

MOLECULAR DIAGNOSIS OF FISH RNA-VIRUSES IN UKRAINE

Rud Yu. P.*Institute of Fisheries of the NAAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine***Buchatskiy L. P.***Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine*

The paper presents the results of the development of diagnostic test systems based on the polymerase chain reaction to identify the most common viral infections of fish in Ukraine, such as Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and Spring viraemia of carp virus. The goal of current research was to show the importance of PCR diagnostics in prevention of fish infections. Developed diagnostic systems were tested in the laboratory of biotechnology in aquaculture of IF NAAS. Briefly, for DNA or RNA extraction, cDNA synthesis, PCR and sequencing the commercial kits were used. For primer selection we concerned to OIE recommendations and applied the Vector NTI 11, on-line service BLAST and MEGA 6.0 software. Selection of diagnostics was performed using the OIE recommendations for the most popular aquaculture species. The specificity, efficiency and benefits of the proposed methods comparing with serological and histological methods of diagnosis of fish pathogens were shown. Consequently the PCR assays mentioned in this research are more accurate, easy to use and economical than traditional serological or cell culture methods. The assays can be rapidly conducted such that under ideal conditions, data can be generated and returned to the fish-farming site within a single day.

Keywords: molecular diagnostics, PCR, fish infectious diseases

УДК: 619:616-078:57.083.33:636

**ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ВІДБОРУ «СУХОЇ КРАПЛИНИ КРОВІ»
ДЛЯ ЕПІЗООТОЛОГІЧНОГО МОНІТОРИНГУ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТА ДИКИХ ПТАХІВ****Рула О. М., Стегній Б. Т., Музика Д. В., Стегній А. Б., Усова Л. П.**

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, Україна, e-mail: alex.ru75@inbox.ru*

Відбір «сухої краплини крові» на фільтрувальний папір являє собою мінімально-інвазивний спосіб збору, транспортування та довгострокового зберігання проб, придатних для серологічно-ретроспективної діагностики. У даній статті представлені результати щодо відбору в польових умовах проб крові від сільськогосподарської та дикої птиці на фільтрувальний папір, подальшої обробки матеріалу в лабораторних умовах, постановки РЗГА з використанням отриманого супернатанту в порівнянні з аналогічними пробами крові отриманими класичними методами. У результаті проведених досліджень було доведено, що запропонований метод є високоефективним та суттєво не впливає на результати серологічних досліджень.

Ключові слова: кров, птахи, інфекційні захворювання, антитіла

Природним резервуаром збудників багатьох інфекційних хвороб, що становлять небезпеку для тварин і людини, є дикі птахи. При цьому найбільше значення мають представники перелітних видів, які розповсюджують інфекції за рахунок сезонних міграцій [1, 2, 3, 4, 5].

Загальновізнано, що еколого-географічні особливості території є найважливішим фактором у розвитку епізоотичного процесу. У цьому відношенні південь України є територією, на якій у весняно-осінній період зосереджується багатомільйонне поголів'я пернатих мігрантів з різних куточків світу. Таким чином, моніторинг інфекційних хвороб у місцях перебування диких птахів на зазначеній території вельми актуальний в науковому та практичному відношенні, як з епізоотичної, так і епідеміологічної точки зору. Одним із складових моніторингу є проведення постійних серологічних досліджень, які направлені на виявлення особин позитивно реагуючих до відповідних інфекцій, у тому числі особливо небезпечних, таких як високопатогенний грип птиці та ньюкаслська хвороба.

Збір відібраних проб крові в польових умовах, їх подальше зберігання та транспортування до лабораторій проводиться в замороженому стані на льоду або в рідкому азоті. За рахунок впливу температури навколишнього середовища дані хладогени потребують постійного контролю та поповнення, що створює деякі труднощі в даних умовах.

