

ETIOLOGIC STRUCTURE OF FISH CONTAGIOUS DISEASES IN KHARKIV REGION IN 2006-2008.

Kutsenko V.G.

Kharkiv State Laboratory of Veterinary Medicine

Data on etiologic structure of fish contagious diseases in Kharkiv Region in 2006-2008 years is given the article.

УДК 619:616.98:578.831.1:636.2:616-076

МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ПАРАГРИПУ-3 ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Кучерявенко В.В.

ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» УААН,
м. Харків

У статті представлені дані відносно традиційних і нових методів діагностики парагрипу-3, у тому числі методи, в яких використовуються діагностичними, розроблені в відділі вірусології ННЦ «ІЕКВМ».

Україна є стаціонарно неблагополучною щодо парагрипу-3 великої рогатої худоби (ПГ-3 ВРХ), тому лабораторна діагностика цього захворювання повинна бути невід'ємною частиною технології вирощування й експлуатації великої рогатої худоби. Це пов'язано зі значними економічними збитками, які наносить ПГ-3 скотарству [3].

Лабораторна діагностика парагрипу-3 включає методи прямої та ретроспективної діагностики. Методи прямої діагностики включають виділення вірусу ПГ-3 в культурі клітин та його ідентифікацію в пробах клінічного та патологічного матеріалу, а саме в реакціях гемадсорбції (РГад) та агрегації (РА), імунофлуоресценції (РІФ), імуноферментного аналізу (ІФА), затримки гемадсорбції (РЗГад) та затримки агрегації (РЗГА) [1, 2, 4, 5].

З методів ретроспективної (серологічної) діагностики найбільш застосованими є реакції затримки агрегації (РЗГА) й імуноферментного аналізу (ІФА).

Для встановлення діагнозу на ПГ-3 від хворих телят відбирають слиз і зскрібки зі слизової оболонки носа. Від вимушено забитих та загиблих тварин не пізніше ніж через 2 години відбирають шматочки легенів (на межі здорової та ураженої тканини), слизової оболонки трахеї й носа, середостінні лімфовузли.

Проби патологічного матеріалу розміщують у флакони, які загвинчуються та не розбиваються. Матеріал зберігають не більше 8-12 годин у холодильнику до відправлення в лабораторію. В разі неможливості відправлення до лабораторії у вказаний термін патматеріал зберігають до 5-ти діб у замороженому стані за температури від мінус 18°C до мінус 25°C.

Для визначення приросту антитіл у парних пробах сироватки, які беруть з інтервалом (14 – 21) добу, дослідження проводять одночасно. Допускається зберігати сироватку крові до дослідження в замороженому стані не більше 3 місяців.

Метод виділення вірусу ПГ-3 в культурі клітин. Проби клінічного та патологічного матеріалу розморожують. Проби розведених 1:10 розчином Хенкса слизу, подрібнених зскрібків зі слизової оболонки носа та шматочків патологічного матеріалу спочатку освітлюють центрифугуванням у рефрижераторній центрифугі за температури 4 – 6°C, при 1500-2000 об/хв упродовж 30 хвилин і надосадову рідину відбирають піпеткою в стерильні флакони. До отриманого супернатанту додають антибіотики (пеніциліну натрієву сіль і стрептоміцину сульфату по 500 ОД на 1 см³) і залишають для контакту на 10-12 годин за температури 4-6 °С. Після цього проводять стерилізуючу фільтрацію отриманої рідини з використанням фільтрів з розміром пор 0,2 мкм.

Профільтрований матеріал перевіряють на стерильність і використовують для зараження культури клітин або зберігають до дослідження у замороженому стані впродовж 1 місяця. Для вірусовиділення використовують первинно трипсинізовані та перещеплювані моношарові культури клітин нирки вівці (НВ) або нирки теляти (НТ). Попередньо культуру клітин тричі відмивають від залишків сироватки розчином Хенкса з антибіотиками (по 200 ОД на 1 см³ пеніциліну натрієвої солі та стрептоміцину сульфату) і заливають живильним середовищем без сироватки, залишаючи на 2 години за температури 37°C до інокуляції досліджуваного матеріалу.

