

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.

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія

Продовження табл. 1

1	2	3	4	5	6
08C39	кіт	патматеріал	поз.	поз.	поз.
09D71	собака	патматеріал	поз.	поз.	поз.
09C66	кіт	патматеріал	поз.	поз.	поз.
09D95	собака	патматеріал	нег.	нег.	нег.
09F94	лисиця	патматеріал	поз.	поз.	поз.
09D93	собака	патматеріал	поз.	поз.	поз.
09C92	кіт	патматеріал	поз.	поз.	поз.
09D84	собака	патматеріал	поз.	поз.	поз.
09F108	лисиця	патматеріал	поз.	поз.	поз.
09CO111	корова	патматеріал	поз.	поз.	поз.
09B136	борсук	патматеріал	поз.	поз.	поз.
Вакцина	Щолково-51к (Україна)	культуральна	поз.	поз.	поз.
Вакцина	РБ-71 (Білорусь)	культуральна	поз.	поз.	поз.
Вакцина	Сайраб (Україна)	культуральна	поз.	поз.	поз.
Вакцина	ТС-80 (Росія)	культуральна	поз.	поз.	поз.

Результати молекулярно-біологічного методу виявлення вірусу сказу повністю співпадали з результатами двох інших методів – біологічною пробою та методом флуоресціюючих антитіл (МФА).

Тест – система «RABIES–ТЕСТ» була ефективною при дослідженні як вакцинних штамів вірусу сказу (рис. 1, результат після другої реакції ампліфікації), так і патологічних матеріалів від різних видів тварин (рис.2, необхідна чутливість і специфічність досягається вже після першої реакції ампліфікації).

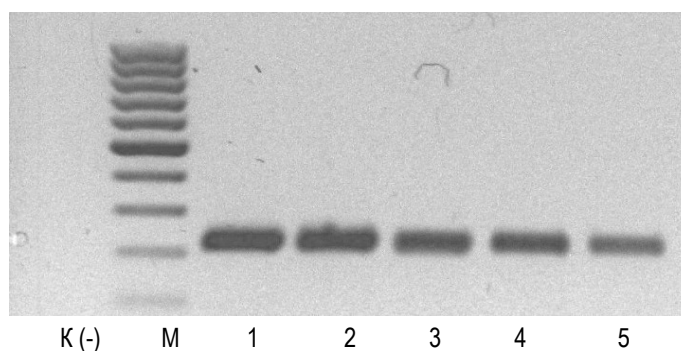


Рисунок 1 – Електрофоретичний аналіз в 1,5 % гелі агарози продуктів ЗТ-ПЛР: К (-) – собака (09D95), М – маркер «100 bp DNA Ladder» (Fermentas), 1– тест-штам CVS, 2 – вакцинний штам Щолково-51к, 3 – вакцинний штам РБ-71, 4 – вакцинний штам Сайраб, 5 – штам вакцинний ТС-80.

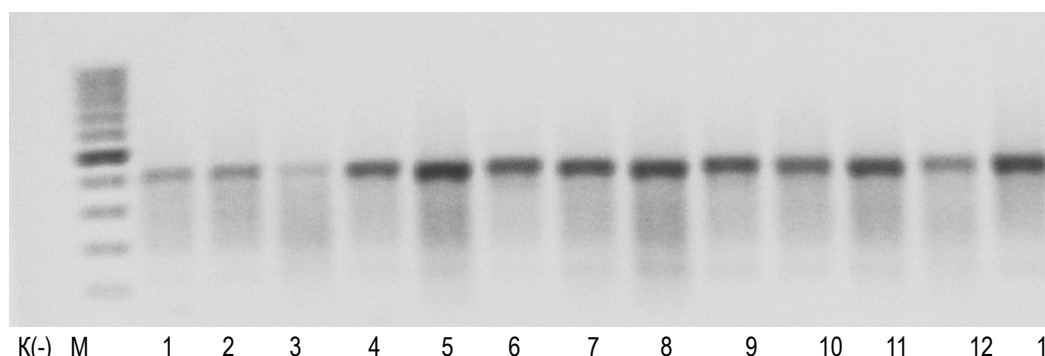


Рисунок 2 – Електрофоретичний аналіз в 1,5 % гелі агарози продуктів ЗТ-ПЛР: К(-) – собака (09D95), 1 – собака (09D58), 2 – кіт (08C39), 3 – собака (09D71), 4 – кіт (09C66), 5 – лисиця (09F94), 6 – собака (09D93), 7 – кіт (09C92), 8 – собака (09D84), 9 – лисиця (09F108), 10 – корова (09CO111), 11 – борсук (09B136), 12 – тест-штам CVS, 13 – вакцинний штам Щолково-51к.

