

то зовнішньої оболонки, яка надає вірусним частинкам сферичної форми. Такі віріони мали яскраво виражений ікосаедричний тип симетрії, який притаманний іридовірусам, позбавленим зовнішньої ліпідної оболонки.

Висновки. Хоча більшість сучасних досліджень присвячено взаємодії фулеренів з вірусами імунодефіциту людини (HIV) [9] та гепатиту С (HCV) [10], нами було *вперше* досліджено взаємодію водорозчинних немодифікованих фулеренів C_{60} з іридовірусами та виявлені антивірусні властивості цих молекул вуглецю за їхньої фотоактивації. Так, фулерени C_{60} , взаємодіючи з віріонами іридовірусу комара *A. flavescens*, знижували інфекційний титр вірусу при їх фотодинамічній інактивації на $4,5 \lg ID_{50}/ml$.

Отже, використання фотозбуджених фулеренів C_{60} та їх похідних для цілеспрямованої інактивації вірусів є багатообіцяючим та актуальним напрямком у медико-біологічних дослідженнях.

Список літератури

1. Chinchar, V.G., Essbauer, S., He J.G. [et al.]. Family *Iridoviridae*. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* // San Diego: Elsevier/Academic Press, 2005. – P. 150-162.
2. Матишевська, О.П., Прилуцька, С.В., Гринюк, І.І. Фулерени C_{60} – біологічно-активні молекули. I. Фізико-хімічні властивості та біодоступність // Біотехнологія. – 2010. – Т. 3, № 1. – С. 18-26.
3. Burlakā, A.P., Sidorik, E.P., Prylutska, S.V. [et al.]. Catalytic system of the reactive oxygen species on the C_{60} fullerene basis // *Experimental Oncology*. – 2004. – V. 26, N 4. – P. 326-327.
4. Bosi, S., Da Ros T., Spalluto, G. [et al.]. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2003. – V. 38. – P. 913-923.
5. Kasermann, F., Kempf, C. Photodynamic inactivation of enveloped viruses by buckminsterfullerene // *Antiviral Research*. – 1997. – V. 34. – P. 65-70.
6. Zarubae, V.V., Belousova, I.M., Kiselev, O.I. [et al.]. Photodynamic inactivation of influenza virus with fullerene C_{60} suspension in allantoic fluid // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2007. – V. 4. – P. 31-35.
7. Reed, L., Muench, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // *The American journal of clinical hypnosis*. – 1938. – V. 27. – P. 493-497.
8. Bulavin, L., Adamenko, I., Prylutsky, Yu. [et al.]. Structure of fullerene C_{60} in aqueous solution // *Phys.Chem.Chem.Phys.* – 2000. – V. 2. – P. 1627-1629.
9. Marchesan, S., Da Ros, T., Spalluto, G. [et al.]. Anti-HIV properties of cationic fullerene derivatives // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2005. – V. 15. – P. 3615-3618.
10. Mashino, T., Shimotohno K., Ikegami N. [et al.]. Human immunodeficiency virus-reverse transcriptase inhibition and hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase inhibition activities of fullerene derivatives // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2005. – V. 15. – P. 1107-1109.

PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF MOSQUITO IRIDOVIRUS BY C_{60} FULLERENES

Rud Yu.P.¹, Prylutska S.V.², Buchatsky L.P.², Prylutsky Yu.I.²

¹Institute of fisheries of NAAS of Ukraine,

²Kyiv National University named after Taras Shevchenko

It was shown firstly that water soluble C_{60} fullerenes under visible light interact with virions of mosquito iridescent virus *Aedes flavescens*. Specifically, the photodynamic inactivation of mosquito iridovirus *Aedes flavescens* during 1 h reduced the infectious titer of virus in large wax-moth larvae *Galleria mellonella* on $4,5 \lg ID_{50}/ml$. Therefore, for inactivation of iridoviruses in biological systems it is appropriate to use the photoexcited C_{60} fullerenes.