Фільтрувальний папір з плямами висушеної крові, зібраної у природному осередку від людини і тварин, давно використовується в епідеміологічних дослідженнях [6]. Переваги цього підходу до відбору зразків перед класичними очевидні. Насамперед, вони

пов'язані із зручністю взяття капілярної крові, низькою собівартістю, можливістю довгострокового зберігання отриманих зразків крові (до 6 місяців за низької вологості та температури 2–8 °С) та їх транспортування (два тижні за температури 20–25 °С).

Також застосування цього підходу до збору крові доцільно при проведенні масштабних популяційних досліджень в рамках сероепізоотичного моніторингу та розшифровки спалахів захворювань як серед сільськогосподарської, так і дикої птиці.

На ринку діагностичних препаратів ряд закордонних виробників (Мунктелл, Ватман) пропонують значний асортимент паперу для відбору біологічних рідин для серологічних і молекулярно-генетичних скринінг-тестів. Для проведення моніторингових досліджень у популяціях диких птахів зазначені засоби відбору проб вельми необхідні, але вони потребують значних коштів.

Мета роботи: відпрацювання методики відбору крові від сільськогосподарської та дикої птиці на фільтрувальний папір, відпрацювання методики пробопідготовки отриманих зразків і визначення достовірності отриманих з використанням даних проб крові результатів серологічних досліджень в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА).

Матеріали та методи. Кров від птахів відбирали з підкрильцевої або з яремної вени [7, 8].

Серологічні дослідження щодо виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 та параміксовірусів проводили в РЗГА за методикою, рекомендованою МЗБ [9] з використанням референтних антигенів виробництва OIE/FAO Reference Laboratory for Newcastle disease and Avian Influenza, Istituto Zooprofilattico delle Venezie (Італія) та Veterinary Laboratories Agency (Великобританія).

У лабораторних дослідженнях у якості позитивного та негативного контролю використовували серопозитивну до збудника ньюкаслської хвороби птицю та півнів-донорів відповідно, а у якості польових сироваток використовували проби крові на фільтрувальному папері, які були відібрані під час експедиції на о. Сиваш АР Крим.

Підготовку проб крові до серологічного дослідження проводили двома способами: перший – використання нативної сироватки крові та розведеної ФСБ 1:8; другий – отримання супернатанту з проб «сухої» крові на фільтрувальному папері з подальшою пробопідготовкою.

Для взяття зразків «сухої» крові використовували смужки фільтрувального паперу розміром 1,2 x 10 см. При підборі паперу було важливо, щоб обраний матеріал був ідеально чистий і мав відмінні характеристики поглинання рідин. На фільтрувальний папір наносили достатню кількість крові так, щоб вона повністю просочила його з обох сторін на довжину від 1,2 см до 2,5 см. З іншого боку смужки робили відповідний запис, де вказували: вид птиці, місце відбору, назву біологічного матеріалу та дату.

Після відбору зразку крові впродовж 60 хв його підсушували шляхом закріплення паперу на штативі так, щоб він обдувався з обох сторін. При використанні товстого паперу в лабораторних умовах, доцільно використовувати активне підсушування в термостаті або під кондиціонером. Під час проведення даної маніпуляції слід уникати потрапляння на зразок вологи, прямих сонячних променів, контакту з поверхнями та комахами. Після висихання зразків їх пакували індивідуально в поліетиленові або паперові пакети з відповідним етикетуванням. При транспортуванні проб складали супровідну документацію.

З метою максимального елюювання антитіл з просоченого кров'ю фільтрувального паперу за допомогою диороколу вирізали диски діаметром по 5 мм. За допомогою пінцету 3 диски переносили до епіндорфів з попередньо розлитим по 200 мкл фосфатно-сольовим буфером (рН7,0±0,2). Потім епіндорфи розміщували на термощейкері та піддавали інтенсивному шутелюванню за високих обертів упродовж 60 хв. Після інкубування в умовах холодильника (4–8 °С) упродовж 12 год проводили низькошвидкісне центрифугування (2000 об/хв протягом 10 хв за температури 10 °С) зразків і відбір супернатанту (надсадової рідини). Таким чином отримували зразок, еквівалентний розбавленій 1:10 сироватці крові.

