

1	2	3	4	5	6
Урал	КСТ	40-48	-	-	-
	НВ-2	60-72	44-48	22-24	-
	ВНК-21	40-48	22-24	22-24	20-24
	СНЕВ	68-72	68-72	-	-
ТК-ВІЕВ	КСТ	90-96	-	-	-
	НВ-2	9 діб	9 діб	9 діб	-
	ВНК-21	10 діб	5 діб	5 діб	-
	СНЕВ	11 діб	7 діб	-	-
Монорин	КСТ	40-48	-	-	-
	НВ-2	68-72	44-48	60-68	-
	ВНК-21	44-48	20-24	20-24	20-24
	СНЕВ	12 діб	12 діб	-	-
Оренбург	КСТ	90-96	-	-	-
	НВ-2	7 діб	10 діб	12 діб	-
	ВНК-21	11 діб	10 діб	10 діб	-
	СНЕВ	12 діб	7 діб	-	-
468	КСТ	7 діб	-	-	-
	НВ-2	7 діб	10 діб	12 діб	-
	ВНК-21	10 діб	8 діб	7 діб	-
	СНЕВ	12 діб	7 діб	-	-

Висновки. За аналізу отриманих даних зроблено висновок: тривале зберігання штамів Молдавський та ТК-ВІЕВ культурального вірусу ІРТ за температури мінус 40 °С без криоконсервантів упродовж 9 та 19 років знижує інфекційну активність на 3,0-3,5 lg ТЦД₅₀/см³; а штамів Урал, Монорин та Оренбург за тих же умов має менш руйнівні наслідки, (титр знижується на 1,0-1,5 lg ТЦД₅₀/см³). Найвищу інфекційність встановлено у штамів вірусу ІРТ Урал, Монорин та Молдавський, репродукованих у культурах клітин ВНК-21, НВ, та КСТ. Найбільш чутливою до вірусу ІРТ є культура перещеплюваних клітин ВНК-21, що визначається найвищими титрами та найменшими термінами накопичення вірусу. За ролюрного культивування штамів Урал та Монорин у культурі клітин титр інфекційної активності на 1,5 lg ТЦД₅₀/см³ вище у порівнянні з накопиченням біомаси вірусу у матрасах.

Список літератури

1. Васильев, Д.А., Луговцев, В.Ю. Лекционный курс по частной вирусологии. Вирусы, вызывающие болезни жвачных и однокопытных. [Электронный ресурс] / Ульяновск 2004 Режим доступа http://vgavm.w6.ru/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=6&Itemid=35
2. Инфекционная патология животных Том 1 [Текст] / под общей ред. А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьева [и др.] – М.: ИКЦ «Академкнига» 2006 г., С. 670-672.
3. Штрауб, О. Х. Инфекции крупного рогатого скота, вызываемые вирусами герпеса [Текст]: Пер. с нем. -Л. Г. Осипян под ред. Д. Ф. Осидзе; М. Колос – 1981. – 43-48 с.
4. Глотов, А. Г., Шуляк, А. Ф. с соавт. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота [Текст] Новосибирск, 2006. – 10-15 с.
5. Кузнецова, С. В., Концентрирование вируса инфекционного ринотрахеита [Текст] / С. В. Кузнецова. А. А. Бойко, В. С. Иванов // Ветеринария №10, 1985 – С. 31-32.

VARIABILITY IN REPRODUCTIVE ABILITY OF THE VIRUS OF INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS DEPENDING ON THE CULTIVATION AND STORAGE CONDITIONS

Pylypenko A.V., Bilokin V.S., Kucheryavenko R.A., Kucheryavenko L.I., Kucheryavenko L.N.
National Scientific Centre "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

The article gives results of the research dedicated to changes in reproductive of the virus infectious bovine rhinotracheitis depending on the virus shelf life, selected cultures and cultivation conditions.

УДК 578.84

ФОТОДИНАМІЧНА ІНАКТИВАЦІЯ ІРИДОВІРУСУ КОМАРА ФУЛЕРЕНАМИ C₆₀

Рудь Ю.П.¹, Прилуцька С.В.², Буцацький Л.П.², Прилуцький Ю.І.²

¹Інститут рибного господарства НААН України

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Іридовіруси – це великі ікосаедричні, цитоплазматичні, ДНК-вмісні віруси, ізольовані від комах, риб, амфібій і рептилій. Іридовіруси кровосисних комарів широко розповсюджені у природних водоймах України і є регуляторами їх чисельності. Діаметр віріонів складає 180-200 нм [1].

