УДК 619:616.98:578:636.2

ВИРУСНЫЕ ПАРАЗИТОЦЕНОЗЫ В СКОТОВОДСТВЕ

Матковская С.Г.
Харьковская государственная зооветеринарная академия

Проведены исследования по индикации и идентификации вируса вирусной диареи-болезни слизистых крупного рогатого скота в перевиваемой линии клеток коронарных сосудов теленка.

Investigations at indication and identification of virus of viral diarrhea as the disease of cattle mucous membranes are presented in transferred line of cells of calf coronary vessels .

Введение. Среди вирусных заболеваний крупного рогатого скота (КРС) есть такие, которые называются пневмоэнтеритами. Вирусы, вызывающие данные заболевания, относятся к разным таксономическим группам, но в результате заражения животных этими вирусами возникает сходный симптомокомплекс, поэтому для постановки диагноза необходимо проводить кропотливые лабораторные исследования с целью выявления всего комплекса возбудителей, а зачастую это не один возбудитель, а несколько, таких как вирус инфекционного ринотрахеита (ИРТ), парагриппа (ПГ-3), вирусной диареи (ВД), аденовирусной инфекции (АДВ) и других [1,2,3,4,5,7,10].

Самым быстрым, простым, достаточно дешевым и надежным методом индикации и одновременной идентификации вирусов in situ до настоящего времени остается реакция иммунофлуоресценции (РИФ) [1,2,4,7,8,9,11].

Материалы и методы исследований. Работа проводилась в ГНКИБШМ. Использовали вирус – шт.КМИЭВ-7 который был любезно предоставлен Красочко П.А., (Бел.ИЭВ им. С.Н.Вышелесского) [6]. До лиофилизации вирус был репродуцирован на MDBK (почка коровы). Вирус расфасован в 20 мл флаконах по 2 мл и лиофилизирован. Флакон был вскрыт и содержимое восстановлено до исходного объема раствором Хенкса. 100 мкл исходного вируса отобрали в отдельный пенициллиновый флакон и добавили 10 мл раствора Хенкса, 100 мкл жидкости было использовано для заражения монослоя клеток. Каждый последующий пассаж проводили в объеме 100 мкл вируссодержащей жидкости. Оставшийся вируссодержащий материал был законсервирован при температуре (- 70^0С). Для восстановления шт.КМИЭВ-7 была использована культура клеток – перевиваемая линия эпителия коронарных сосудов теленка (КСТ) и питательные среды – ДМЭМ, сыворотка крови КРС фирмы «Sigma». Клетки выращивали в пластиковой посуде до получения сплошного монослоя в течение 3-х суток в обычном термостате при температуре 37^0С. 1-й и 4-й пассажи вируса культивировали в обычных условиях, 2-й и 3-й в – в CO_2 термостате с содержанием углекислого газа 5%. Вируссодержащая культуральная жидкость после проведения всех пассажей была использована для титрования. Титрование вируса проводили микрометодом в 96-луночных панелях в CO_2 термостате с содержанием углекислого газа 5%. РИФ ставили прямым методом, используя изготавливаемые в ДП „Ветеринарная медицина" ННЦ „ИЭКВМ" наборы, любезно предоставленные нам для проведения исследований Р.А. Кучерявенко.