З метою звільнення зразків крові від неспецифічних термолабільних і термостабільних інгібіторів проби піддавали прогріванню на водяній бані за температури 56 °С впродовж 30 хв та обробці вуглекислим газом, після чого осад видаляли низькошвидкісним центрифугуванням (2000 об/хв протягом 10 хв за температури 10 °С) [10].

Результати досліджень. Першим етапом роботи було стандартизувати метод пробопідготовки та аналізу отриманих результатів серологічного дослідження в РЗГА взятої на фільтрувальний папір крові зі стандартними методами підготовки нативної та розведеної 1:8 сироваток крові.

При дослідженні в РЗГА нативної, розведеної 1:8 сироваток та отриманих з фільтрувального паперу супернатантів крові щеплених проти збудника НХ курей щодо наявності антитіл встановлено наявність їх в усіх пробах крові, незалежно від методу підготовки їх до дослідження (таблиця 1). Різниця лише величина титру, як в нативній (8,0±1,94 log₂), так і розведених (6,9±1,73 log₂) та спеціально підготовлених сироватках крові (6,3±1,41 log₂), а коефіцієнт варіації (CV) титрів антитіл становив 24,29 %, 25,05 % та 22,38 % відповідно. У негативній сироватці антитіл не виявлено.

Наступним етапом роботи було підтвердження ефективності обраної методики пробопідготовки та аналізу отриманих результатів серологічних досліджень з використанням польових сироваток крові від дикої птиці. Результати наведені у таблиці 2.

Таблиця 1 – Результати РЗГА щодо наявності антитіл у сироватках крові птиці за різних методів відбору та підготовки до дослідження

Номер криломітки птиці (кури)	контроль	наявність антитіл до ньюкаслської хвороби за різних методів пробопідготовки		
		нативна сироватка крові	розведена 1:8 сироватка крові на ФСБ	сироватка крові з фільтрувального паперу
Б 521127	позитивний	1:128 (7 log ₂)	1:128 (7 log ₂)	1:40 (5,32 log ₂)
Б 521128	позитивний	1:64 (6 log ₂)	1:16 (4 log ₂)	1:10 (3,32 log ₂)

Б 521129	позитивний	1:1024 (11 log ₂)	1:256 (8 log ₂)	1:160 (7,32 log ₂)
Б 521130	позитивний	1:512 (9 log ₂)	1:128 (7 log ₂)	1:80 (6,32 log ₂)
Б 521131	позитивний	1:256 (8 log ₂)	1:256 (8 log ₂)	1:160 (7,32 log ₂)
Б 521132	позитивний	1:1024 (11 log ₂)	1:1024 (10 log ₂)	1:320 (8,32 log ₂)
Б 521133	позитивний	1:128 (7 log ₂)	1:64 (6 log ₂)	1:160 (7,32 log ₂)
Б 521134	позитивний	1:64 (6 log ₂)	1:32 (5 log ₂)	1:40 (5,32 log ₂)
Б 521135	позитивний	1:64 (6 log ₂)	1:64 (6 log ₂)	1:80 (6,32 log ₂)
Б 521136	позитивний	1:512 (9 log ₂)	1:256 (8 log ₂)	1:80 (6,32 log ₂)
У середньому (log ₂)		8,0±1,94	6,9±1,73	6,3±1,41
0410601	негативний	0	0	0

Таблиця 2 – Дослідження в РЗГА польових сироваток крові дикої птиці отриманих з фільтрувального паперу