УДК 619: 636.4.082:579:577.2

ВИДОВА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЗБУДНИКІВ ХЛАМІДІОЗУ СИНАНТРОПНОЇ ТА ДОМАШНЬОЇ ПТИЦІ ЗА ДОПОМОГОЮ ГНІЗДОВОЇ ПЛР ТА ПЛР В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

Скрипник А.В.,¹ Ксьонз І.М.,² Скрипник В.Г.,¹ Дерябін О.М.,¹ Заксе К.³

¹Інститут ветеринарної медицини НААН України, м.Київ

²Полтавська дослідна станція ІВМ НААНУ, м. Полтава

³Референтна лабораторія МЕБ з хламідійних інфекцій птиць та овець, Національна референтна лабораторія з псітакозу Німеччини, Інститут ім.Фрідріха Льюфлера, м. Йєна, Німеччина

Хламідіоз птиці (синоніми – псітакоз, орнітоз) – інфекційне, зооантропонозне, системне, іноді летальне захворювання птиці, збудником якого є облигатна інтрацелюлярна бактерія *Chlamydophila psittaci*, та яке характеризується перикардитами, кон'юнктивітами, синуситами, аеросакулітами, пневмонією, перитонітами, гепатитами, спленітами, зниженням несучості [1]. Клінічні прояви значно варіюють від гострих до субклінічних та хронічних у залежності від віку птиці та штаму збудника. Генералізована інфекція проявляється лихоманкою, анорексією, летаргією, діареєю, іноді виникає шок та загибель птиці. У багатьох птахів клінічні ознаки можуть бути відсутніми, тим не менше вони виділяють збудника з екскретами протягом довгого періоду [1], що може бути небезпечним з огляду на високий зоонозний потенціал псітакозу.

У людини прояви інфекції псітакозу можуть широко варіювати від інапарентної форми, до грипоподібних симптомів, які часто нагадують як атипову пневмонію та можуть розвинути у тяжку системну хворобу з інтерстиціальною пневмонією та енцефалітом [1].

Традиційні діагностичні методи, такі як культивування на культурі клітин, гістохімічне забарвлення або антиген-ELISA здатні до родоспецифічної детекції (*Chlamydiaceae*). Це зумовлено міжвидовою кросс-реактивністю, яка обумовлена спільними або спорідненими антигенами хламідій. Ці ж обмеження притаманні й непрямим діагностичним тестам, як то реакція зв'язування комплементу, антитільна ELISA та імунофлюоресценція [2].

Специфічна детекція видів хламідій стала можливою завдяки розробці та впровадженню ПЛР тестів. Були розроблені різні варіанти ПЛР, з використанням праймерів, які специфічні генам *ompA* та *16S rRNA* [3, 8]. Крім того, були розроблені й протоколи ПЛР у реальному часі (РЧ-ПЛР), що не поступалися чутливістю гніздовим варіантам ПЛР [2, 4, 5, 6]. Завдяки високій продуктивності РЧ-ПЛР та значному скороченню часу, необхідного на постановку діагнозу, цей метод став рутинним у лабораторіях розвинених країн.

Метою нашої роботи було ідентифікувати етіологічний(і) агент(и) хвороби домашньої та синантропної птиці, що мала клінічні ознаки хламідіозу.

Матеріали та методи. Дослідження проводились на базі лабораторії молекулярної біології ІВМ НААНУ, а також Референтної лабораторії МЕБ з хламідійних інфекцій птиці та овець Інституту ім. Фрідріха Льюфлера.

Розділ 3. Ветеринарна мікробіологія та вірусологія

Досліджено 11 патологічних матеріалів від міських (n=3) та декоративних голубів (n=5) (*Columba livia*) різних порід та різних власників, сірої ворони (n=1) (*Corvus cornix*) а також папуг: карели (n=1) (*Nymphicus hollandicus*) та хвилястої папуги (n=1) (*Melopsittacus undulatus*). Усі матеріали зібрано в м. Полтава. У кожній птиці досліджували збірну пробу з її органів: селезінку, печінку, нирки, легені, а також кишківник.

ДНК екстрагували колонковим методом за допомогою комерційного набору "High pure PCR template preparation kit" (Roche, Німеччина). У разі завищених значень порогового циклу Ct, отриманих в РЧ-ПЛР, ДНК концентрували переосадженням ізопропанолу.

ПЛР у режимі реального часу проводили на приладі Stratagene Mx 3000P з використанням комерційного набору "TaqMan® Gene Expression Master Mix" (Applied Biosystems, США). Результати реакції інтерпретували за наявністю перетину кривої флюоресценції з установленою на відповідному рівні пороговою лінією у вигляді графіка залежності інтенсивності флюоресценції від кількості циклів, що відповідало значенню порогового циклу Ct. Враховуючи похідну концентрацію стандартного зразку ДНК, яка становила 1 IFU (Inclusion Forming Units – одиниць утворення тілець-включень), позитивним результатом реакції вважали значення циклу, за якого крива флюоресценції стандартного зразку ДНК перетинала порогову лінію (Ct=37). Таким чином, в усіх реакціях РЧ-ПЛР позитивним результатом досліджуваних зразків вважали значення Ct менше 37.

