3. Контроль активності імунних сироваток у процесі імунізації тварин-донорів можна ефективно здійснювати як в РА, так і в РНІФ.

4. Високоактивні сироватки антипсевдомонас проявляють помітну активність до антигенів гетерологічних видів мікроорганізмів.

5. Адсорбція сироваток суспензіями мікроорганізмів, які виявили найвищу спорідненість до *Ps. aeruginosa,* дозволяє отримати активні видоспецифічні антипсевдомонас сироватки.

6. Отримано високоактивні видоспецифічні мічені ФІТЦ антипсевдомонас глобуліни.

7. Імунофлуоресцентний метод є одним із найчутливіших методів індикації *Ps. aeruginosa* у чистих та змішаних культурах.

8. Прямий варіант МФА є ефективним та економічно вигідним методом лабораторної діагностики псевдомонозу тварин і птиці.

*Список літератури*

**1.** Псевдомоноз птиці. Методичні рекомендації / П.І. Вербицький, М.В.Косенко, І.К.Авдосьєва, І.Л. Мельничук, О.Б. Басараб, Г.А. Зон. та ін. – К.; 2000. – 16 с. **2.** Методические указания по лабораторным исследованиям на псевдомоноз животных и птиц / М.: Главк. ветеринарии, 1988. – 3 с. **3.** Методичні рекомендації по ізоляції і ідентифікації культур синьогнійної палички із сперми і статевих органів сільськогосподарських тварин / М.В. Косенко, І.К. Авдосьєва, М.С. Рожко, І.М. Кушнір, Л.Л. Островська . – К.: ДДВМ, 2001. – 12 с. **4.** Бекбергенов, Б.М. Индикация и серотипирование Ps. aeruginosa методом непрямой иммунофлуоресценции / Б.М. Бекбергенов, А.Г. Анциферов, А.Ф. Мороз, Н.С. Акатова, Н.Е. Смирнова // ЖМЭИ. – 1976. – №7. – С. 105-109. **5.** Бусыгин, Л.Ф. Люминесцентная диагностика инфекционных болезней животных / Л.Ф. Бусыгин – М.: Колос, 1975. – 159 с. **6.** Козловский, Е.В. Иммунофлуоресцентный метод дифференциации стрептококков / Е.В. Козловский, А.П. Дзюбак // Ветеринария. – 1972. – №12. – С. 94-96. **7.** Бойко, П.К. Иммунофлуоресцентная идентификация возбудителя эмфизематозного карбункула: автореф. дис. … канд. вет. наук / П.К. Бойко. – М.: МВА, 1982. – 23 с. **8.** Справочник специалиста ветеринарной лаборатории./ Н.В. Коротченко, Ю.П. Смиян, А.П. Адаменко и др. / Под ред. Ю.П. Смияна. – К.: Урожай, 1987. – 368 с. **9.** Хоменко, Н.А. Агглютинирующие сыворотки и диагностикумы. / В кн.: Руководство по микробиологической клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. / Под ред. Проф. Г.В. Выгодчикова. – М.: Медицина, 1964. – С. 594-605. **10.** Виготовлення діагностикуму для імунофлуоресцентної індикації та ідентифікації *Pseudomonas* aeruginosa: Методичні рекомендації для спеціалістів ветеринарної медицини, науковців та студентів / О.П. Бойко, Р.О. Кучерявенко, П.К. Бойко, В.О. Бусол, М.С. Мандигра. – Київ: НУБіП, 2010.– 20 с. **11.** Методичні вказівки щодо використання методів біохімічних досліджень біологічного матеріалу в державних лабораторіях ветеринарної медицини при діагностиці захворювань неінфекційної патології. – К.: НАУ, 2000. – С. 2-10. **12.** Olson, W.P. Maximal brightness and fluorescent antibody. / W.P. Olson – J. Bacteriology. – 1968. – Vol.95. – P. 1176-1177. **13.** Лапач, С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В.Чубенко, П.Н.Бабич. – К.: Морион, 2001. – 319 с. **14.** Montie, T.C. Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of Pseudomonas aeruginosa in burned-mouse model /T.C. Montie, D. Doyle-Huntxinger, R.C. Craven, I.A. Holder // Infect. Immun. – 1982. – N 38. – P. 1296-1298. **15.** Di Genaro, M.S. Clostridium chauvoei: Immunological characterization of antigenic Preparations / M.S. Di Genaro, B. Micalizzi, A. M.Guzman. // Anaerobe -1999. – Vol.5. – P. 301-303. **16.** Pier, G.B. Promises and pitfalls of Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide as a vaccine antigen. / G.B. Pier // Carbohyd Res. – 2003. – C. 338.

