

Sampling of blood from wild birds was performed according to conventional methods recommended by the OIE from jugular vein for further serum [5].

Liquid egg yolks prepared by the following method: thoroughly mixing the yolk with saline at a ratio of 1:1, and adding to this mixture an equal volume of chloroform shaken for 5–10 minutes and centrifugation at 3000 per/min 15 minutes [6].

Conclusions. 1. According to a study in the ELISA test system with 32 samples of biological material (blood serum and egg yolks) selected from 8 kinds of birds positive for influenza A virus were only 10 Avocet eggs yolks samples (91 %) and 5 Slender-billed Gull (42 %).

2. According to the results of the identification of blood serum (which gave a positive result in the ELISA test system) with the reference influenza A in haemagglutination inhibition test system received data that antibodies to the influenza virus subtype H10 detected in 33.3 % of samples to influenza virus subtype H13 – in 10 % of the samples, and subtype H14 – in 90 % of samples taken from the Avocet. For influenza virus subtypes H10 and H14 samples of yolk extracts selected from the Slender-billed Gull, found 20 % positive, and influenza virus subtype H13 – 80 %.

3. According to a study in haemagglutination inhibition test system for presence of antibodies to paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease) revealed the presence of antibodies in the serum of only Oystercatcher in breeding 7 log₂.

Keywords: avian influenza, Newcastle disease, serum, extracts yolks of eggs, wild birds.

УДК 619:616.34-022-07:636.2-053.2

РОЗРОБКА ТА АПРОБАЦІЯ СИСТЕМИ МОНІТОРИНГУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ КОНТАМІНАЦІЇ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ САЛЬМОНЕЛАМИ

Герілович А.П., Глєбова К.В., Ареф'єв В.Л.

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

Запропонована схема проведення моніторингових досліджень на наявність контамінації представниками роду *Salmonella* біологічних об'єктів із застосуванням тест-системи на основі полімеразної ланцюгової реакції, яка дозволяє у найкоротший термін визначити наявність генетичного матеріалу сальмонел та одночасно генотипувати серед них п'ять найбільш розповсюджених видів. Проведена практична апробація запропонованої схеми моніторингових досліджень та порівняно результати молекулярно-генетичних та бактеріологічних методів виявлення контамінації.

Ключові слова: сальмонела, контамінація, система моніторингу.

Сальмонельози – це одні з найбільш розповсюджених і небезпечних токсикоінфекцій людини, сільськогосподарських, свійських і диких тварин, що спричиняються бактеріями роду *Salmonella*. Джерелом інфекції є як хворі на сальмонельоз особини, так і здорові бактеріоносії, які можуть виділяти збудника багато місяців і навіть років. У харчових продуктах, особливо в напівфабрикатах, сальмонели не лише зберігаються, але й швидко розмножуються. Зараження сальмонелою відбувається внаслідок споживання контамінованих продуктів харчування: м'яса птиці, товарного яйця та яєчних продуктів, молока та молочних продуктів [4, 5].

Актуальність проблеми контамінації сальмонелою різних біологічних об'єктів на сьогоднішній день не підлягає сумніву. Невідкладним питанням є розробка системи ранньої діагностики наявності сальмонел у продуктах харчування, тваринній сировині тощо. Тому потреба у сучасних умовах прискорити визначення наявності сальмонел у якості контамінантів біологічних об'єктів, а також знизити загальні фінансові витрати на дослідження стала причиною розробки методик раннього виявлення та типування серологічного варіанту збудника на основі полімеразної ланцюгової реакції.

Мета роботи. Розробка та практична апробація у ветеринарній лабораторній практиці тест-системи на основі полімеразної ланцюгової реакції для визначення наявності будь-якого представника роду *Salmonella* та типування найбільш розповсюджених серологічних варіантів, апробація системи моніторингу контамінації біологічних об'єктів сальмонелами з визначенням найбільш широко розповсюджених серологічних варіантів.

Матеріали та методи. Для проведення моніторингу біологічних об'єктів щодо контамінації сальмонелами були досліджені проби готових кормів для птиці різного віку та кормових добавок (n=240), що були отримані з птахогосподарств різних форм власності.

Для розробки та апробації системи моніторингу були використані бактеріологічні та молекулярно-діагностичні методи на основі полімеразної ланцюгової реакції з парами праймерів: Salm_3 + Salm_4 (виявляє генетичний матеріал всіх представників роду *Salmonella* без видової ідентифікації) та пар праймерів, які виявляють генетичний матеріал окремих видів представників роду *Salmonella*: Sent_F+Sent_R (для *Salmonella enterica Enteritidis* – 299 п.н.); Styp_F+Styp_R (для *Salmonella enterica*

Typhimurium – 420 п.н.); *Styphy_F+Styphy_F* (для *Salmonella Typhi*– 738 п.н.); *Sdub_F+Sdub_F* (для *Salmonella Dublin* – 203 п.н.); *Sgal_F+Sgal_R* (для *Salmonella Gallinarum-pullorum* – 97 п.н).