Родоспецифічну РЧ-ПЛР проводили з використанням праймерів і зонду, специфічних гену 23S рРНК, як описано у роботі R. Ehrlich et al. [4]. *S. psittaci*- та *S. resorum*- специфічні РЧ-ПЛР проводили за [5, 6] з гібридизацією праймерів та зондів до гену *ompA*. В усіх РЧ-ПЛР застосовували внутрішній контроль ампліфікації. Гніздовий варіант класичної ПЛР з праймерами, специфічними іншим ділянкам гену *ompA* *S. psittaci*, ніж ті, що були використані у роботі [5], проводили відповідно до [3]. В усіх варіантах ПЛР в якості позитивного контролю використовували ДНК референтного штаму *S. psittaci* DC45.

Результати досліджень та їх обговорення. Папуги та декоративні голуби мали клінічні ознаки хламідіозу – діарею з жовтуватим послідом, анорексію, схуднення, виділення з носу, та після розвитку хвороби загинули. Міські голуби та сіра ворона були зловлені в межах міста, у жодної птиці клінічних проявів хвороби не було.

На розтині селезінка та печінка хворих особин були дещо збільшені, у носових пазухах знайдено білуватий екскрет, набряки слизової оболонки кишківника. У карели відмічали петехіальні крововиливи на кишківнику та значне збільшення селезінки.

З усіма пробами після екстракції ДНК зі зразків проведено родоспецифічну РЧ-ПЛР, в результаті чого 8 зразків були позитивні (табл.). Негативні в цій реакції зразки ДНК концентрували переосадженням, після чого повторили родоспецифічну РЧ-ПЛР. Однак, усі 3 зразки виявились негативними. Проте, з огляду на наявність клінічних ознак у карели (№1) та декоративного голуба (№5), усі зразки, негативні у родоспецифічній реакції були залучені до *S. psittaci*-специфічної РЧ-ПЛР.

Таблиця – Результати ідентифікації *Chlamydophila psittaci* у зразках від синантропної та домашньої птиці

№ n/n	№FLI	Вид птаці	Переосад. ДНК	23S РЧ-ПЛР	РЧ-ПЛР <i>S.psittaci</i>	Гніздова ПЛР		
1	7003	Карела	x	-	38,2	-	42,27	-
2	7004	Голуб	n	+	31,23	-	42,35	+
3	7005	Голуб	n	+	33,76	-	40,8	+
4	7006	Голуб	n	+	32,395	-	No Ct	+
5	7007	Голуб	x	-	No Ct	-	No Ct	n
6	7008	Голуб	n	+	33,435	-	41,715	+
7	7009	Міський голуб	n	+	32,365	-	No Ct	+
8	7010	Міський голуб	x	-	No Ct	-	No Ct	n
9	7011	Міський голуб	n	+	34,025	-	40,83	+
10	7012	Хвиляста папуга	n	+	36,6	-	No Ct	+
11	7020	Сіра ворона	n	+	33,61	-	40,43	+
12	<i>S. psittaci</i>	Референтний штам DC45	n	+	36,6*	+	37,1*	+

Примітки: «x» – переосадження ДНК; «n» – переосадження ДНК або реакцію не проводили; «-» – реакція негативна; «+» – реакція позитивна; цифри показують значення циклу, за якого досягнуто Ct; «No Ct» – Ct не досягнуто; «*» – концентрація позитивного контролю *S. psittaci* шт. DC45 становила 1 IFU (Inclusion Forming Units – одиниць утворення тілець-включень).

Результати РЧ-ПЛР з праймерами та зондом, специфічними до гену *ompA*, виявились негативними зі всіма зразками у двох повторях. Водночас, референтний штам *S. psittaci* DC45, який використовувався в якості позитивного контролю, двічі дав позитивний результат. Враховуючи той факт, що всі зразки мають походження від видів птиці, які вважаються найбільш вагомими у розповсюдженні псітакозу – папуги та голуби, а також факт наявності у птиці, що досліджується, клінічних ознак, характерних для хламідіозу, усі зразки були перевірені в гніздовому варіанті ПЛР з праймерами, специфічними до *S. psittaci* (ген *ompA*).