Досліджуваний матеріал інокують по 0,5 см³ в кожную пробірку з культурою клітин, попередньо зливаючи підтримуюче поживне середовище, і залишають для контакту на 1,5-2 години за температури 37 °С. Після завершення контакту досліджуваний матеріал зливають, а в кожную пробірку додають підтримуюче поживне середовище з антибіотиками та культивують у термостаті 5-7 діб за температури 37 °С, перевіряючи щодобово на наявність цитопатогенної дії вірусу (ЦПД) під світловим мікроскопом. З метою отримання остаточного висновку щодо наявності вірусу ПГ-3 в пробах досліджуваного матеріалу проводять не менше 3-х „сліпих” пасажів.

Першою ознакою репродукції та накопичення вірусу ПГ-3 в інфікованій культурі клітин є позитивна реакція гемадсорбції, завдяки його здатності аглютинувати еритроцити морської свинки. В разі виділення вірусу його ідентифікацію проводять з використанням специфічної до вірусу ПГ-3 сироватки в реакціях затримки гемадсорбції або затримки гемаглютинації.

Метод виявлення вірусу ПГ-3 в реакції гемадсорбції та його ідентифікації в реакції затримки гемадсорбції. Реакцію гемадсорбції ставлять до моменту прояву цитопатогенної дії вірусу в культурі клітин. З цією метою з пробірок з інфікованою культурою клітин зливають підтримуюче середовище, промивають їх розчином Хенкса та вносять 1%-ву суспензію еритроцитів по 0,5 см³ на пробірку. Для контакту пробірки в штативи залишають у термостаті за температури 37 °С на 30 хвилин, після чого суспензію неадсорбованих еритроцитів зливають, моношар клітин обережно промивають розчином Хенкса й досліджують під світловим мікроскопом.

При наявності вірусу ПГ-3 в інфікованій культурі клітин у полі зору спостерігаються скупчення еритроцитів у вигляді виноградної грони, які розташовані окремими осередками в місцях репродукції вірусу ПГ-3. У контролі неінфікованих клітин адсорбція еритроцитів не спостерігається.

З метою ідентифікації гемадсорбуючого цитопатогенного агента ставлять реакцію затримки гемадсорбції. Для цього перед внесенням 1%-вої суспензії еритроцитів попередньо в пробірки з інфікованою культурою клітин (відміту розчином Хенкса) на 1 годину контакту за температури 37°C вносять специфічну до вірусу ПГ-3 сироватку (з титром антитіл не нижче 1:160), розведену 1:10. Далі РЗГад проводиться й обліковується за попередньо наведеною методикою.

У разі позитивної РЗГад відбувається блокування вірусу ПГ-3 антитілами специфічної сироватки й адсорбція еритроцитів на поверхні моношару інфікованих клітин не спостерігається.

Метод виявлення вірусу ПГ-3 в реакції гемаглютинації та його ідентифікації в реакції затримки гемаглютинації. За допомогою реакції гемаглютинації, яку ставлять мікрометодом у пластинах з лунками вірус парагрипу-3 виявляють у суспензії інфікованої вірусутримуючим матеріалом розмороженої культури клітин. З цією метою в лунки вносять за допомогою піпетки з каліброваною насадкою по одній краплі (0,025 см³) фізіологічного розчину та роблять серійні розведення вірусутримуючої клітинної суспензії, попередньо освітленої низькошвидкісним центрифугуванням за 2000 об/хв – 15 хвилин. Після цього в лунки вносять по одній краплі 1%-вої суспензії еритроцитів морської свинки, пластину обережно струшують і залишають за температури 20 – 25 °С до повного осідання еритроцитів у контролі. Для визначення спонтанної аглютинації еритроцитів в лунки додають по одній краплі фізіологічного розчину і 1%-вої суспензії еритроцитів.