Вид птиці	наявність антитіл	
	до збудника грипу А підтипу Н1-Н14	до збудника параміксовірусу ПМВ-1 та ПМВ-8
Крячок рябодзьобий (n=2)	Н4 – 1:40 (n=1), Н11 – 1:10 (n=1)	ПМВ-1 – 1:10 (n=1)
Сивка морська (n=4)	Н11 – 1:160 (n=1)	ПМВ-1 – 1:160 (n=1), ПМВ-1 – 1:80 (n=2), ПМВ-1 – 1:40 (n=1)
Побережник чорногрудий (n=23)	Н6 – 1:40 (n=1), Н1 – 1:20 (n=1), Н3 – 1:10 (n=1), Н3 – 1:40 (n=1), Н11 – 1:160 (n=1), Н2 – 1:20 (n=1)	ПМВ-1 – 1:20(n=1), ПМВ-1 – 1:160 (n=1), ПМВ-1 – 1:320 (n=1)
Пісочник морський (n=1)	0	0
Побережник білий (n=3)	Н3 – 1:40 (n=1), Н3 – 1:20 (n=1)	0
Мартин жовтоногий (n=2)	0	0

З таблиці 2 видно, що в підготовлених пробах крові мартина жовтоногого (n=2) та пісочника морського (n=1) антитіл до грипу А та ПМВ-1, ПМВ-8 не виявлено. При дослідженні трьох проб крові побережника білого, дві проби виявились позитивними до грипу А підтипу Н3 в розведенні 1:40 та 1:20. З 23 проб крові побережників чорногрудих виявились позитивними по одній пробі до вірусу грипу А підтипу Н1 (1:20), Н2 (1:20), Н6 (1:40), Н11 (1:160) та дві проби до Н3 (1:10, 1:40). До ПМВ-1 виявились позитивними 3 проби в розведеннях 1:20, 1:160 та 1:320. У пробах крові сивки морської (n=4) виявлені антитіла до грипу А підтипу Н11 (n=1) у розведенні 1:160, ПМВ-1 у розведеннях 1:160 (n=1), 1:80 (n=2) та 1:40 (n=1). Одна проба крові від крячка рябодзьобого була позитивна до вірусу грипу А підтипу Н4 (1:40), а друга проба спрацювала позитивно як мікс до грипу А (Н11 – 1:10) та ПМВ-1 (1:10).

Висновки. 1. Отримані результати РЗГА з використанням проб крові імунізованої птиці проти збудника НХ та підготовленою за класичним методом (нативна сироватка крові), розведена 1:8 і запропонованого методу отримання супернатанту з «сухої краплини крові» вказує на те, що «суха краплина крові», на відміну від нативної (8,0±1,94 log₂), продемонструвала результати (6,3±1,41 log₂), у порівнянні з результатами, отриманими із розведеними сироватками крові (6,9±1,73 log₂).

2. Показник специфічності серологічного тестування з використанням «сухої краплини крові» продемонстрував відповідність результатів (наявність антитіл) у лабораторних умовах у 100 % випадків.

3. Високу ефективність запропонованого методу підтверджують результати серологічних досліджень дикої птиці. Так, при дослідженні «сухої краплини крові» від дикої птиці були виявлені антитіла у побережника білого до збудника грипу А підтипу Н3, побережника чорногрудого – грипу А підтип Н1, Н2, Н6, Н11, Н3 та ПМВ-1, сивки морської – грип А підтип Н11, ПМВ-1, крячка рябодзьобого – грип А підтип Н4 та Н1/ПМВ-1.

Перспективи подальших досліджень. Результатами досліджень підтверджено, що метод отримання проб крові на фільтрувальний папір підходить для польових умов, де асептичний відбір і адекватне збереження сироватки крові або плазми неможливі, тому у даний час технологія отримання «сухої краплини крові» інтегрується в моніторингові програми популяційних досліджень птиці при контролі ефективності вакцинації проти збудників інфекційних захворювань та оцінці рівня специфічного імунітету.