В даний час проводиться додаткове вивчення специфічності тест-системи «RABIES – ТЕСТ» з використанням польових ізолятів вірусу сказу, виділених від тварин з різних регіонів України.

Висновки. Підтверджена висока специфічність діагностичної тест-системи «RABIES – ТЕСТ» (ДНКІБШМ) при виявленні вірусу сказу як у вакцинах так і в патологічному матеріалі від різних видів тварин.

Кожна з реакцій «гніздового» варіанту ПЛР (як і система в цілому) забезпечує належну специфічність та високу чутливість аналізу по виявленню та ідентифікації вірусу сказу.

Список літератури

1. Головки, М.А. Роль і місце молекулярно-біологічних методів при діагностиці сказу / Головки М.А. – Ветеринарна медицина [Міжвідомчий тематичний науковий збірник], Харків, 2009. – №92. – С. 135-137. 2. Гришок, Л.П. Ідентифікація польових ізолятів вірусу сказу за допомогою ПЛР/ Гришок Л.П., Іванов М.Ю., Дерябін О.Н. – Актуальні питання епідагледу за особливо небезпечними інфекціями, санітарна охорона території, біологічна безпека, 2009. – С. 119-121. 3. Гришок, Л.П. Вивчення молекулярно-генетичних варіантів вуличного вірусу сказу на території України. / Гришок Л.П., Іванов М.Ю., Дерябін О.М. – Ветеринарна медицина України, 2010 – № 2. – С. 17-19. 4. Anthony, R. Fooks. Emerging Technologies for the Detection of Rabies Virus: Challenges and Hopes in the 21st Century/ Anthony R. Fooks, Nicholas Johnson. – Neglected tropical diseases, 2009. – Vol. 3. – P.38-47. 5. Alan Jackson. Rabies. / Alan Jackson, William Wunner. – Ontario, 2007. – P.680. 6. D. David Antemortem detection and virus characterization of three human rabies fatalities in Israel between 1996-1997. / D. David, C. E. Rupprecht, J. S. Smith. – Israel journal of veterinary medicine, 1999. – Vol.53 (4). – P.20-32.

DETECTION OF RABIES VIRUS WITH THE HELP OF "NESTED" INVERSE TRANSCRIPTASE PCR

Golovko M.A.

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

Results of testing of specificity of the developed test-system "Rabies-Test" (SSCIBSM) with test, vaccine strains and with pathological material from different animal species, are presented in the paper. High specificity of the diagnostic test-system at detection of rabies virus both in vaccines, and in pathological material from different animal species, has been confirmed.

УДК 619:578.825.15:579.882.11:576.535

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЗАЄМВІДНОСИН МІЖ ВІРУСОМ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ ТА ХЛАМІДІЯМИ НА ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ КУЛЬТУРАХ КЛІТИН

Данілова І.С., Чечоткіна Н.П., Павленко М.П.

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

Асоційовані вірус-бактеріальні захворювання великої рогатої худоби (ВРХ) часто реєструються в господарствах багатьох країнах світу, у тому числі в Україні, викликаються збудниками інфекційного ринотрахеїту (ІРТ), вірусної діареї (ВД), паратрипу – 3 (ПГ-3), респіраторно-синцитіальною (РС) та аденовірусною інфекціями (АВ), рота-, корона- та іншими вірусами. Спалахи цих вірусних захворювань часто перебігають одночасно з хламідіозом, мікоплазмозом, псевдомонозом, ієрсиніозом, при цьому провідну роль в цих захворюваннях відіграють ІРТ, ВД та інші персистентні інфекції, які тривалий час можуть перебігати безсимптомно – без клінічного прояву, але з активним розмноженням і виділенням збудника на фоні високого рівня індукції імунних реакцій [1, 2, 3]. Бактеріальні хвороби ускладнюють перебіг вірусних захворювань, тому що також пригнічують специфічні і неспецифічні захисні реакції організму [4, 5, 6].

