

nucleic acid fragments of a particular size. The specificity of the amplified fragment was determined by its position relative to a standard marker fragments.

Results. Synthesized were 3 pairs of oligonucleotide primers of which article – CDV F1 and CDV R2 [8]; CDV F3 and CDV R4 [9], as well as their own development – CDV F5 і CDV R6. For the results of studies found satisfactory properties developed when the pair of primers the annealing temperature 58 °C. Sensitivity was determined by dilution *Virus febris contagiosae canis*. Conducted validation developed primer pair in comparison with commercial PCR test system "Polichum" and serological test system «CITO TEST CDV Ag». Primers were sensitive and specific.

Conclusions. 1. Primers were developed to detect canine distemper based polymerase chain reaction. 2. Optimal annealing temperature makes 58 °C. 3. A test system has a high sensitivity, component $10^{1.7}$ TCID₅₀ *Virus febris contagiosae canis*. 4. Comparison of the developed test systems with commercial PCR test system and serological LHP system which resulted in it, at least not inferior to commercial.

Keywords: virus genome, diagnostics, system test, distemper.

УДК 619:579.843.96:636.4

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЕПІЗООТИЧНИХ ІЗОЛЯТІВ *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIA*

Кольчик О.В., Прохорятова О.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, e-mail: kolchuk-elena@yandex.ru

У статті наведено результати лабораторних досліджень щодо вивчення біологічних властивостей 3 епізоотичних ізолятів *Actinobacillus pleuropneumonia*. Визначали культуральні та гемолітичні властивості шляхом пересіву на щільні та рідкі поживні середовища з додаванням дріжджового екстракту (в якості НАД – V-фактор росту) та 5 % сироватки великої рогатої худоби. Вивчено біохімічні властивості та визначено мінімальну летальну дозу в дослідях на білих мишах і мурчаках при інтраперитонеальному введенні.

Ключові слова: актинобацильозна плевропневмонія, епізоотичні ізоляти, біологічні властивості, культивування бактерій, патогенність ізолятів, біопроба.

У сучасному свинарстві значну питому вагу займають інфекційні захворювання молодняка з переважним ураженням системи дихання. Однією з гострих проблем є респіраторні хвороби вірусно-бактерійної етіології, які широко поширені в багатьох країнах з розвиненим свинарством і завдають відчутного економічного збитку, тим самим гальмують розвиток галузі. Найбільш поширеними в країнах з розвиненим свинарством є репродуктивно-респіраторний синдром свиней, цирковірусна інфекція, ензоотична (мікоплазмозна) пневмонія, гемофільозний полісерозит, актинобацильозна плевропневмонія, пастерельоз, які найчастіше перебігають як змішані інфекції з варіюючим поєднанням патогенів [3, 5].

За спостереженнями науковців встановлено, що в спеціалізованих свинарських господарствах респіраторний симптомокомплекс викликається складною асоціацією збудників. Так, вірус репродуктивно-респіраторного синдрому свиней, окрім репродуктивної системи, вражає органи дихання, персистує в організмі свиней, розмножується в клітинах імунної системи (лімфоцитах і макрофагах), руйнує їх, призводить до імунодефіцитного стану. У таких тварин створюються умови для залучення до інфекційного процесу бактерійних респіраторних патогенів: мікоплазм, гемофільозних та актинобацильозних бактерій, пастерел й інших мікроорганізмів [3,5].

Останнім часом найбільшу стурбованість у сучасному свинарстві викликає проблема актинобацильозної плевропневмонії свиней. Це пов'язано з тим, що існуючі засоби вакцинопрофілактики, виключно імпорتنі, не відповідають за антигенними характеристиками епізоотичним штамам збудників, що циркулюють у господарствах України [2, 3, 5, 6].

Епізоотологічне обстеження, результати клінічних та патологоанатомічних досліджень, які проводили на промислових свинокомплексах, де фіксували випадки гострої респіраторної патології, вказують на контагіозність інфекції. Захворюваність свиней у стаді може досягати від 15 до 70 %, летальність – до 40 % в залежності від форми перебігу хвороби.

Виходячи з вищевикладеного, актуальним являється вивчення біологічних властивостей епізоотичних ізолятів *Actinobacillus pleuropneumonia*, що були виділені від загиблих свиней, з метою подальшого створення засобів специфічної профілактики.

Метою досліджень було вивчення біологічних властивостей епізоотичних ізолятів бактерій *Actinobacillus pleuropneumonia*, що були виділені від загиблих свиней.