Фулерени C₆₀ – це ікосаедричні молекули вуглецю діаметром 0,7 нм [2]. Під дією УФ/Вид світла фулерени C₆₀ активуються і здатні продукувати активні форми кисню [3], які призводять до деструкції біологічних макромолекул, зокрема нуклеїнових кислот, білків і ліпідів [4].

У літературі зустрічаються повідомлення про фотодинамічну інактивацію вірусів з родин *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae* та *Togaviridae*. Так, у присутності фулеренів C₆₀ представники родин *Rhabdoviridae* та *Togaviridae* упродовж п'яти годин фотоінакти-

Розділ 3. Ветеринарна мікробіологія та вірусологія

вації втрачали свою інфекційність більше ніж на 7 lg ID₅₀. Фулерени C₆₀ спричиняли утворення атомарного кисню, який у свою чергу руйнував зовнішні оболонки вірусів [5]. У роботі [6] повідомляється про фотодинамічну інактивацію вірусу грипу в алонтоїсній рідині курячих ембріонів за присутності фулеренів C₆₀. Інфекційний титр вірусу грипу упродовж двох годин експозиції знижувався з 8 до 1 lg ID₅₀. Електронно-мікроскопічні дослідження контрольних зразків алонтоїсної рідини виявили присутність віріонів вірусу грипу, натомість після фотодинамічної інактивації дослідники спостерігали велику кількість деформованих вірусних частинок, а також їхніх фрагментів.

Метою цієї роботи було дослідити взаємодію фотозбуджених фулеренів C₆₀ з віріонами іридовірусу, виділеного від личинок кровосисного комара *A. flavescens*.

Матеріали і методи. У роботі використовували іридовірус, виділений від личинок кровосисного комара *A. flavescens*, вилонених у природних водоймах Київської області. Іридовірус комара *A. flavescens* культивували на неспецифічному хазяїні – личинках великої вошинної молі *G. mellonella*. Личинки інфікували вірусомісним матеріалом та інкубували за температури 20-22 °С. Через 14 днів з личинок виділяли іридовірус комара *A. flavescens*.

Виділення іридовірусу комара *A. flavescens* з інфікованих личинок великої вошинної молі проводили методом диференційного центрифугування. Характерний блакитний осад свідчив про наявність віріонів іридовірусу. Очищення іридовірусу комара *A. flavescens* проводили в градієнті щільності сахарози 10-50 % на ультрацентрифугі Beckman L5-50B у роторі SW-40 при 20000 об/хв упродовж 40 хвилин. Концентрація білка в очищеному вірусному препараті становила 1,7 мг/мл. Інфекційний титр іридовірусу комара в культурі личинок *G. mellonella* визначали за загальноприйнятим методом [7]. Інфекційний титр вірусу в личинках *G. mellonella* становив 11,2±0,11 lg ID₅₀/мл.

Для електронно-мікроскопічних досліджень очищеної вірусної суспензії іридовірус контрастували 2 % розчином ураніацетату та вивчали на електронному мікроскопі EM-125.

Для фотодинамічної інактивації іридовірусу комара *A. flavescens* використовували галогенову лампу потужністю 400 Вт. До очищеної вірусної суспензії з концентрацією білка 170 мкг/мл додавали водорозчинні фулерени C₆₀ у концентрації 100, 10 та 1 мкг/мл. Фотодинамічну інактивацію іридовірусу комара *A. flavescens* проводили при довжині хвилі 400-850 нм. Між джерелом світла та вірусною суспензією використовували скляний світлофільтр. Час експозиції становив 2,5, 10, 30 та 60 хвилин. У контрольних варіантах використовували вірусну суспензію без фулеренів та вірусну суспензію з фулеренами, але без фотодинамічної інактивації вірусу.

Після експозиції з дослідного та контрольного зразків робили 10-кратні розведення у стерильній дистильованій воді в інтервалі 10⁻¹-10⁻¹². Матеріалом з кожного розведення інфікували личинки *G. mellonella*. Інфіковані личинки інкубували за температури 20 °С. Через 14 днів визначали наявність іридовірусу в кожній личинці візуально, оцінюючи колір осаду.