Результати досліджень. На першому етапі проби біологічного матеріалу, що потрапляли до лабораторії, піддавали дослідженню у ПЛР на наявність генетичного матеріалу будь-якого представника роду *Salmonella* за допомогою використання загальнородової пари праймерів *Salm_3+Salm_4* [1]. У разі негативного результату дослідження припиняли, при позитивному результаті у ПЛР проводили дослідження виділеної сумарної ДНК на наявність генетичного матеріалу інших збудників у разі потреби.

При отриманні позитивного результату на другому етапі досліджень утворюється амплікон на рівні 387 пар нуклеотидів [1]. Виділена сумарна ДНК використовується надалі для постановки мультиплекс – ПЛР з п'ятьма парами праймерів для типування збудника. При позитивному результаті мультиплекс – ПЛР проводять ізоляцію сальмонел бактеріологічними методами. Остаточний результат щодо контамінації надається тільки після завершення бактеріологічних досліджень. Для проведення моніторингових досліджень ми запропонували схему, яка представлена на рисунку 1.

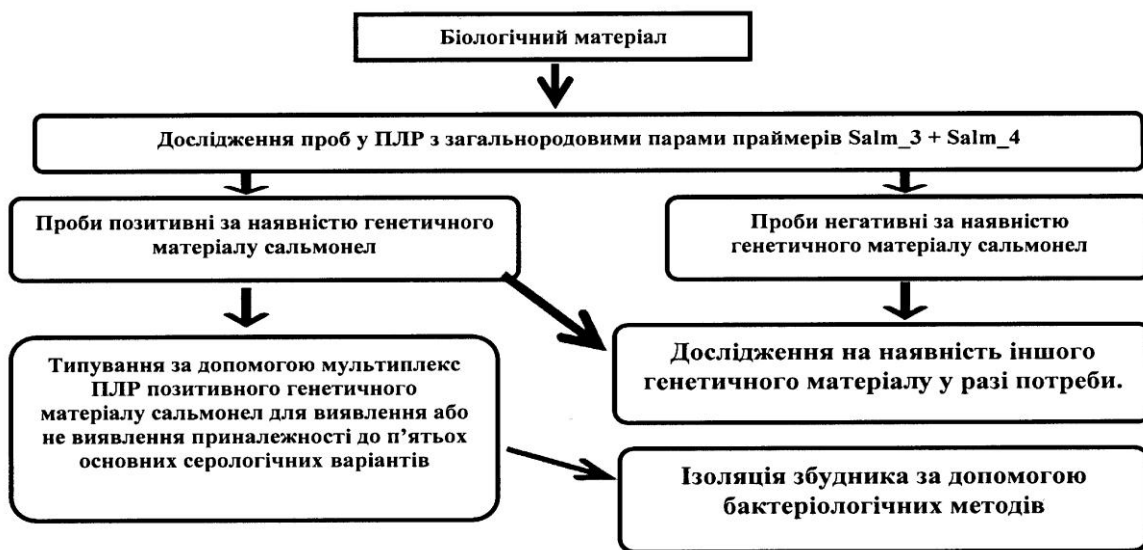


Рис.1. Схема моніторингових досліджень

Згідно запропонованої схеми на першому етапі було визначено за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції наявність генетичного матеріалу сальмонел за допомогою загальнородових праймерних систем *Salm_3* та *Salm_4*. Результати наведені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Результати визначення наявності генетичного матеріалу сальмонел у кормах та кормових добавках

№ з/п	Найменування зразку	Загальна кількість зразків	Кількість позитивних зразків / відсоток	Кількість негативних зразків / відсоток
1	Повнораціонний комбікорм для птиці різного віку	171	23 (13,4 %)	148 (86,6 %)
2	Зерносуміші	21	7 (33,7 %)	14 (66,3 %)
3	Шроти	10	3 (30 %)	7 (70 %)
4	М'ясо-кісткове борошно	20	4 (20 %)	16 (80 %)
5	Рибне борошно	15	5 (33,3 %)	10 (66,7 %)
6	Глутен кукурудзяний	4	0 (0 %)	4 (100 %)
7	Кістковий напівфабрикат	4	0 (0 %)	4 (100 %)

Як видно з таблиці 1, контамінація сальмонелою мала місце у п'яти різновидах досліджуваної продукції, а її кількість варіювала від 13,4 % до 33,7 %. Після отримання результату про зразки, що містять генетичний матеріал сальмонел, було проведено типування збудника за допомогою видоспецифічної мультиплексної системи праймерів [1–3]. Результати типування генетичного матеріалу у позитивних зразках кормів наведено у таблиці 2.