**LABORATORY DIAGNOSTIC OF THE PSEVDOMONAS INFECTIONS BY IMMNOFLUORESCENCE METHOD**

***Mandygra M.S.*, Boyko P.K.**, Boyko O.P.*, Kucheryavenko R.O.******

**Institute of epizootology of NAAS of Ukraine, Kyiv,*

***Volyn Regional State Laboratory of Veterinary Medicine, Lutsk,*

****NSC "IECVM", Kharkiv*

*For the first time in Ukraine it is developed the immunofluorescent method of indication and identification of Pseudomonas aeruginosa. This test considerably increases the effectiveness of laboratory diagnostics pseudomonosis in all forms of his manifestation, reduces time and supplies to conducting of bacteriological studies, it is the effective tool of the study of the Ps. aeruginosa's ecology.*

**УДК 591.2.597**

## ВИКОРИСТАННЯ ПЕРЕЩЕПЛЮВАЛЬНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН В ІХТІОВІРУСОЛОЇ

***Матвієнко Н.М., Харкавлюк Н.Є.***

*Інститут рибного господарства НААН, м. Київ*

Метод культивування культур клітин поза організмом став великим досягненням для вірусології, оскільки дозволяє отримувати найбільш об'єктивні та надійні дані щодо діагностики вірусних інфекцій. З виникненням гострих епізоотій серед коропових і лососевих видів риб, з'явилась необхідність удосконалення методів діагностики, заснованих на використанні як первинних, так і перещеплювальних культур клітин [1]. Відомо, що найбільших збитків рибництву завдають такі основні вірусні захворювання, як весняна віремія коропа, інфекційний некроз підшлункової залози та геморагічна септицемія. У зв'язку з цим, виникла необхідність швидкої ідентифікації та виділення збудників, а також розробка антивірусних препаратів на основі отриманих даних про збудника. Весняна віремія коропа належить до особливо небезпечних хвороб риб за класифікацією Міжнародного епізоотичного бюро. Це гостропротікаюча вірусна хвороба коропа, що характеризується розвитком септичного процесу й масовою загибеллю риб. Захворювання викликається вірусом весняної віремії коропа, що належить до родини *Rhabdoviridae* роду *Vesiculovirus* [2].

Вірусна геморагічна септицемія – це гостре висококонтагіозне захворювання прісноводних та морських видів лососевих риб, що викликає вірус вірусної геморагічної септицемії (VHSV), який належить до роду *Novirhabdovirus*, родини *Rhabdoviridae*. Хвороба протікає по типу епізоотії і характеризується розвитком септичного процесу, множинними крововиливами в органи і тканини та закінчується масовою загибеллю риби [3].

Інфекційний некроз підшлункової залози лососевих (IPNV) викликається вірусом із роду *Aquabirnavirus* родини *Birnaviridae* і характеризується порушенням координації руху, потемнінням шкірного покриву, ураженням підшлункової залози, появою точкових крововиливів на пілоричних придатках, значними патологічними змінами в печінці, селезінці та інших паренхіматозних органах, а також швидким розвитком і високою смертністю хворих риб [4].

**Мета роботи:** дослідити можливість використання перещеплюваних культур клітин з тканин різних видів риб та визначити можливість репродукції на них вірусів SVCV, IPNV, VHSV.

**Матеріали і методи.** Використовували наступні клітинні лінії:

**BF-2** (хвостове стебло синьозяберного сонячника *(Lepomis macrochirus)* – короткі, веретеноподібні клітини, ростуть хрестоподібно по всьому моношару, ріст починається з вільних груп клітин, використовуючи коефіцієнт субкультивування 1:4 моношар формується за 48-56 год, клітини реплікуються за температури 15-33 ºС, оптимальна температура 23-26 ºС, змінюючи середовище моношар стабільний протягом 10 днів (за температури 15-16ºС – приблизно 21 дня), підтримуюче середовище повинно містити 1-2 % сироватки.