Матеріали та методи. Дослідження проводили в лабораторії вивчення хвороб свиней ННЦ «ІЕКВМ». Для виділення, культивування та вивчення культуральних, морфологічних властивостей

збудників бактеріальних інфекцій використовували поживні середовища: сироватко-дріжджовий (в якості НАД – V-фактор росту) бульйон з додаванням 5 % сироватки крові великої рогатої худоби; сироватковий та кров'яний агар з баккормилкою (*Pasteurella haemolytica*), агар на основі м'ясного гідролізату за Хотингером з додаванням 10 % еритроцитів крові коня, агар на основі м'ясного гідролізату за Хотингером з додаванням 10 % дефібринованої крові барана, м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), м'ясо-пептонний агар з додаванням 10 % дріжджового екстракту, кров'яний МПА з додаванням 5 % дефібринованої крові барана [5, 6]. Під час культивування бактерій в рідких та напіврідких поживних середовищах звертали увагу на інтенсивність помутніння, утворення та характер осаду. На щільних поживних середовищах звертали увагу на час утворення колоній, визначали форму, розмір, поверхню, колір, блиск і прозорість, консистенцію та край колонії.

Для вивчення тінкторіальних властивостей мікроорганізмів із агарових та бульйонних культур готували мазки та фарбували їх за Грамом. Наявність у бактерій капсул вивчали за методом Бури-Гінса [1].

Біохімічні властивості визначали за допомогою систем індикаторних паперових для ідентифікації мікроорганізмів і середовищ Гіса.

Патогенність виділених ізолятів *Actinobacillus pleuropneumonia* перевіряли на білих мишах (масою 16–18 г) та мурчаках (масою 250–300 г) шляхом інтраназального, інтраперітонеального зараження [7].

Результати досліджень. Дослідження клінічного та патологічного матеріалу із свиного господарств Донецької, Харківської, Запорізької, Херсонської, Сумської областей України протягом 2011–2013 рр. проводили в лабораторії вивчення хвороб свиней ННЦ «ІЕКВМ». Бактеріологічними методами досліджено 125 проб патологічного матеріалу (серце, легені, печінка, селезінка, бронхіальні та мезентеріальні лімфовузли) від поросят 0–5 місячного віку. За результатами проведених досліджень із патологічного матеріалу (легені) від загиблих тварин виділяли *Actinobacillus pleuropneumonia* в асоціації з іншими патогенними бактеріями, наприклад, з: *Pasteurella multocida* (34,0 %) + *Mycoplasma hyopneumonia* (11,0 %) + *Mycoplasma haemosuis* (8,0 %) + *Actinobacillus pleuropneumonia* (46,6 %); із крові *Actinobacillus pleuropneumonia* (53,0 %) + *Pasteurella multocida* (25,0 %) + *Streptococcus suis* (22,0 %). Всього було виділено та ідентифіковано 3 епізоотичних ізоляти *Actinobacillus pleuropneumonia* (№ № 1, 2, 3).

Із зразків легенів і бронхіальних лімфовузлів робили висів на сироватко-дріжджовий бульйон з додаванням 5 % сироватки крові ВРХ. Інкубували за температури $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ протягом 18–20 годин і розсівали на чашки Петрі з сироватко-дріжджовим агаром. На поживному середовищі реєстрували напівпрозорі матові колонії жовтуватого кольору, з рівними краями, випуклим центром і слизької консистенції. Із характерних для *A. pleuropneumonia* колоній робили мазки, які фарбували за Грамом.

Для ідентифікації актинобацил визначали культуральні властивості шляхом пересіву на щільні поживні середовища. На м'ясо-пептонному агарі з додаванням 10 % дріжджового екстракту *A. pleuropneumonia* росли у вигляді дрібних, випуклих, з рівними краями слизової консистенції колонії діаметром 0,5–1,5 мм. На кров'яному агарі (агар з 5 % дефібринованої крові барана) з додаванням 10 % дріжджового екстракту спостерігали ріст дрібних напівпрозорих колоній діаметром 0,2–1,5 мм з рівними краями та прозорою зоною оточеною В-гемолізом. На м'ясо-пептонному агарі з додаванням 1 % глюкози - колонії культури клейкі, їх важко зняти повністю з поверхні агару. При мікроскопії мазків виявляли грамнегативні дрібні короткі палички, кокобактерії та овоїди (рис. 1).