Таблиця 2 – Результати видоспецифічного типування генетичного матеріалу сальмонел

№ з/п	Найменування позитивного зразку	Кількість позитивних зразків за видами				
		<i>Salmonella Enteritidis</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Salmonella Dublin</i>	<i>Salmonella Gallinarum-pullorum</i>	<i>Salmonella Typhi</i>
1	Повнораціонний комбікорм для птиці різного віку	15	5	2	1	0
2	Зерносуміші	0	2	2	3	0
3	Шроти	0	0	1	2	0
4	М'ясо-кісткове борошно	3	1	0	0	0
4	Рибне борошно	0	5	0	0	0
6	Глютен кукурудзяний	0	0	0	0	0
7	Кістковий напівфабрикат	0	0	0	0	0

Як видно з таблиці 2, більша частина зразків була забруднена культурою *Salmonella Enteritidis*. На другому місці була контамінація культурою *Salmonella Typhimurium*, далі відповідно реєструвались позитивні зразки за наявності *Salmonella Dublin*. Найменша кількість випадків контамінації була за серотипом *Salmonella Gallinarum-pullorum*. Серотип *Salmonella Typhi* не траплявся взагалі.

Позитивні за результатами тестування методом полімеразної ланцюгової реакції проби біологічного матеріалу піддавали дослідженню щодо виявлення представників роду *Salmonella* за допомогою традиційних бактеріологічних методів виявлення та ізоляції збудників. Порівняння результатів досліджень наведено у таблиці 3.

Таблиця 3 – Порівняння результатів дослідження біологічного матеріалу методом полімеразної ланцюгової реакції та бактеріологічним методом

№ ч/ч	Представники роду <i>Salmonella</i>	Сумарна кількість позитивних зразків за результатами ПЛР	Сумарна кількість ізованих збудників роду <i>Salmonella</i>	Співвідношення результатів, отриманих різними методами
1	<i>Salmonella Enteritidis</i>	18	18	1:1
2	<i>Salmonella Typhimurium</i>	13	13	1:1
3	<i>Salmonella Dublin</i>	5	5	1:1
4	<i>Salmonella Gallinarum-pullorum</i>	6	6	1:1

При порівнянні результатів одержаних молекулярно-діагностичним методом і результатів виділення та ізоляції збудника традиційними бактеріологічними методами ми спостерігали повну автентичність цих результатів (таблиці 3).

Висновки та перспективи подальших досліджень.

1. У результаті проведеної роботи запропонована та практично апробована схема моніторингових досліджень на наявність контамінації сальмонелами біологічних об'єктів, яка дає можливість скоротити час отримання попереднього результату та зменшити витрати.

2. Система моніторингу дозволяє провести одночасне генотипування основних клінічно значимих видів сальмонел за допомогою використання видоспецифічних праймерних систем, що у практичних умовах дає можливість швидко визначити ймовірне джерело контамінації.

3. Показано, що чутливість та специфічність при порівнянні методу полімеразної ланцюгової реакції та бактеріологічних методів однакова. Перспективою є подальші моніторингові дослідження на наявність контамінації сальмонелою біологічних об'єктів із застосуванням запропонованої схеми.

Список літератури

1. Герілович А.П. Розробка олігонуклеотидних систем для виявлення сальмонел у біологічних об'єктах / Ареф'єв В.Л., Вовк С.І. // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2011. — Вип. 95 – с. 47-49.
2. Ареф'єв В.Л. Разработка методики индикации ДНК сальмонелл и идентификации серологических вариантов *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium* на основе полимеразной цепной реакции / В.Л. Ареф'єв // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Харків – 2012. — Вип. 96 – с. 77-80.
3. Ареф'єв В.Л. Розрахунок олігонуклеотидних послідовностей для генотипування окремих представників роду *Salmonella* / Герілович А.П // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Харків – 2013. — Вип. 97 – с. 56-58.
4. Шуляк Б.Ф. Традиционные и новые подходы к лабораторной диагностике сальмонеллеза / Шуляк Б.Ф. // «Справочник заведующего КДЛ» – 2009, № 12 – с. 21—26.
5. Zhou L. A fast and highly sensitive blood culture PCR method for clinical detection of *Salmonella enterica* serovar Typhi / Pollard A.J. // Annals Clin Microbiol Antimicrob – 2010 – 9:14 doi:10.1186/1476-0711-9-14.