При позитивній РГА в розведенні 1:16 і вище специфічність вірусного гемаглютиніну встановлюють у РЗГА зі специфічною до вірусу ПГ-3 сироваткою, або сироваткою крові телят-реконвалесцентів. Дослідження проводять таким чином. У першому ряді лунок готують серійні розведення досліджуваного матеріалу на фізіологічному розчині як і в попередньому дослідженні. В другому ж ряду лунок замість фізіологічного розчину вносять по одній краплі специфічної до вірусу ПГ-3 сироватки в розведенні 1:10, на якій також готують серійні розведення вірусотримуючого матеріалу, що містить гемаглютинін. Панелі залишають для контакту на 1 годину за температури 37°C після чого в усі лунки вносять по дві краплі 1%-вої суспензії еритроцитів і результати враховують через 30-45 хвилин після повного осідання еритроцитів за температури 20 – 25 °С.

Зниження титру вірусного гемаглютиніну в 4 і більше разів у ряді зі специфічною сироваткою слугує підставою для ствердження про те, що інфікований матеріал містить вірус парагрипу-3.

Метод виявлення вірусу ПГ-3 в реакції імунофлуоресценції. Для дослідження у РІФ використовують змиви та зскрібки зі слизової оболонки носової порожнини від хворих телят, шматочки слизової оболонки трахеї, легенів і середостінні лімфатичні вузли від загиблих телят, а також інфіковані культури клітин.

З поверхні слизових оболонок або зрізу проб патологічного матеріалу роблять мазки-відбитки на предметному склі або наносять на його поверхню суспензію зі зскрібків слизових оболонок, патматеріалу та інфікованих клітин, розподіляють тонким шаром і висушують за температури 20 – 25 °С. Мазки фіксують в охолодженому ацетоні, в морозильній камері побутового холодильника за температури від мінус 6 °С до мінус 10 °С 30 хвилин. Після чого зафіксовані мазки висушують на повітрі впродовж 3-5 хвилин, переносять у вологу камеру і фарбують специфічним флуоресцентним імуноглобуліном (ФІТЦ – кон'югатом) упродовж 30 хвилин, у темряві за температури 20 – 25 °С. Через 30 хвилин ФІТЦ-кон'югат змивають дистильованою водою. Предметні скельця з мазками занурюють у забуферений фізіологічний розчин (рН 7,2-7,4) на 10 хвилин, після чого переносять на 10 хвилин у ЗФР, в який додають на кожні 100 см³ 0,1см³ 0,1%-вого розчину синьки Еванса. Потім мазки просушують на повітрі й досліджують під імерсією у люмінесцентному мікроскопі (об'єктив 90), в синьо-зеленому спектрі променів (ФС1-4СЗС7-2 і № 2). При цьому використовують нефлуоресцентне масло або диметилфталат.

Облік реакції проводять за інтенсивністю світіння інфікованих клітин і оцінюють за чотирихрестовою системою, а саме:

- ++++ – дуже яскрава флуоресценція зеленого кольору в ядрі, цитоплазмі клітин;
- +++ – яскрава флуоресценція зелено-жовтого кольору в ядрі, цитоплазмі клітин;
- ++ – слабка флуоресценція жовтого кольору в цитоплазмі клітин;
- «0» – цитоплазма клітин має темно-коричневе забарвлення.

Позитивною реакцією вважається флуоресценція клітин на ++++ та +++ при негативних результатах контролів.

Контролі реакції

1. Обробка позитивних препаратів специфічною до вірусу ПГ-3 сироваткою (реакція гасіння флуоресценції).

На відомий позитивний матеріал (скло з культурою клітин, що заражені вірусом ПГ-3) наносять специфічну сироватку, витримують у вологій камері одну годину, а потім обробляють специфічним імуноглобуліном (як наведено вище). При цьому не повинна спостерігатись специфічна флуоресценція, цитоплазма клітин повинна мати темно-коричневе забарвлення або ледве помітну флуоресценцію жовтуватого кольору. При цьому видно архітектоніку клітин.

При обробці позитивних препаратів негативною сироваткою, а потім специфічним імуноглобуліном (за умов, які наведені вище) специфічне світіння повинно зберігатись.

2. Обробка препаратів, які не утримують вірусний матеріал.