**FHM** (хвостове стебло товстоголоса чорного *(Pimephales promelas*) – малі, полігональні клітини, ріст починається з маленьких груп клітин, використовуючи коефіцієнт субкультивування 1:6 моношар формується за 72-96 год, досягає високої щільності, клітини ростуть за температури 4-36 ºС, оптимальна температура 29 ºС, після зміни середовища моношар стабільний впродовж 10 днів, за температури 4 ºС – більш, ніж кілька тижнів.

**EPC** (епідермальні новоутворення коропа (*Cyprinus carpio*) – епітеліоподібні клітини, використовуючи коефіцієнт субкультивування 1:2-1:5 моношар формується за 24-48 годин. Температура інкубації 21-23 °С.

**RTG-2** (гонади райдужної форелі *(Oncorhynchus mykiss)* **–** довгі фібробластоїдні клітини, при використанні коефіцієнта субкультивування 1:2 моношар формується через 5 днів, клітини ростуть за температури 18-22 ºС, оптимум температури становить 20 ºС. Моношар стабільний протягом 21 дня.

Для визначення спектру чутливості культур клітин до вірусів риб, використовували польові ізоляти та референтні штами вірусів весняної віремії коропа (SVCV), інфекційного некрозу підшлункової залози (IPNV) та геморагічної септицемії (VHSV).

Польові матеріали від коропів та райдужної форелі відбирали в рибницьких господарствах різних областей України у зв'язку з підозрою на захворювання або в ході моніторингу господарств. Для виділення вірусу, доставлений матеріал (20 проб по 5 риб/проба) був досліджений відповідно до вимог національних і міжнародних нормативних документів щодо вірусологічного дослідження риб. Морфологічні характеристики виділених ізолятів вірусів визначали за методом електронної мікроскопії. Ідентифікацію вірусних ізолятів проводили за допомогою ІФА на тест системах фірми TestLine. Пробами матеріалу інокулювали культури клітин EPC, FHM, BF-2, RTG-2. Культури клітин вирощували на середовищі DMEM з подвійним набором амінокислот і вітамінів та 10 % сироватки крові ембріонів корів. Добові культури клітин інокулювали вірусовмісним матеріалом при заміні ростового середовища на підтримуюче та інкубували далі за температури +17-21,5 °С до повного руйнування клітинного моношару вірусом. Титр інфекційної активності вірусу визначали методом титрування за Ріда і Менча.

**Результати досліджень.** При дослідженні чутливості культур клітин до вірусу весняної віремії коропа встановили, що репродукція вірусу супроводжується чітко вираженою цитопатогенною дією з повною деструкцією моношару впродовж 5-7 діб, де фіксували різний характер ЦПД (рис. 1).

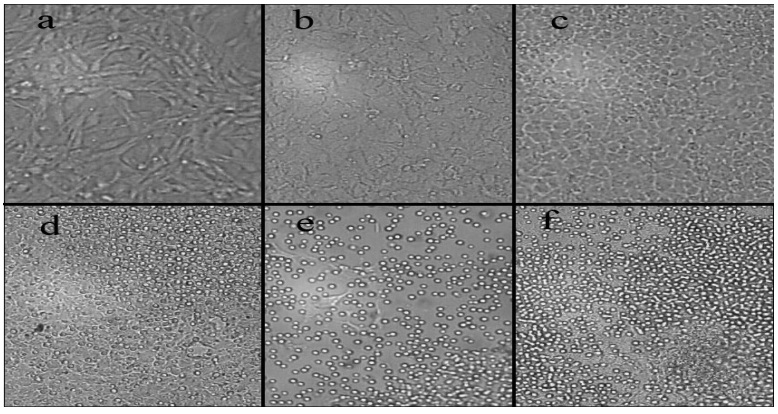
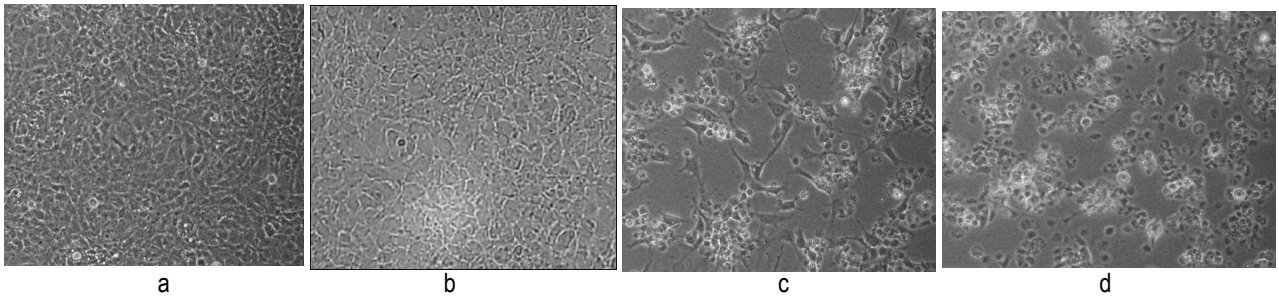



