

ВЕТЕРИНАРНА МІКРОБІОЛОГІЯ, ЕПІЗООТОЛОГІЯ, ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ ТА ІМУНОЛОГІЯ

Гулянич М.М.

аспірант,

*Національний університет біоресурсів
і природокористування України*

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ ВРХ

Інфекційний ринотрахеїт (ІРТ) – контагіозна вірусна хвороба великої рогатої худоби, яка проходить у респіраторній, генітальній, кератокон'юнктивній, нервово-енцефальній або шкірній формах і вражає тварин будь-якої породи, статі та віку.

Лабораторні дослідження відіграють важливу роль у встановленні діагнозу інфекційного захворювання, визначенні імунного статусу стада, проведенні контролю за ефективністю вакцинації. Процес специфічної лабораторної діагностики заснований на виявленні збудника захворювання та виявлення антитіл, утворення яких є відповідною реакцією організму тварини в ході інфекційного процесу.

Лабораторні дослідження включають в себе: а) виділення вірусу з патологічного матеріалу в культурі клітин і його ідентифікація в реакції нейтралізації (РН); б) виявлення антигенів вірусу ІРТ в патологічному матеріалі за допомогою РІФ; в) виявлення специфічних антитіл до вірусу в сироватці крові хворих і перехворілих тварин в РН або РНГА (ретроспективна діагностика) [1]. В даний час велике поширення отримав метод виділення геному вірусу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [2].

Метод виділення вірусу полягає у виявленні цитопатичної дії (ЦПД) вірусу в культурі клітин з його подальшою ідентифікацією.

В якості патологічного матеріалу від хворих тварин беруть змиви зі слизової оболонки носової порожнини, очей, піхви, препуція, а також проби сперми. Від вимушено убитих і загиблих тварин відбирають шматочки носової перегородки, трахеї, гортані,

легень, селезінки, середостіння лімфовузли. Від абортів плодів беруть шматочки паренхіматозних органів і плаценти [3].

Для виділення вірусу можуть бути використані наступні культури клітин: первинно трипсінізована нирка ембріона корови чи вівці, нирки теляти або вівці, тестикули бичка і їх субкультури, а також перещеплювані лінії клітин ПТ-80, ПТ, MDBK, ТР, КГ, ПЕК. При цьому проводять 3 послідовних пасажі вірусу з інтервалом 5-6 діб [1, 3, 4].

Проба вважається негативною, якщо в третьому пасажі не виявляється цитопатичної дії (ЦПД) вірусу. ЦПД вірусу в культурі клітин встановлюється наявністю округлих клітин, що носить на початку вогнищевий, а потім дифузний характер з наступним відділенням уражених клітин від скла [3, 4].

Індикацію вірусу ІРТ проводять також по виявленню специфічних тілець-включень, локалізованих в ядрах клітин епітелію уражених слизових оболонках носової порожнини, вульви, піхви і кон'юнктиви. Вони також виявляються в пофарбованій гематоксилином-еозином культурі клітин через 18-20 годин після його зараження [1, 4].

З метою експрес-діагностики ІРТ застосовують метод ПЛР. Принцип методу полягає в подвоєнні (ампліфікації) ділянки ДНК, обмеженого праймерами, за допомогою ферменту ДНК-полімерази. За кожен наступний цикл ампліфікації відбувається подвоєння як вихідного ділянки ДНК, так і знову синтезованих фрагментів (ампліфіката). У результаті цього число фрагментів зростає в геометричній прогресії (ланцюгова реакція).

Однак, для процесу ампліфікації необхідно, щоб структура праймерів була ідентична (компліментарна) до ділянки вихідної ДНК. Якщо цього не відбувається (відсутня специфічна ДНК), то подвоєння ДНК не відбувається. Якщо в розчині не виявиться жодної молекули ДНК з ділянкою, комплементарною праймерам, то ПЛР не запуститься, навіть не дивлячись на те, що в розчині буде мільйон інших молекул ДНК. Цим і обумовлюється висока специфічність методу ПЛР [5].

Одним з недоліків методу є те, що для ампліфікації можна використовувати різні ділянки геному збудника. Однак у випадку різних мутацій вірусу можлива зміна або втрата генів. Це призводить до різних результатів при використанні тест систем різних виробників.