Скельця з культурою клітин, що не заражені вірусним матеріалом (вірусом ПГ-3), і мазки-відбитки проб патологічного матеріалу заздалегідь здорових тварин фарбують специфічним кон'югатом (як наведено вище). При цьому специфічна флуоресценція повинна бути відсутня: цитоплазма клітин повинна мати темно-коричневе забарвлення або ледве помітну фонову флуоресценцію жовтуватого кольору.

Метод виявлення антитіл до вірусу ПГ-3 в реакції затримки гемаглютинації. Реакція затримки гемаглютинації застосовується для серологічної діагностики парагрипу-3 великої рогатої худоби. У відділі вірусології ННЦ «ІЕКВМ» випускається набір, який складається з антигенів і сироваток для постановки РЗГА.

Етапи постановки реакції включають приготування 1,5%-вої суспензії еритроцитів, підготовку досліджуваних і контрольних сироваток, титрування антигенів і приготування їх робочих розчинів, постановку реакції затримки гемаглютинації.

Приготування суспензії еритроцитів. Для постановки РЗГА використовують 1,5 % суспензію еритроцитів морської свинки, яку готують напередодні та при необхідності зберігають за температури 4 – 8 °С не більше двох діб.

Підготовка сироваток. Вміст флаконів з контрольними сироватками (специфічною та негативною) розводять дистильованою водою до початкового об'єму. Досліджувані та контрольні сироватки розводять 1:10 фізіологічним розчином та інактивують на водяній бані за температури 56 °С 30 хвилин. Потім інактивовані сироватки змішують з 1,5%-вою суспензією еритроцитів у рівних об'ємах (по 0,025 см³) і залишають за температури 20 – 25 °С до повного осідання еритроцитів.

Титрування антигену. Для визначення активності антигену (гемаглютинуючого титру) готують його розведення (на фізіологічному розчині) від 1:4 до 1:8192, з коефіцієнтом 2, в об'ємі 0,025 см³, в 12 лунках імунологічного планшета. До кожного розведення антигену вносять по 0,025 см³ (одну краплину) 1,5%-вої суспензії еритроцитів, планшет обережно струшують і залишають за температури 20 – 25 °С на 35–45 хвилин, до повного осідання еритроцитів. Одночасно в трьох лунках ставлять контроль еритроцитів на спонтанну аглютинацію (0,025 см³ фізіологічного розчину + 0,025 см³ суспензії еритроцитів).

Найвище розведення антигену, яке викликає повну аглютинацію еритроцитів, приймається за титр антигену, що відповідає одній гемаглютинуючій одиниці (1 ГАО). Для постановки РЗГА готують робочий розчин антигену з вмістом 4 ГАО в 0,025 см³. Активність робочого розчину антигену контролюють його титруванням у чотирьох розведеннях на фізіологічному розчині в об'ємі 0,025 см³. При правильному виборі робочої дози повна аглютинація еритроцитів повинна спостерігатися тільки в перших двох лунках.

Постановка РЗГА. Серійні дворазові розведення досліджуваних і контрольних сироваток від 1:20 до 1:2560 готують у 8-ми лунках, в об'ємі 0,025 см³, на робочому розчині антигену та залишають для контакту на 45 – 60 хвилин за температури 20-25 °С, або для прискорення реакції на 30 – 35 хвилин у термостаті за температури 37 °С. Потім в усі лунки вносять по 0,025 см³ суспензії еритроцитів, планшети обережно струшують і залишають за температури 20-25 °С до повного осідання еритроцитів у контролях реакції.

Контролі реакції: РЗГА зі специфічною сироваткою та негативною сироваткою, РГА на спонтанну аглютинацію еритроцитів.

Позитивними вважають проби сироватки, які викликали повну або не менше ніж на 75% затримку аглютинації еритроцитів у розведенні 1:40 і вище. При дослідженні парних проб сироватки крові основою для встановлення ретроспективного діагнозу є приріст титрів антитіл у других пробах сироватки в 4 і більше разів.

Антиген після розчинення допускається зберігати за температури 4 – 6 °С не більше 24 годин або в замороженому стані від мінус 5 °С до мінус 25 °С – до 10 діб. Не рекомендується багаторазове заморожування та розморожування рідкого антигену в зв'язку із можливим зниженням його гемаглютинуючої активності.