**Рис. 1** Цитопатологія досліджуваних клітинних ліній після зараження SVCV. Нормальний моношар BF-2 (a), FHM (b), EPC (c) клітин та після зараження вірусом SVC (BF-2 (d), FHM (e), EPC (f)

У всіх трьох культурах клітин цитопатогенна дія вірусу проявлялася впродовж першої доби і характеризується заокругленням і відшаруванням від скла частини клітин, це призводило до утворення пустот – «вікон». На 5-7 добу культивування наставала повна дегенерація моношару.

Отже, при дослідженні референтних штамів рабдовірусу риб та вірусних ізолятів на культурах клітин було встановлено, що на трьох клітинних лініях вірус активно репродукується, тоді як на культурі клітин RTG-2 репродукція вірусу не відбувається. Результати показали, що вірусні титри на 5-7 день становили $10^{6,4–7,5}$ $ТЦД_{50}$/0,1мл, не маючи особливих відмінностей між номером пасажу і клітинними лініями. Встановили, що оптимальною культурою клітин для репродукції вірусу SVCV є EPC, оскільки порівняно із BF-2 і FHM, вона є найменш вимогливою до умов культивування.

Культуральні властивості вірусу геморагічної септицемії досліджували на культурах клітин FHM та EPC. Інокульовані вірусом культури культивували за температури 15 °С, оскільки саме ця температура є оптимальною для репродукції даного вірусу. Підвищення температури культивування до 20 °С значно призупиняє репродукцію. Перші зміни в зараженій культурі з'являлися через 24 години після інокуляції. Зміни в обох культурах клітин мали однаковий характер, що проявлявся у вакуолізації цитоплазми та відшаруванні клітин від поверхні матрасу (рис. 2).



a b c d

**Рис. 2** Цитопатологія досліджуваних клітинних ліній після зараження VHSV. Нормальний моношар FHM (a), EPC (b) та клітин та після зараження вірусом VHS - FHM (c), EPC (d)

Клітини набухають, округлюються, утворюючи, так звані грона, а потім відділяються від поверхні та гинуть. При цьому титр вірусу становив $10^{5,4–6,5}$ $ТЦД_{50}$/мл.

Дослідження цитопатогенної дії вірусу інфекційного некрозу підшлункової залози досліджували на клітинних лініях BF-2, FHM, RTG-2. Перші морфологічні зміни спостерігали впродовж 24 годин після інокуляції. При цьому наставали складні дегенеративні процеси, що супроводжувались появою в клітинах вакуолей, зернистості, клітини зберігали витягнуту форму або округлювались (рис. 3).