У результаті цієї реакції усі зразки (включно з референтним штамом *S. psittaci* DC45), які були позитивні у родоспецифічній РЧ-ПЛР, виявились також позитивними, утворивши специфічний фрагмент ДНК довжиною біля 400 п.н., тобто містили ДНК *S. psittaci* (рис.). Після переосадження ДНК у зразках №5 та №8 її кількість виявилась недостатньою для залучення цих зразків до гніздової ПЛР.

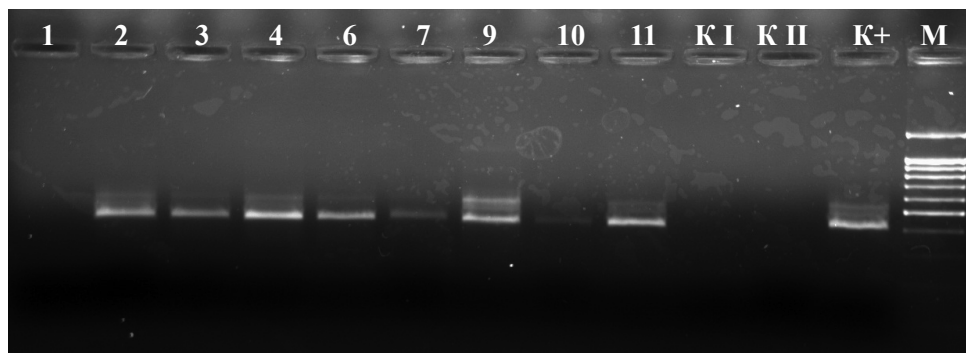


Рис. Електрофореграма другого раунду *S. psittaci*-специфічної гніздової ПЛР. «1» – негативний зразок від карели; «2–11» – позитивні зразки; «K I» – негативний контроль першого раунду; «K II» – негативний контроль другого раунду; «K+» – позитивний контроль – референтний штам *S. psittaci* DC45; «M» – маркер молекулярної ваги.

Однак, зразок №1 (ДНК від карели) також виявився негативним. З цим зразком ДНК проведено РЧ-ПЛР, специфічну *S. resorum*, але результат також виявився негативним. Таким чином, незважаючи на клінічні та патологоанатомічні ознаки, характерні для псітакозу, у карели діагноз на хламідіоз спростовано.

Позитивний результат, отриманий з 8 зразками (№2-11) в гніздовому варіанті ПЛР, засвідчив, що *C. psittaci*-специфічна РЧ-ПЛР, запропонована А. Pantchev et al. [5], виявилася неспецифічною з українськими ізолятами. При дослідженні 8 позитивних зразків жоден не був позитивним в цій реакції, хоча внутрішній контроль реакції та позитивний контрольний зразок (референтний штам DC45) були позитивними. Отриманий результат може бути обумовлений варіабельністю послідовності гену *ompA* українських ізолятів *C. psittaci*, тому праймери, використані в РЧ-ПЛР, виявилися неспецифічними. Для підтвердження цього припущення в подальшому буде секвенований відповідний локус гену *ompA*, який був мішенню в РЧ-ПЛР.

Висновки. 1. Діагноз хламідіозу птиці, оснований на клінічних ознаках, підтверджено за допомогою ПЛР у чотирьох з п'яти декоративних голубів, двох з трьох міських голубів, сірої ворони та хвилястого папуги. У всієї птиці хламідіоз зумовлений збудником *Chlamydophila psittaci*.

2. Наявність клінічних ознак, характерних для хламідіозу, не є фактором, що підтверджує діагноз хламідіозу птиці навіть в особливо сприйнятливих видів птиці, якими є папуги.

3. Варіант нової РЧ-ПЛР тест-системи для видової ідентифікації *Chlamydophila psittaci*, запропонований А. Pantchev et al. [5], при дослідженні українських ізолятів виявив серйозні недоліки в специфічності, у зв'язку з чим не може бути використаний для діагностики хламідіозу птиці в Україні.

4. Наявність у міських голубів та сірої ворони, клінічні ознаки хламідіозу у яких були відсутніми, зоонозного збудника *Chlamydophila psittaci* свідчить про його циркуляцію в популяції синантропної птиці м. Полтава, що становить загрозу здоров'ю людей.

Перспективи подальших досліджень. За результатами проведених досліджень актуальним постає питання проведення моніторингу хламідіозу птиці в популяції синантропної птиці міст України та оцінка ризиків захворювання людей псітакозом.