Метод виявлення вірусу ПГ-3 та антитіл до вірусу ПГ-3 в реакції імуноферментного аналізу. Імуноферментний аналіз застосовують для виявлення специфічного антигену вірусу ПГ-3 у пробах клінічного та патологічного матеріалу від хворих і загинув тварин і в культурі інфікованих клітин.

ІФА також застосовують для ретроспективної діагностики парагрипу-3 великої рогатої худоби шляхом виявлення специфічних антитіл у парних пробах сироватки крові хворих і перехворілих тварин.

Суть імуноферментної реакції полягає в специфічній взаємодії антитіл і антигену з наступним приєднанням до отриманого комплексу антивидового імуноглобуліну, міченого ферментом, здатним зумовлювати розпадання субстрату з утворенням кольорового продукту ферментативної реакції.

Склад наборів, хід дослідження і інтерпретація результатів описані фірмами-виробниками у відповідних настановах щодо застосування.

Облік результатів проводять візуально або спектрофотометрично.

Висновки: 1. Викладені методи прямої та ретроспективної діагностики парагрипу-3 можуть бути використані в лабораторіях ветеринарної медицини, навчальних закладах та науково-дослідних установах.

2. Своєчасна діагностики ПГ-3 зменшує до мінімуму економічні збитки в господарствах.

Список літератури

1. Стеценко, В. І. Особливості серологічної діагностики параінфлюенци-3 великої рогатої худоби [Текст] / В. І. Стеценко // Ветеринарія: Респ. міжвід. тематич. наук. зб. – К., 1975 – Вип. 41. – С. 15 – 20.
2. Стеценко, В. І. Мікрометод РЗГА при параінфлюенци-3 [Текст] / В. І. Стеценко // Ветеринарія: Респ. міжвід. тематич. наук. зб. – К., 1976. – Вип.44 – С. 8 – 10.
3. Стеценко, В. І. Пневмоентерити великої рогатої худоби: діагностика та специфічна профілактика [Текст] / В. І. Стеценко, Л. І. Кучерявенко, Р. О. Кучерявенко // Наук. вісник Нац. аграрного ун-ту. – К., 2000. – Вип. 28.- С. 72 – 73.
4. Методические рекомендации по дифференциальной диагностике респираторных и желудочно-кишечных заболеваний телят вирусной и бактериальной этиологии / П. А. Красочко, Н. В. Савицкий, Н. А. Ковалев и др. [Текст] // Минск, Энциклопедикс, 2000. – 32 с.
5. Стеценко, В. И. Разработка средств диагностики и специфической профилактики вирусных пневмоэнтеритов телят // Совр. вопр. пат. с.х ж-х /Сб. матер. междунар. научно-практ. конф. 23-24 окт 2003, РНИУП Интс. эксп. вет. им Вышелесского НАН Беларуси, - Минск, 2003, – С. 276-277.

METHODS OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF BOVINE PARAINFLUENZA-3

Kucheryavenko V.V.

NSC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary medicine», Kharkiv

Information concerning traditional and new methods of parainfluenza-3 diagnostics, including methods, where diagnosticums, developed in the virology department of the NSC «IECVM» are used, is presented in the paper.

УДК 619:578.834.1:636.2:616-076

ВИЯВЛЕННЯ АНТИГЕНУ КОРОНАВІРУСУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Кучерявенко Р.О.

ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» УААН,
м. Харків

У статті викладені методи виявлення й ідентифікації коронавірусу великої рогатої худоби, що сприяють своєчасній діагностиці цієї інфекції, яка наносить значні економічні збитки скотарським господарствам. Описана методика відбору проб, виділення вірусу на культурі клітин, індикації за допомогою електронної мікроскопії та виявлення його в реакції гемаглютинації та зустрічного імуноелектрофорезу.

Коронавірусна інфекція ВРХ – гостро перебігаюче, висококонтагіозне вірусне захворювання новонародженого молодняка ВРХ, яке характеризується профузним проносом, дегідратацією організму, розвитком катарального або катарально-гемо-