Результаты исследований. При осмотре культуры клеток под инвертированным микроскопом MICROS MS300, производства Австрии было установлено, что клетки имеют удлиненную угловатую форму, монослой сформирован полностью, поэтому был произведен первый пассаж вируса, который продолжался 50 часов, при этом состояние монослоя и развитие цитопатических изменений изучали каждые 7-17 часов, просматривая монослой под малым увеличением микроскопа, однако видимых изменений клеточного монослоя за это время не было обнаружено. Через трое суток в сплошном монослое были обнаружены отдельно расположенные скопления округлых темных клеток, что указывало на начало развития ЦПД, было принято решение считать первый пассаж «слепым» и произвести второй пассаж, однако флакон с культурой клеток был помещен в CO_2 термостат с содержанием углекислого газа 5%. Явное ЦПД на четыре креста наступило через 16 часов. Так, второй пассаж был произведен в конце рабочего дня, первый просмотр зараженного монослоя был произведен именно через 16 часов и сразу установлены в поле зрения отдельно лежащие разрушенные клетки с мелкоочаговой мелкозернистой дегенерацией. Сосуд с культурой был подвергнут однократному замораживанию-оттаиванию, после чего произведен 3-й пассаж вируса. После проведения 3-го пассажа ЦПД проявилось через 36 часов – на два креста при содержании флакона с культурой клеток в CO_2 термостате. ЦПД проявлялось постепенно, стандартно: уже через 7 часов наблюдали округление клеток, истончение монослоя, в последующем через 20 часов разрыв монослоя и наличие множества клеток с мелкоочаговой мелкозернистой дегенерацией, вакуализацией цитоплазмы и постепенным отслоением клеток от стекла в культуральную жидкость. Был произведен 4-й пассаж, ЦПИ развивались постепенно, стандартно, характерно для вируса ВД-БС. Вирус был накоплен в титре после 2-го пассажа – 4 $lgТЦД_{50}$/мл, после 3-го – 5 $lgТЦД_{50}$/мл, а после 4-го – 7 $lgТЦД_{50}$/мл. Реизолируемый вирус при восстановлении его из лиофилизированного состояния и смене тест-системы (культура клеток КСТ) повел себя необычно – первый пассаж вируса был „слепым". Для проверки наличия в исследуемом материале вируса культуральная жидкость из всех пассажей была использована для титрования вируса, а культура клеток в иммунологическом планшете после учета результатов титрования была обработана ФИТЦ-конъюгатом и происследована в люминесцентном микроскопе. Результаты проведенных исследований представлены на рисунках 1-2.

Репозиторий ВГАВМ

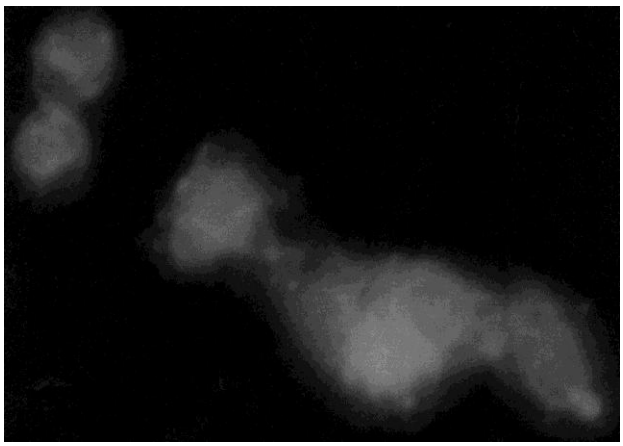

Рис.1. **Внутрицитоплазматическая локализация репродукции вируса ВД**

Рис. 2. **Интенсивная репродукция вируса ВД.**

Заключение. Проводимая in situ РИФ как непосредственно с патологическим материалом, так и с зараженной культурой клеток информативна в том плане, что при ее использовании в зараженных клетках можно выявить локализованный вирус на различных стадиях репродукции. Особенно важно, при этом, обращать внимание на локализацию (место расположения в клетке) вируса: внутриядерная или внутрицитоплазматическая, так как вирусы, относимые к разным таксономическим группам, отличающиеся различной стратегией вирусного генома репродуцируются в различных структурах клетки и эти данные могут быть использованы с целью дифференциальной лабораторной диагностики смешанных или ассоциированных вирусных инфекций. Так, вирусы ВД, ПГ-3, РСИ репродуцируются в цитоплазме, в то время как вирусы ИРТ и АДВ – в ядре. Также с помощью РИФ можно оценить степень (интенсивность) инфицированности конкретного животного или зараженной культуры клеток по количеству клеток в поле зрения с интенсивно зеленой флуоресценцией.