У неблагополучних господарствах України вірусні хвороби ВРХ часто ускладнюються бактеріальними хворобами, у тому числі таким антропозоонозом, як хламідіоз, який у тварин викликає енцефаломієліт, бронхопневмонію, запальні процеси суглобів у телят і дорослих тварин, ранні та пізні аборти у корів. Хламідії мають високу мінливість, що доведено дослідженнями багатьох авторів. Збудник розмножується тільки в клітинних організмі, проникаючи в них шляхом ендоситозу [7, 8, 9, 10, 11].

Пусковим механізмом асоційованих вірус-бактеріальних захворювань ВРХ виступають різноманітні стресові фактори, особливо порушення умов утримання, неповноцінна годівля, авітамінози, імунодефіцити й таке інше.

Частота виникнення у ВРХ змішаних вірус- бактеріальних інфекцій (ІРТ- хламідіоз, ІРТ- ВД, ІРТ- ВД- мікоплазмоз та інших), за даними різних авторів, коливається у значних межах. Це обумовлено, насамперед, якістю лабораторної діагностики та чутливістю методів, потребує високої кваліфікації спеціалістів та пов'язана з великими витратами праці.

Для ринотрахеїту та хламідійної інфекції характерна сезонність. Найбільша кількість абортів, а також народження нежиттєздатного молодняку припадає на зимово-весняний період. У літній час з переводом тварин у табори, тобто з розривом епізоотичного ланцюгу, кількість клінічно вразливих випадків захворювання різко знижується і воно переходить в латентну форму.

За даними Мітрофанова П. М. (1986) захворювання корів, яке викликане вірусом ІРТ і хламідіями перебігає важко. Особливо чутливі телята 3-6-місячного віку. Захворювання супроводжується різкою дихальною недостатністю. В усіх випадках в патологічний процес залучається шлунково-кишковий тракт. Морфологічні зміни регіональних лімфовузлів, селезінки, тимусу, при асоціації ІРТ і хламідіозу вказує на розвиток, у хворих тварин імунодефіцитного стану, що, можливо, служить однією з причин активізації вторинної бактеріальної інфекції.

Метою нашої роботи було вивчити біологічні взаємовідносини між вірусом ІРТ та хламідіями на перещеплюваних культурах клітин по наявності цитопатичної дії (ЦПД) в різні години після їх зараження та провести порівняльний аналіз.

Матеріали і методи. Культуральний метод вважається одним із найбільш важливих методів виявлення хламідій та вірусів.

Пасажування і реізоляцію вірусів та хламідій проводили на перещеплюваних культурах клітин легень ембріону корови (ЛЕК) та трахеї телят (ТрТ). Культури клітин вирощували у пеніцилінових флаконах з покривними скельцями у термостаті за температури 37°C. В якості ростового середовища використовували поживне середовище Ігла з додаванням 10 % нативної сироватки ВРХ.

Через 24 години моношар клітин (ЛЕК, ТрТ) досліджували під світловим мікроскопом з метою бракування непридатних зразків. Надалі середовище видалляли, скельця з моношаром клітин двічі промивали розчином Версена. Потім культури по 4 флакони заражали вірусом ІРТ штам ІРТ- LG у дозі 0,5 см³ на флакон з титром 10⁶ ТЦД₅₀/см³, 4 флакони - нативним культуральним штамом хламідій «Лисячий» в дозі 0,5 см³ у титрі 10⁴ ТЦД₅₀/см³, а також 4 флакони – одночасно вірусом ІРТ-LG і хламідіями у дозах по 0,25 см³ кожного матеріалу на один флакон. В якості контролю використовували незаражені культури цих же клітин (4 флакони). Було проведено 3 досліді з різними культурами клітин.

Ідентифікацію вірусу у культурах клітин проводили у реакції імунофлуоресценції (РІФ) за загальноприйнятою методикою.

Результати досліджень. Через 18-20 годин після зараження культур клітин вірусом ІРТ-LG цитопатична дія (ЦПД₅₀/см³) встановлена у 100 % культур клітин ЛЕК і ТрТ, при цьому клітини були округлені, відокремлені одна від другої.