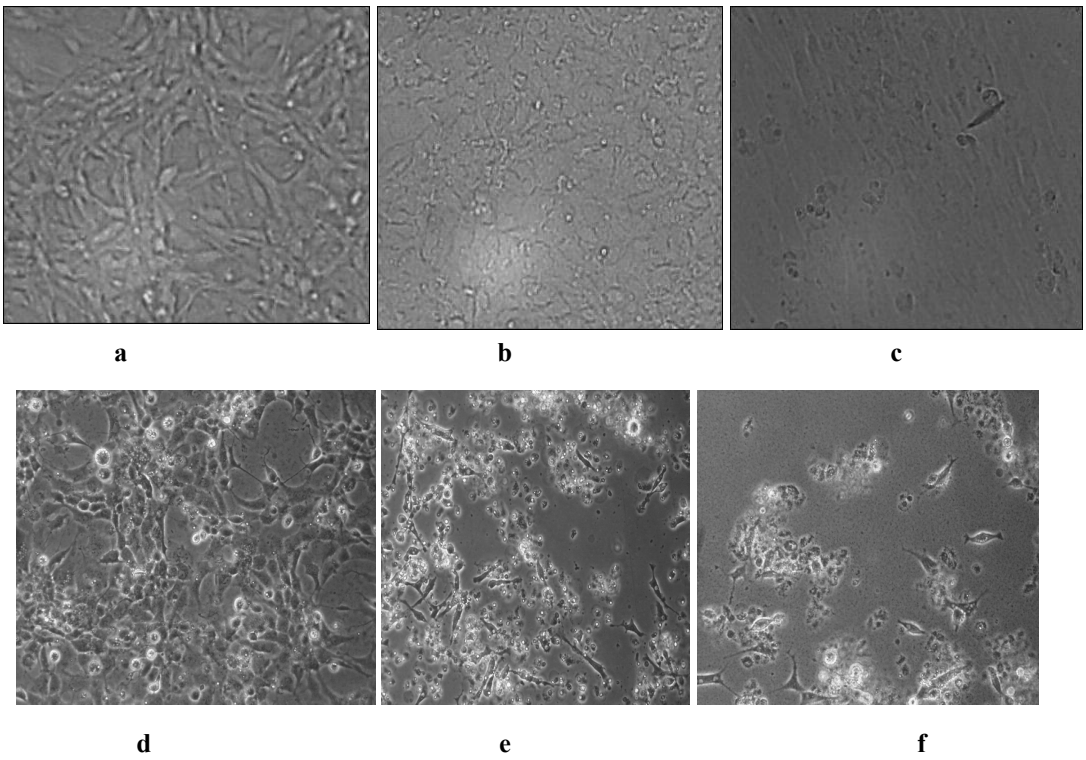



**Рис. 3** Цитопатологія досліджуваних клітинних ліній після зараження IPNV. Нормальний моношар BF-2 (a), FHM (b), RTG-2 (c) клітин та після зараження вірусом IPNV - BF-2 (d), FHM (e), RTG-2 (f)

Для успішного розмноженя вірусу підтримували pH середовища в діапазоні 7,0-7,8, оскільки при зниженні або підвищенні цього показника вірулентність вірусу зникала. Вірус репродукується в перещеплювальних клітинах впродовж 4-7 діб, цитопатична дія не завжди чітко виражена, при цьому референті штами вірусу викликали зміни в менше половини клітин в культурі, а польові ізоляти в більшій частині клітин. Титр вірусу при цьому становив 10 5.2-6.4 $ТЦД_{50}$/мл.

**Висновки. 1.** Репродукція SVCV в культурах клітин супроводжується чітко вираженою цитопатогенною дією, оптимальною культурою клітин для репродукції вірусу SVCV є EPC, оскільки порівняно із BF-2 і FHM, вона є найменш вимогливою до умов культивування.

**2.** Культуральні властивості вірусу геморагічної септицемії досліджували на культурах клітин FHM та EPC. Зміни в обох культурах клітин мали подібний характер, що проявлявся у вакуолізації цитоплазми та відшаруванні клітин від поверхні матрасу.

**3.** Були встановлені найбільш характерні морфологічні зміни в перещеплювальних лініях BF-2, FHM, RTG-2, індукованих вірусом IPNV, що супроводжувались складними дегенеративними змінами клітин, які проявлялись округленням клітин, вакуолізацією, втратою адгезивних властивостей.

*Список літератури*

**1.** Einer-Jensen, K., Bjorklund, H., Oreshkova, S.F., Shchelkunov, I.S., Vesely, T., Lorenzen, N. Detection and typing of fish viruses// Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. - 2002. – Vol. 22, N.2. – P. 158-165. **2.** Ahne, W., Bjorklund, H.V., Essbauer, S., Fijan, N., Kurath, G. Spring viremia of carp (SVC)// Diseases of Aquatic Organisms. – 2002. - Vol. 52. N.3. – P. 261-272. **3.** Eleouet, J. F., Druesne, N., Chilmonczyk, S., Monge, D., Dorson, M., and Delmas, B.(2001). Comparative study of in-situ cell death induced by the viruses of viral hemorrhagic septicemia (VHS) and infectious pancreatic necrosis (IPN) in rainbow trout. *J. Comp. Pathol.* 124, 300-307. **4.** Chen, M. M., Kou, G. H. & Chen, S. N. (1993). Establishment and characterization of a cell line persistently infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Bulletin of the Institute of Zoology*, *Academia Sinica* 32, 265-272.

**USING OF CELL CULTURES IN ICHTHIOPATHOLOGY**

***Matviyenko N.N., Kharkavlyuk N.E.***

*Institute of Fisheries of NAAS, Kyiv*

*The data about investigation of spectrum of sensitivity cell cultures to three main viruses of fish and study their cultural properties are presented in article.*