Литература. 1. Будулов Н.П. Респираторные болезни крс в Дагестане.[Текст] : автореф. дис. … докт. вет. наук. : 16.00.03., 16.00.01./ Н.П. Будулов; – Краснодар, 2009. – 48 с. 2. Вирус-бактериальные инфекци в патологии воспроизводства крупного рогатого скота / Н.П. Чечеткина, М.П. Павленко, В.Ф. Макеев и др. // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– Х., 2005.– Вып.92.– С.515 – 521. 3. Гуренко І.А. Змішані форми респіраторних хвороб телят [Текст] : автореф. дис. … канд. вет. наук. : 16.00.03./ І.А. Гуренко; – К, 2002. – 18с. 4. Изучение генитальной вирус (ИРТ)-псевдомонозной инфекции у крупного рогатого скота / Н.П. Чечеткина, С.И. Вовк, В.Ф. Матвеев // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– Х., 2005.– Т.II, Вып.85.– С.1113 – 1117. 5. Красочко П.А. Моно- и ассоциативные вирусные респираторные инфекции крупного рогатого скота (иммунологическая диагностика, профилаткика и терапия) .[Текст] : автореф. дис. … докт. вет. наук. : 16.00.03., / П.А. Красочко; – Минск, 1997. – 35 с. 6. Красочко П.А. Биотехнологические основы конструирования и использования иммунобиологических препаратов для молодняка крупного рогатого скота. [Текст] : автореф. дис. … докт. биол. наук. : 16.00.03., 03.00.23 / П.А. Красочко; – М., 2008. – 52 с. 7. Курконбекова З.Д. Эпизоотическая ситуация по респираторно-кишечным болезням у крс в центральных районах Таджикистана [Текст] : автореф. дис. … канд. вет. наук. : 16.00.03. / З.Д. Курконбекова; – М., 2007. – 23 с. 8.Кучерявенко В.В. методи лабораторної діагностики парагрипу-3 великої рогатої худоби / В.В. Кучерявенко // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– Х., 2009.– Вып.92.– С.262 – 266. 9. Молекулярная диагностика вирус-хламидийных инфекций крупного рогатого скота / В.И. Стеценко, Р.А. Кучерявенко, А.П. Герилович и др. // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– Х., 2007.– Вып.88.– С.245 – 248. 10. Печура Е.В. Особенности управления эпизоотическим процессом при острых респираторных заболеваниях крупного рогатого скота в уральском регионе [Текст] : автореф. дис. … канд. вет. наук. : 16.00.03./ Е.В. Печура; – Екатеринбург, 2007. – 16 с. 11. Применение методов ИФА, РИФ и ПЦР при диагностике смешанных инфекций крупного рогатого скота / Н.П. Чечеткина, Б.Т. Стегний, А.П. Герилович // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– Х., 2007.– Вып.85.– С.263 – 268. 12. Эффективность комплексной системы мероприятий при генитальной форме герпесвирусного 1 заболевания крупного рогатого скота / Н.П. Чечеткина, С.А. Михайлова, Е.И. Компаниец и др. // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– Х., 2005.– Т.I, Вып.85.– С.1118 – 1122.

Статья поступила 25.10.2010г.

УДК 619:597.842.11

ВИРУЛЕНТНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ ЭШЕРИХИЙ

Медведев А.П.
УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»
Юдасин А.М.
УП «Витебская биофабрика»

В статье представлены результаты определения иммуногенности производственных штаммов эшерихий в зависимости от факторов их вирулентности.

The article presents the results of the determination of immunogenicity of production strains of E. coli, depending on factors of their virulence.

Введение. Эшерихиоз (синонимы: колибактериоз, колиэнтерит, колисепсис) – остро протекающая болезнь молодняка животных многих видов, проявляющаяся обезвоживанием организма, энтеритом,

Репозиторий УО ВГАВМ