

Мандигра С.С.

молодий науковий співробітник;

Музикіна Л.М.

кандидат ветеринарних наук;

Іщенко Л.М.

кандидат ветеринарних наук,

Інститут ветеринарної медицини

Національної академії аграрних наук України

ДИФЕРЕНЦІЙНА ДІАГНОСТИКА АФРИКАНСЬКОЇ ТА КЛАСИЧНОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ МЕТОДОМ ЗТ-ПЛР У РЕЖИМІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ

Африканська чума свиней (АЧС) та класична чума свиней (КЧС) – два транскордонних висококонтагіозних вірусних захворювання свиней, що завдають величезних економічних збитків [1–7]. У разі підозри на спалах чуми свиней, диференційна діагностика АЧС і КЧС є обов'язковою, адже від її результатів залежить подальша стратегія боротьби з хворобою і її профілактика. Так як відрізнити африканську чуму від класичної на основі лише клінічних чи патолого-анатомічних ознак часто неможливо, кінцевий діагноз ставиться на основі лабораторних досліджень. В наш час все частіше для цього використовують молекулярно-генетичні методи [1, 4, 8]. В Інституті ветеринарної медицини НААН розроблено тест-систему на основі дуплексної зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) у режимі реального часу, що дозволяє одночасно в одній пробірці виявляти ДНК вірусу АЧС та РНК вірусу КЧС, сприяючи економії часу, трудових ресурсів та коштів.

Мета дослідження – провести комісійне випробування діагностичного набору для диференційної діагностики АЧС та КЧС методом ЗТ-ПЛР в режимі реального часу за показниками чутливості, специфічності та збіжності.

Для проведення комісійного випробування було підготовлено панель позитивних та негативних щодо АЧС і КЧС зразків; зразків із сторонніми збудниками вірусних хвороб свиней: респіраторно-репродуктивного синдрому свиней (РРСС), цирковірозу свиней 2-го типу (ЦВС-2), хвороби Ауескі; плазмідні ДНК з фрагментом нуклеїнових кислот вірусу АЧС і КЧС ($1,0 \times 10^5$ копій/см³). Виділення ДНК проводили за допомогою комерційного комплексу «РИБО-сорб» (AmpliSens, Росія). Ампліфікацію проводили за допомогою розробленої діагностичної набору «АЧС/КЧС-дуо ПЛР-РЧ» на приладі Rotor-Gene Q (виробник «QIAGEN»). Використовували наступний температурний режим: 50 °С – 30 хв. (зворотна транскрипція); 95 °С – 10 хв.; потім 45 циклів, що включають денатурацію ДНК за 95 °С – 20 с, відпалювання праймерів за 58 °С – 20 с і елонгацію за 72 °С – 30 с. Флуоресценцію вимірюють при 58 °С на каналах FAM, ROX та JOE. Випробування проводили згідно міжнародних вимог [9].

Визначення аналітичної чутливості аналізу проводили шляхом тестування серії 10-кратних розведень двох плазмідних ДНК у DNase-free воді. Детекцією

флуоресценції здійснювали по каналу FAM/Green (ДНК вірусу АЧС) та ROX/Orange (РНК вірусу КЧС). За даними C_t визначали мінімальну концентрацію аналіту. Усі зразки зі значенням $C_t < 40$ вважали позитивними. Встановлено, що довірчий інтервал аналітичної чутливості діагностичного набору за концентрації $1,0 \times 10^5 - 1,0 \times 10^1$ копій/см³ складає 100 % як для вірусу АЧС так і КЧС (див. таблиці 1 і 2). Межа виявлення (LOD) валідованої тест-системи становить 10 копій ДНК вірусу АЧС та 10 копій РНК вірусу КЧС.

Специфічність тест-системи визначали шляхом проведення ампліфікації виділеної з патологічного матеріалу ДНК вірусу АЧС та екстрагованої з крові РНК вірусу КЧС, а також РНК та ДНК вірусів, що викликають подібні з АЧС і КЧС симптоми. Встановлено відсутність хибних результатів і неспецифічних реакцій із сторонніми вірусами. При дослідженні матеріалу, що містив віруси РРСС, ЦВС-2, хвороби Ауескі кривих ампліфікації та значення C_t по каналам FAM/Green та ROX/Orange виявлено не було.

Таблиця 1

Результати дослідження зразків щодо виявлення ДНК вірусу АЧС методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу (оцінка чутливості та збіжності)

№ п/п	Опис зразка	C_{t1} , канал FAM	C_{t2} , канал FAM	C_{t3} , канал FAM	$C_{t_{сер}}$	SD	% CV	% CV _v
1	Суспензія селезінки свині, що містить вірус АЧС	17,81	17,47	18,13	17,80	0,33	1,76	2,81
2	Суспензія лімфовузлів свині, що не містить вірус АЧС	-	-	-	0	0	0	0
3	Плазмідна ДНК із фрагментом гену вірусу АЧС у конц. $1,0 \times 10^5$ копій/см ³	18,30	17,96	18,48	18,25	0,26	1,42	2,74
4	Плазмідна ДНК із фрагментом гену вірусу АЧС у конц. $1,0 \times 10^4$ копій/см ³	21,29	20,89	21,37	21,18	0,26	1,23	2,36
5	Плазмідна ДНК із фрагментом гену вірусу АЧС у конц. $1,0 \times 10^3$ копій/см ³	25,29	24,95	25,42	25,22	0,24	0,95	1,98
6	Плазмідна ДНК із фрагментом гену вірусу АЧС у конц. $1,0 \times 10^2$ копій/см ³	29,57	29,32	29,88	29,59	0,28	0,95	1,69
7	Плазмідна ДНК із фрагментом гену вірусу АЧС у конц. $1,0 \times 10^1$ копій/см ³	33,05	32,76	33,21	33,01	0,23	0,70	1,51

