lugubris Leidy, 1851. / Mohamed Taisal, Caralyn A Schulz. – Parasites and Vectors, 2009. – Vol. 2, P. 45-49. 5. Viral haemorrhagic septicaemia//O.I.E. Manual of diagnostic test for Aquatic animals, adopt 03.2009.

**Monitoring of trout virus hemorrhagic septicemia at the fish farms of Ukraine**

**Gaydey O.S., Deryabin O.M., Golovko A.M.,**

*State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv*

*Results of monitoring investigations concerning trout virus hemorrhagic septicemia at the registered fish farms of Ukraine are presented in the paper. There was determined, that fish farms of Ukraine are safe concerning trout virus hemorrhagic septicemia for 2010.*

УДК 619:616.578.2:988.21

**ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСУ СКАЗУ ЗА ДОПОМОГОЮ «ГНІЗДОВОГО» ВАРІАНТУ ЗВОРотно-ТРАНСКРИПТАЗНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ**

**Головко М.А.\***

*Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Україна, Київ*

Сказ – особливо небезпечна гостра вірусна хвороба тварин і людини, яка характеризується ознаками поліенцефаломієліту, паралічами і абсолютною смертністю. У відповідності до оцінки ВООЗ, вона входить у п'ятірку найбільш небезпечних зооантропонозів, що завдають величезні соціально-економічні збитки. Соціальне та економічне значення сказу підвищується в зв'язку з глобальним розповсюдженням епізоотії сказу природнього та антропоургічного (міського) типу.

У системі заходів боротьби зі сказом свійських та диких тварин в сучасних умовах вирішальне значення набуває своєчасна та надійна лабораторна діагностика. Одним з найбільш ефективних методів ранньої діагностики сказу може бути виявлення збудника за допомогою зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) [1].

Збудником сказу є РНК-вмісний вірус який відноситься до роду *Lyssavirus*, родини *Rhabdoviridae*, порядку *Mononegavirales*. Геном вірусу представлений несеgmentованою односпіральною РНК довжиною 12 кілобаз, що кодує п'ять структурних білків: нуклеопротеїн (N), фосфопротеїн (P), матричний білок (M), глікопротеїн (G) та РНК-залежну РНК-полімеразу (L). Геном вірусу містить декілька некодуючих регіонів, в тому числі "псевдоген" GL (Ψ-регіон). Для молекулярної детекції та ідентифікації вірусу сказу найчастіше обирають в якості мішені ген нуклеопротеїну або глікопротеїну [2, 3]. Актуальність таких досліджень полягає, в першу чергу, в розробці високоспецифічної (враховуючи існування різних генотипів) та чутливої тест-системи для проведення швидкої прижиттєвої та постмортальної діагностики сказу.

Мета роботи: перевірка специфічності розробленої діагностичної системи «RABIES-ТЕСТ» (ДНКІБШМ) з тестовим, вакцинними штамми та патологічними матеріалами від різних видів тварин.

**Матеріали і методи:** Для дослідження були використані: позитивний контроль вірусу сказу тест-штам CVS, вакцинні штами Щолково-51к, РБ-71, ТС-80 (усі – з колекції ДНКІБШМ), вакцинний штам Сайраб та 12 зразків (1 негативний) патологічного матеріалу від різних тварин з підозрою на сказ, які були попередньо перевірені в МФА та біологічній пробі в лабораторії сказу ІВМ НААНУ (Гришок Л.П.).

Дослідження виконані з використанням діагностичної тест-системи для виявлення вірусу сказу «RABIES – ТЕСТ», яка розроблена в ДНКІБШМ (заявка на патент №u2010 05220 від 29.04.2010 р.).

Виділення РНК, зворотно-транскрипцію, ампліфікацію та електрофоретичний аналіз отриманих продуктів проводили згідно інструкції до тест-системи «RABIES – ТЕСТ».

**Результати досліджень.** В тест-системі «RABIES – ТЕСТ» був використаний «гніздовий» варіант полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який забезпечує високу чутливість реакції в цілому. Для підвищення специфічності реакції, враховуючи можливість циркуляції на території України кількох генотипів вірусу сказу, в діагностичній системі використовуються «вироджені» олігонуклеотидні праймери до гену нуклеопротеїну. Для перевірки тест-системи були підібрані зразки з вірусом сказу в патологічному матеріалі та після культивування в перещеплюваних культурах клітин. Результати представлені в таблиці 1.

**Таблиця 1** – Результати порівняльних досліджень патологічного матеріалу та вакцинних штамів вірусу сказу методами ЗТ-ПЛР, біопробу та МФА

№ реєстр. (лаб. сказу ІВМ НААНУ)	Вид тварин	Зразок	Результат		
			МФА	Біопроба	ЗТ-ПЛР
1	2	3	4	5	6
Тест-штам CVS	миша	патматеріал	поз.	поз.	поз.
09D58	собака	патматеріал	поз.	поз.	поз.