Вимагає вдосконалення ПЛР в реальному часі для видової ідентифікації *C. psittaci* та з'ясування природи негативних реакцій українських ізолятів цього збудника, яка може полягати у варіабельності *C. psittaci*-специфічного локусу гену *ompA*.

Список літератури

1. World organisation for animal health (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.1. Avian Chlamydiosis. – 2010. – P.431-442.
2. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections / K. Sachse, E. Vretou, M. Livingstone et al. // Vet Microbiol. – 2009. – 135(1-2). – P. 2-21.
3. Detection and differentiation of *Chlamydiae* by nested PCR / K. Sachse, H. Hotzel // Sachse K., Frey J. PCR detection of microbial pathogens: methods and protocols. Methods in molecular biology. – Totowa: Humana Press, 2003. – Vol.216. – P. 123-136.
4. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies / R. Ehrlich, P. Slickers, S. Goellner et al. // Mol. Cell. Probes. – 2006. – 20. – P. 60-63.
5. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples / A. Pantchev, R. Sting, R. Bauerfeind, et al. // Vet. J. – 2009. – 181(2). – P. 145-150.
6. Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays / A. Pantchev, R. Sting, R. Bauerfeind, et al. // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. – 2010. – 33(6). – P. 473-484.
7. Ксьонз, І. М. Визначення специфічності тест-системи для індикації ДНК представників родини *Chlamydiaceae* у полімеразній ланцюговій реакції / І. М. Ксьонз // Науковий Вісник ЛНУВМБТ ім. С. Г. Гжицького. – 2009. – Том. 11, № 2 (41) Част. 1. – С. 146-149.

SPECIES IDENTIFICATION OF ETIOLOGICAL AGENTS OF CHLAMYDIOSIS IN SYNANTHROPIC AND PET BIRDS BY NESTED AND REAL-TIME PCR

Skrypnik A.V.¹, Ksyonz I.M.², Skrypnik V.G.¹, Deryabin O.M.¹, Sachse K.³

¹ Institute of Veterinary Medicine of NAAS of Ukraine, Kyiv,

² The Poltava Experimental Department of IVM UAAS, Poltava,

³ OIE Reference Laboratory for Chlamydial Infections of Birds and Sheep, National Reference Laboratory for Psittacosis of Germany, Friedrich-Loeffler-Institute, Jena, Germany

Article presents the results of study of pet birds with clinical signs of chlamydiosis as well as synanthropic birds without such signs using real-time PCR and nested PCR. It was shown that both pet and synanthropic birds had zoonotic etiological agent *Chlamydophila psittaci* that suggests the spread of chlamydiosis in the population of synanthropic birds.

УДК 619:616.98:578.822.2:636.5

ВІРУСНИЙ ЕНТЕРИТ ГУСЕЙ (ХВОРОБА ДЕРЖИ)

Стегній Б.Т., Бреславець В.О., Драгуть С.С.

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

Гусівництво – надзвичайно вигідна галузь птахівництва, оскільки від неї отримують цінні продукти при порівняно незначних витратах кормів, зокрема, концентрованих. В останні роки в Україні намітилась тенденція розвитку галузі, проте цьому процесу серед інших причин заважають інфекційні захворювання. Часто реєструють при моноінфекціях або ускладненнях змішані, асоційовані інфекції – аденовірусну, коронавірусну, вірусний ентерит, сальмонельоз, аспергильоз, колібактеріоз, кокцидіоз, пастерельоз, мікоплазмоз.

В усіх континентах світу, де розвинуто гусівництво, найбільш поширеною є висококонтагіозна хвороба гусей та мускусних качок – вірусний ентерит гусей або хвороба Держи (*Enteritis viralis anserculorum*, вірусний ентерит гусенят, вірусна хвороба гусей, язвений некротичний ентерит гусей, чума гусей, грип гусей, інфлюєнца гусей, гепатоентерит, гепатоентерит-асцит). У 1973 році вона була названа на честь угорського професора Держи, який всесторонньо її вивчав.

Хвороба завдає найзначніших збитків розвитку продуктивного гусівництва за рахунок загибелі 1-30-добового молодняка від 30 до 90 % та зниження продуктивності різновікової птиці (зниження живої маси та якості м'яса, високий рівень летальності) та фінансових витрат щодо її ліквідації. При зверхгострому перебігу птиця гине протягом декількох годин без прояву клінічних