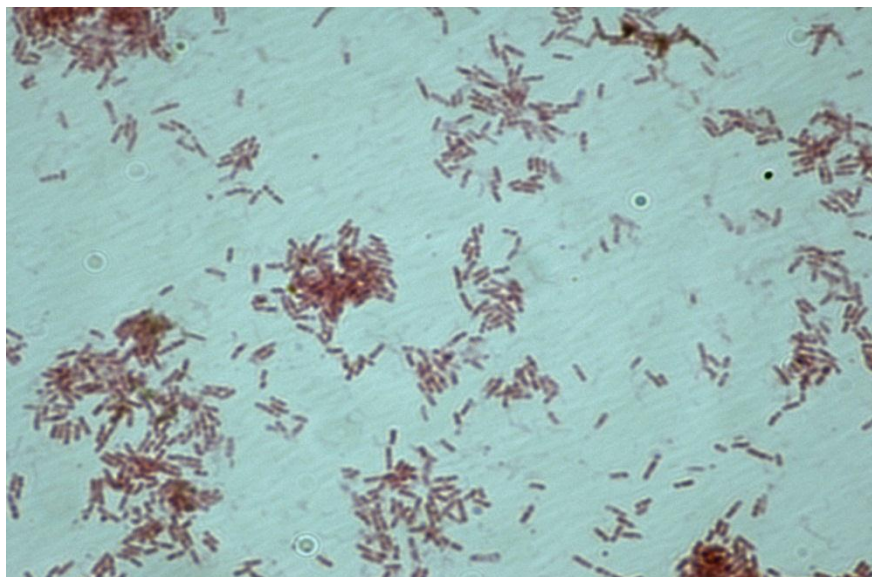


Рис. 1. Епізоотичний ізолят № 1, фарбування за Грамом, предметне збільшення 5x1000

В якості баккормилки використовували культуру *Pasteurella haemolytica*, яку висівали на поверхню глюкозо-сироваткового агару та спостерігали феномен сателітного росту бактерій *A. pleuropneumonia* у вигляді напівпрозорих, круглих, з рівними краями і слизової консистенції колоній діаметром 0,5–1,0 мм розташованих в зоні 0,5-1,0 см від баккормилки.

Вивчення біохімічних властивостей 3 епізоотичних ізолятів *A. pleuropneumonia* показали, що ізоляти володіли оксидазною, уреазною та бета-галактозидазною активністю, не продукували індол і сірководень, не утилізували цитрати. Бактерії ферментували сахарозу, манозу, фруктозу з утворенням кислоти без газу та були неактивні по відношенню до лізину, орнітіна та аргініна, не ферментували сорбіт та інозит. Узагальнені результати вивчення біохімічних властивостей наведено у таблиці 1.

Таблиця 1 – Біохімічні властивості ізолятів *Actinobacillus pleuropneumonia*

Ознака	<i>A. pleuropneumonia</i> (n=3)
Каталаза	+
Оксидаза	+
Уреаза	+
Гемоліз на агарі з еритроцитами барана	+
Потреба в NAD	+
D-маноза	+
Утворення індолу	-
H ₂ S	-
Сахароза	+
Глюкоза	+

Для визначення патогенності 3 виділених епізоотичних штамів *A. pleuropneumonia* проводили інтраперитоніальне та інтраназальне зараження білих мишей (n=10) та мурчаків (n=5). Зараження проводили бактеріальною масою з концентрацією за стандартом каламутності 1 млрд. м. тіл в 1 см³ в дозах представлених в таблиці 2. За тваринами спостерігали протягом 2 діб.

Таблиця 2 – Патогенні властивості 3 ізолятів *Actinobacillus pleuropneumonia*

Вид тварин	Кількість голів	Доза введення, см ³ /Кількість загиблих, гол.		
		Інтраназальне зараження		
Білі миші	5	0,1/0	0,2/0	-
Контроль	5	-	-	-
Мурчаки	5	0,1/0	0,2/0	0,3/0
Контроль	5	-	-	-
		Інтраперитонеальне зараження		
Білі миші	5	0,1/5	0,2/5	0,3/5
Контроль	5	-	-	-
Мурчаки	5	0,2/0	0,3/0	0,5/5
Контроль	5			

Дослідження на лабораторних тваринах показали, що білі миші та мурчаки нечутливі до *A. pleuropneumonia* при інтраназальному зараженні.

Під час інтраперитонеального зараження загибель білих мишей реєстрували на 1 добу після введення антигену в дозі 0,1 см³. Мурчаки були менш чутливі до зараження, мінімальна летальна доза для них складала 0,5 см³.

Таким чином, із легенів і бронхіальних лімфовузлів від поросят 0–5 місячного віку з клінічними ознаками ураження респіраторного тракту було виділено 3 епізоотичних ізоляти збудників та доведено їх належність до роду *Actinobacillus*. Вивчено їх культурально-морфологічні, гемолітичні та біохімічні властивості, визначено патогенність 3 виділених ізолятів *Actinobacillus pleuropneumonia*.

Висновок. За результатами проведених лабораторних досліджень встановлено, що виділені 3 епізоотичні ізоляти за біологічними властивостями відносились до роду *Actinobacillus*, виду *Actinobacillus pleuropneumonia*.