Ідентифікують вірус за допомогою реакції нейтралізації (РН) в культурі клітин. Суть методу полягає в нейтралізуючій дії антитіл специфічної гіперімунної сироватки, яка нейтралізує здатність вірусу викликати ЦПД в культурі клітин. Для оцінки результатів реакції визначають титр вірусу в присутності негативної і специфічної сироватки за методом Ріда і Менча або Кербера, який виражається у $\text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Різниця в титрах вірусу з негативною і специфічною сироватками не менше ніж на 2 логарифма свідчить про належність збудника до вірусу бичачого герпесу типу 1. При різниці від 1 до 2 логарифмів реакцію вважають сумнівною, і її необхідно повторити. При різниці менше 1 логарифма реакцію вважають негативною [3, 6].

Крім РН в культурі клітин для серологічної ідентифікації вірусу ІРТ застосовуються також методи РНГА, РДП, РГГА, ІФА, ІФА з використанням моноклональних АТ і алергічна проба [2, 7, 8, 9].

Всі вищевказані методи знайшли широке застосування для серодіагностики і ретроспективної діагностики ІРТ ВРХ, визначення рівня колостральних антитіл в сироватці крові телят, визначення оптимального часу першої вакцинації і контролю результатів вакцинації, проте загально визнаним «золотим стандартом» залишається саме РН.

Визначення рівня антитіл до вірусу ІРТ і постановка попереднього діагнозу є однією з найбільш важливих завдань серологічної діагностики даного захворювання.

Найбільшу діагностичну цінність представляє дослідження парних сироваток, взятих від тварин з проміжком 14-20 днів. Визначення рівня специфічних антитіл у цих сироватках дозволяє встановити роль вірусу в патогенезі хвороби або встановити ефективність проведеної вакцинопрофілактики [1].

В даний час для вирішення цих завдань найбільш часто використовується реакція непрямой гемаглютинації (РНГА), метод імуноферментного аналізу (ІФА) та реакція нейтралізації (РН) або її модифікація – реакція мікронейтралізації (РМН) яка є відносно простим і надійним методом визначення рівня специфічних антитіл до вірусу ІРТ [6, 8, 10, 11].

Список використаних джерел:

1. Сюрин В. Н. Диагностика вирусных болезней животных / В. Н. Сюрин, Р. В. Белоусова, Н. В. Фомина – М.: Агропромиздат, 1991. – 528 с.
2. Кузнецов Д. П. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота: Диагностика на основе современных методов биотехнологии: дис. д-ра биол.

наук: 03.00.23 / Кузнецов Дмитрий Павлович; [ВНИИТИБП]. – Щелково, 2001. – 328 с.

3. Abinanti F. R. The isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from cattle affected with conjunctivitis-observations on the experimental infection / F. R. Abinanti, G. J. Plummer // Amer. J. Vet. Res. – 1961. – Vol. 22. – P. 13-17.

4. Иванова Г. А. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / Г. А. Иванова, Ю. В. Фомин // Лабораторная диагностика вирусных болезней животных. – М., 1972. – С. 101-107.

5. Кузнецов Д. П. Тест-системы для детекции вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота / Д. П. Кузнецов, А. Я. Самуйленко, В. И. Белоусов // Ветеринария – 2002 – № 10. – С. 26-28.

6. Определение вируснейтрализующих антител против вируса инфекционного ринотрахеита в сыворотках крови животных в реакции нейтрализации микрометодов / А. А. Нестеров, В. А. Мищенко, В. В. Думова [и др.] // Материалы Междунар. науч.-практ. «Задачи ветеринарной науки в реализации доктрины продовольственной безопасности РФ». Покров – 2011. – С. 115-120.

7. Диагностика инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота различными серологическими методами / Д. П. Кузнецов [и др.] // Биохимия с.-х. животных и прод. прогр.: тез. докл. Всесоюз. симп., 26–28 сент. 1989 г. – К., 1989. – С. 49.

8. A blocking ELISA with improved sensitivity for the detection of passively acquired maternal antibodies to BHV-1 / H. J. Cho [et al.] // Can. Vet. J. – 2002. – Vol. 43, № 1. – P. 43–45.

9. Кузнецов Д. П. Иммуноферментная диагностика инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота / Д. П. Кузнецов, А. Я. Самуйленко, В. И. Белоусов // Ветеринария – 2002 – № 5 – С. 17-18.

10. Матковская С. Г. Диагностика інфекційного ринотрахеїту-пустульозного вувльвовагініту великої рогатої худоби за показниками антитіл в носовому, піхвовому сектретах та сльозі: автореф. дис. канд. вет. наук: 16.00.03 / Матковская Светлана Григорьевна – Харьков, 1999. – 20 с.

11. Глотов А. Г. Диагностика инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом молекулярного зондирования с использованием гибридной тест-системы / А. Г. Глотов // Методология по профилактике и ликвидации болезней с.-х. животных. – Новосибирск, 1995. – С. 168-171.