DEVELOPMENT AND TESTING OF MONITORING SYSTEM FOR DETECTION OF CONTAMINATED BIOLOGICAL OBJECTS BY SALMONELLA**Gerilovych A.P., Glebova K.V., Arefjev V.L.**

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Kharkov

Development and practical studying of the test system based on the polymerase chain reaction for detection of any member from the Salmonella genus and the most common serological types under veterinary laboratory practice. Studying of biological objects concerning its contamination by the most common serological variants of Salmonella.

Materials and Methods. For the monitoring of biological samples manufacturing feeds for birds of different ages and feed additives ($n=240$) were analyzed. For development and testing of monitoring systems bacteriological and molecular diagnostic methods based on polymerase chain reaction were used.

Results. Proposed test system, based on PCR, includes genus-specific oligonucleotides as well as five pairs of species-specific primers to identify members of the genus Salmonella. The scheme of monitoring of presence of Salmonella genetic material in biological objects with the typing of the five most clinically important Salmonella was proposed. The approbation of the proposed system was done. The presence of genetic material of Salmonella was confirmed in five of the seven test material types. Four genotypes of Salmonella were detected and isolated. The studying of the samples by conventional bacteriological methods confirmed the results that were obtained using the PCR.

Conclusions. Scheme of monitoring studies using PCR test system that can simultaneously conduct genotyping major clinically relevant species of Salmonella was proposed and tested. It has been found that the sensitivity and specificity of this test system is equal to the results of bacteriological studies.

Keywords: Salmonella, contamination, monitoring, system.

УДК 619:616.98-07:636.4

ВИКОРИСТАННЯ ПЛР У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЗБУДНИКІВ ТРАНСКОРДОННИХ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ТВАРИН**Спиридонов В. Г., Іщенко Л. М., Мельничук С. Д.**

Національний університет біоресурсів та природокористування України

Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК, м. Київ, e-mail: spyrydonov@ukr.net

Розроблено діагностичні тести на основі ПЛР у реальному часі для детекції нуклеїнових кислот збудників блутангу, африканської чуми свиней та хвороби Шмалленберга у біологічному матеріалі. Проведено оптимізацію умов ампліфікації. Досліджено аналітичну специфічність та чутливість запропонованих тестів.

Ключові слова: блутанг, африканська чума свиней, хвороба Шмалленберг, полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі.

Транскордонні хвороби (Transboundary Animal Diseases) – це хвороби, які мають ключове значення для економіки, торгівлі та продовольчої безпеки багатьох країн світу, здатні до широкого транскордонного поширення в епідемічних масштабах, викликають високу летальність сприйнятливих тварин, а боротьба з ними вимагає спільних зусиль декількох країн [4].

Сьогодні важливе значення для нашої держави має африканська чума свиней (АЧС), оскільки випадки захворювання реєструються в Російській Федерації поблизу українсько-російського кордону. Африканська чума свиней (Pestis africana suum, хвороба Монтгомері) – висококонтагіозне захворювання свиней з летальністю 97–100 %. Викликається захворювання ДНК-вмісним вірусом родини *Asfarviridae*. Занесення збудника АЧС у благополучні країни розглядається як соціальна й економічна катастрофа. Це пов'язано з величезними економічними збитками, спричиненими епізоотією, які складаються із забою всіх свиней в епізоотичних вогнищах, проведенням ветеринарно-санітарних і карантинних заходів [1, 11].

Важливе значення має і таке захворювання як блутанг (Bluetongue, катаральна лихоманка овець, «синій язик», реовірусна інфекція овець), трансмісивна інфекція свійських і диких жуйних тварин, що характеризується лихоманкою, некрозом слизової оболонки травного каналу, дистрофією скелетних м'язів. Зазвичай блутанг проявляється у вигляді епізоотій із охопленням значної кількості поголів'я з летальністю до 90 %. Збудником захворювання є РНК-вмісний вірус родини *Reoviridae*, роду *Orbivirus*. Блутанг реєструють у ряді країн Європейського Союзу, зокрема, у Польщі, що становить потенційну небезпеку для нашої держави [2, 3, 9, 10].

Одним з маловивчених захворювань, яке наразі зумовило введення запобіжних заходів практично по всій Європі, є хвороба Шмалленберг, вперше виявлена в Німеччині у молочних корів влітку 2011 року. Встановлено, що викликається захворювання РНК-вмісним вірусом родини *Bunyaviridae*, роду *Ortobunyavirus*, серогрупи *Simbu* [5, 6].