Список літератури

1. Андросик, Н.Н. Биологические свойства возбудителя актинобациллярной (гемофилезной) плевропневмонии свиней [Текст] / Н.Н. Андросик, А.В. Букин // Вет. наука производству. - Минск, 1998. - Вып. 33. -С. 91-94.
2. Букин, А.В. Этиология, клинично-эпизоотологическое проявление и профилактика плевропневмонии свиней: автореф. дис.канд. вет. наук [Текст] / Букин Александр Валентинович. Минск, 1996. - 13 с.
3. Грисслер А. Болезни свиней [Текст] / А. Грисслер Киев: ООО «Аграр Медиен Украина», 2010. – 235 с.
4. Зверьков, Д. А. Изучение вирулентных свойств возбудителя *A.pleuror pneumoniae* на белых мышах [Текст] / Д.А. Зверьков, Д.А. Девришов // Вopr. ветеринарии и вет. биологии: сб. науч. тр. молодых ученых. М., 2000. -Вып. 1.-С. 4-5.
5. Пейсак З. Болезни свиней [Текст] / З. Пейсак, Брест, -2008. — 406 с.
6. Профилактика экспериментальной актинобациллезной плевропневмонии свиней с помощью иммуномодуляторов и экспериментальной вакцины [Текст] / И.Е. Воронин, А.Н. Панин, А.В. Кибирев и др. // Сб. науч. тр. ВГНКИ. М., 1995.-Т. 57.-С. 243-249.
7. Inzana, T.J. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [Text] / T.J. Inzana // Microb. Pathog. 1991. - Vol. 11. - P. 305-316.

THE STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF EPIZOOTIC ISOLATES ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIA

Kolchuk O.V., Prokhoryatova O.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

*The aim of the research was the study of biological properties 3 epizootic isolates of bacteria *Actinobacillus pleuropneumonia* that were allocated dead pigs*

*For selection, cultivation and studying of culture, morphological properties of bacterial infections, used the nutrient medium: whey-yeast (as ABOVE - V-growth factor) broth with addition of 5 % of the blood serum of cattle; serum and blood agar with baccarelli (*Pasteurella haemolytica*), agar-based meat hydrolyzed by Hottinger with addition of 10 % of red blood cells horse.*

*Pathogenicity 3 selected isolates *Actinobacillus pleuropneumonia* tested on white mice (mass 16-18 g) and Guinea pigs (weight 250–300 g) by intranasal, intraperitoneal introduction.*

*The research results were studied biological properties of 3 epizootic isolates *Actinobacillus pleuropneumonia*. Cultural and haemolytic properties was determined by means of re-sowing on the solid and liquid nutrient medium with the addition of yeast extract (as ABOVE - V-growth factor) and 5 % of the blood serum of cattle. Were studied biochemical properties and defined minimum lethal dose in the experiments on white mice and Guinea pigs when intraperitoneal infection.*

*According to the results of laboratory researches it is established that 3 epizootic isolate belonged to the genus *Actinobacillus* (type *Actinobacillus pleuropneumonia*) by on the biological properties.*

Keywords: actinobacillus pleuropneumonia, epizootic isolates, biological properties, cultivation of bacteria, pathogenic isolates, bioassays.

УДК 619:616.98:579.881.1

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА КУ-ЛИХОМАНКИ

Марущак Л.В., Неволько О.М.

Державний Науково-Дослідний Інститут з Лабораторної Діагностики та Ветеринарно-Санітарної Експертизи (ДНДІЛДВСЕ), м. Київ, e-mail: maruschak@yandex.ru

Дерябін О.М.

Державний науковий-контрольний інститут біотехнологій і штамів мікроорганізмів, м. Київ

*Ку-лихоманка відноситься до трансмісивних інфекційних хвороб. Молекулярно-біологічні методи виявлення *S. Burnetii* мають ряд переваг перед серологічними: більша чутливість і специфічність, короткий час отримання результатів, можливість діагностики Ку-лихоманки на ранніх строках захворювання.*

Ключові слова: Ку-лихоманка, *Coxiella burnetii*, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Ку-лихоманка відноситься до трансмісивних інфекційних хвороб, якій в Україні надане особливе епідемічне значення через наявність переносників збудника та сприятливих клімато-географічних умов для його розвитку в організмі членистоногих [1, 3, 4]. Необхідність досліджень та розробки вітчизняного діагностичного набору пояснюється тим, що в Україні на Ку-лихоманку у 2011 році зареєстровано 15 захворювань у людей і становить 0,03 на 100 тис. населення. Захворювання реєструється в 2007–2010 р. серед дорослого населення Одеської та Донецької областей. В Одеській області зареєстровано 13 випадків на Ку-лихоманку, а частка серопозитивних осіб, серед 865 обстежених, становила 4,05±0,67 %. Зареєстровано 20 випадків захворювання людей на Ку-лихоманку у 2-х областях (Одеська – 16, Донецька – 4). У 2013 р. зареєстровано 1 випадок у Одеській області проти 4-х у 2012 р.