Список літератури

1. Bankowski, R. A. Proceedings of the First International Symposium on Avian Influenza. U.S. [Text] // Animal Health Association: Richmond, VA, 1981. 1 – 215.
2. Easterday, B. C. Proceedings of the second international symposium on avian influenza. U.S. [Text] // Animal Health Association: Richmond, VA, 1987. 1 – 475.
3. Easterday, B. C. and C. W. Beard. Proceedings of the third international symposium on avian influenza. U.S. [Text] // Animal Health Association: Richmond, VA, 1992. 1 – 458.
4. Stallknecht, D. E. Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations: Waterfowl, shorebirds, pelicans, cormorants, etc. In D. E. Swayne and R. D. Slemons (eds.) [Text] // Proceedings of the fourth international symposium on avian influenza. U.S. Animal Health Association: Richmond, VA, 1998. 61 – 69.
5. Swayne, D. E. and R. D. Slemons. 1998. Proceedings of the fourth international symposium on avian influenza U.S. [Text] // Animal Health Association: Richmond, VA, 1 – 401.
6. Помелова, В.Г. Перспективы интерпретации технологии сухого пятна крови в популяционные исследования здоровья и среды обитания человека [Текст] / В.Г. Помелова, Н.С.Осин // Вестник Российской Академии медицинских наук, 2007. – N 12. – С.10-16.
7. Болотников, И.А. Гематология птиц [Текст] / И.А. Болотников, Ю.В. Соловьев // Л. : Наука, 1980. – 156 с.
8. Лабораторная диагностика болезней птиц [Текст]: справочник / Р.Н. Коровин [и др.] // М. : Агропромиздат, 1989. – 256 с.
9. OIE Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Електр. ресурс] / Спосіб доступу: <http://www.oie.int> – Заголовок з екрану.
10. Сюрин, В.Н. Диагностика вирусных болезней животных [Текст]: справочник / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина// – М.: Агропромиздат, 1991. – 528 с.

USE METHOD «DRIED BLOOD SPOT» FOR EPIZOOTOLOGICAL MONITORING OF INFECTIOUS DISEASES FROM FARM AND WILD BIRDS

Rula O. M., Stegnyy B. T., Muzyka D. V., Stegnyy A. B., Usova L. P.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

Selection of the «Dried blood spot» on the filter paper is a minimal invasive method of collection, transport and long-term storage of samples suitable for serological diagnosis. This article presents the results of blood samples selection from agricultural and wild birds in the field on filter paper, processing of the material in the laboratory, setting HAI test using the obtained supernatant, compared with similar blood samples obtained by classical methods. As a result have shown that the proposed method is highly effective and does not significantly affect the results of serological studies.

Keywords: *shelter, Ptah infektsiyi zahvoryuvannya, antitila*

УДК: 619:616.98-036.22:578.831.3:636.5(477)

ЕПІЗООТОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ МЕТАПНЕВМОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ПТИЦІ У ПТАХІВНИЧИХ ГОСПОДАРСТВАХ УКРАЇНИ У 2015 РОЦІ

Стегній Б. Т., Музика Д. В., Білоїван О. В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

Павліченко О. В.

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків, Україна

У статті представлені результати проведення серологічних досліджень серед курей та індиків у деяких промислових і присадибних господарствах України щодо наявності антитіл до метаневмовірусної інфекції в сироватках крові.

Ключові слова: *метаневмовірусна інфекція, інфекційний ринотрахеїт, синдром опухлої голови, сироватки крові.*

Метаневмовірусна інфекція птиці (МПВП) – висококонтагіозне респіраторне захворювання індиків, курей та інших видів домашньої та дикої птиці, яке характеризується запальними процесами верхніх дихальних шляхів. Це спільна назва двох подібних за клінічними ознаками респіраторних синдромів, які спостерігаються у різних видів птиці, а саме: у індиків – ринотрахеїт, у курей та курчат – синдром опухлої голови. Раніше цю хворобу називали пневмовірусом птиці, нещодавно перейменували