Результати досліджень. Як показали результати досліджень, фотодинамічна інактивація іридовірусу комара *A. flavescens* фулеренами C₆₀ у концентрації 100 мкг/мл упродовж 2,5 хвилин призводила до зниження інфекційного титру вірусу на 2 порядки (рис.). Інфекційний титр вірусу у личинках *G. mellonella* після експозиції 2,5 хвилини досягав 9,00±0,05 lg ID₅₀/мл. Під час експозиції тривалістю 10 та 30 хвилин інфекційний титр іридовірусу комара *A. flavescens* знижувався з 11,2±0,11 до 8,27±0,06 та 7,2±0,06 lg ID₅₀/мл, відповідно (рис.). У контрольних варіантах інфекційний титр іридовірусу комара залишався незмінним і становив 11,2±0,11 lg ID₅₀/мл. Показники інфекційного титру іридовірусу комара *A. flavescens* після фотодинамічної інактивації тривалістю від 30 хвилин до години не змінювались суттєво. Інфекційний титр іридовірусу комара *A. flavescens* після фотодинамічної інактивації упродовж години становив 7,16±0,04 lg ID₅₀/мл (рис.).

Присутність фулеренів C₆₀ у вірусній суспензії, але без фотодинамічної інактивації, так само як і дія світла на вірусну суспензію без фулеренів C₆₀ не впливали на інфекційний титр іридовірусу комара *A. flavescens*.

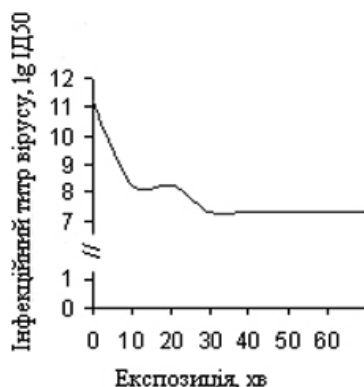


Рис. Фотодинамічна інактивація іридовірусу комара *A. flavescens* фулеренами C₆₀

Фулерени C₆₀ у концентрації 100 мкг/мл під час фотодинамічної інактивації впродовж 30 хвилин спричиняли зниження інфекційного титру іридовірусу комара *A. flavescens* на 4,0 lg ID₅₀/мл. Використання фулеренів C₆₀ у концентрації 10 мкг/мл знижувало інфекційний титр іридовірусу комара на 4,5 lg ID₅₀/мл. Натомість використання фулеренів C₆₀ у концентрації 1 мкг/мл фактично не впливало на інфекційний титр вірусу. Інфекційний титр іридовірусу комара *A. flavescens* становив 10,7 lg ID₅₀/мл, що всього на 0,5 lg ID₅₀/мл нижче, ніж у контрольних варіантах (табл.).

Таблиця – Фотодинамічна інактивація іридовірусу комара *A. flavescens* фулеренами C₆₀

Час інактивації	30 хвилин			
	100	10	1	Контроль
Концентрація фулеренів C ₆₀ , мкг/мл	100	10	1	Контроль
Інфекційний титр вірусу, lg ID ₅₀ /мл	7,2	6,7	10,7	11,2

Важливо зазначити, що ефективність зниження інфекційного титру іридовірусу від концентрації фулеренів C₆₀ та часу експозиції істотно пов'язана з їх агрегацією у воді [8]: утворення фулеренових кластерів (агрегатів) з поодиноких молекул призводить до істотної перебудови їх електронної структури.

Як показали результати електронно-мікроскопічних досліджень вірусної суспензії, віріони іридовірусу комара *A. flavescens* у присутності фулеренів C₆₀ утворювали нехарактерні конгломерати у вигляді тяжів. Деякі віріони характеризувались відсутніс-

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 імунodefіциту людини (HIV) [9] та гепатиту С (HCV) [10], нами було *вперше* досліджено взаємодію водорозчинних немодифікованих фулеренів C₆₀ з іридовірусами та виявлені антивірусні властивості цих молекул вуглецю за їхньої фотоактивації. Так, фулерени C₆₀, взаємодіючи з віріонами іридовірусу комара *A. flavescens*, знижували інфекційний титр вірусу при їх фотодинамічній інактивації на 4,5 lg ID₅₀/мл.

Отже, використання фотозбуджених фулеренів C₆₀ 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 C₆₀ – 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 C₆₀ 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 C₆₀ 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 C₆₀ 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 C₆₀ 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 C₆₀ 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 ID₅₀/ml. Therefore, for inactivation of iridoviruses in biological systems it is appropriate to use the photoexcited C₆₀ 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 МEB 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 *Chlamydia 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 атипичну 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 рРНК [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 МEB з хламідійних інфекцій птиці та овець Інституту ім. Фрідріха Льюфлера.