З метою оцінки збіжності результатів, отримуваних при застосуванні діагностичного набору, дослідження всіх зразків було проведено в трьох повторах. Як видно із представлених результатів в таблицях 1 і 2, валідоване значення стандартного відхилення (SD) по каналам FAM/Green та ROX/Orange в наших дослідах було нижче від максимально допустимого рівня прийнятного значення стандартного відхилення для методу ($SD \leq 0,5$).

Значення коефіцієнту варіації (% CV) при постановці досліду також було нижче від прийнятного значення коефіцієнту варіації для методу (CV_v). Отримані дані свідчать про високу збіжність результатів якісного виявлення ДНК вірусу АЧС та РНК вірусу КЧС.

Таблиця 2

**Результати дослідження зразків щодо виявлення кДНК вірусу КЧС
методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу (оцінка чутливості та збіжності)**

№ п/п	Опис зразка	Ct ₁ , канал FAM	Ct ₂ , канал FAM	Ct ₃ , канал FAM	Ct _{сеп}	% SD	% CV	% CV _v
1	Кров свині, що містить вірус КЧС	31,61	31,24	31,87	31,57	0,32	1,01	1,58
2	Кров свині, що не містить вірус КЧС	-	-	-	0	0	0	0
3	Плазмідна ДНК із фрагментом гену вірусу АЧС у конц. $1,0 \times 10^5$ копій/см ³	16,94	16,71	17,22	16,96	0,26	1,53	2,95
4	Плазмідна ДНК із фрагментом гену вірусу АЧС у конц. $1,0 \times 10^4$ копій/см ³	20,94	20,69	21,30	20,98	0,31	1,48	2,38
5	Плазмідна ДНК із фрагментом гену вірусу АЧС у конц. $1,0 \times 10^3$ копій/см ³	24,05	23,86	24,37	24,09	0,26	1,08	2,08
6	Плазмідна ДНК із фрагментом гену вірусу АЧС у конц. $1,0 \times 10^2$ копій/см ³	27,54	27,28	27,92	27,58	0,32	1,16	1,81
7	Плазмідна ДНК із фрагментом гену вірусу АЧС у конц. $1,0 \times 10^1$ копій/см ³	31,80	31,55	32,20	31,85	0,33	1,04	1,57

Висновки.

1. Довірчий інтервал аналітичної чутливості діагностичного набору за концентрації $1,0 \times 10^5$ – $1,0 \times 10^1$ копій/см³ становить 100 %. Межа виявлення складає 10 копій ДНК вірусу АЧС та 10 копій кДНК вірусу КЧС.

2. Специфічність діагностикуму складає 100%. Встановлена відсутність хибних результатів і неспецифічних реакцій зі штамми сторонніх вірусів.

3. Встановлено високу відтворюваність результатів при застосуванні діагностичного набору за дослідження проб у трьох повторах, яка відповідала прийнятному значенню стандартного відхилення для методу ($SD \leq 0,5$). При виявленні ДНК вірусу АЧС та кДНК вірусу КЧС в зразках у трьох повторах статистично значимих розбіжностей результатів не спостерігалось.

Список використаних джерел:

1. African swine fever. OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.8.1. – 2008. – P.1069–1082 – Retrieved from: http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.08.01_ASF.pdf.

2. Інструкція про заходи профілактики та ліквідації класичної чуми свиней, затверджена Головним управлінням ветеринарної медицини з Держветінспекцією Мінсільгосппроду України 15.03.1994 № 5 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/z0056-94>.

3. Інструкція щодо профілактики та боротьби з африканською чумою свиней, затверджена Міністерством аграрної політики та продовольства України 07.03.2017 № 111 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/z0432-17>.

4. Classical swine fever (hog cholera). OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.8.3. – 2014. – 26 p. – Retrieved from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.03_CSF.pdf.

5. African swine fever: a global view of the current challenge / C. Gallardo, A.T. Reoyo, J. Fernández-Pinero, et all // Porcine Health Management. – 2015. – 14 p.

6. Корнієнко Л.С. Африканська чума свиней: історичні аспекти, сучасна епізоотична ситуація в світі й в Україні, імунітет та перспективи вакцинопрофілактики / Л.С. Корнієнко // Науковий вісник ветеринарної медицини. – Вип.14 (114). – 2014.– С. 5–12.

7. Корнієнко Л.Є. Класична чума свиней: історичні аспекти, сучасна епізоотична ситуація в світі та Україні, імунітет і вакцинопрофілактика / Л. Є. Корнієнко // Науковий вісник ветеринарної медицини. – № 2. – 2015. – С. 5–13.

8. Максимович В. В. Дифференціальна діагностика африканської чуми свиней / В.В. Максимович, С.В. Семенов // Ученые записки УО ВГАВМ. – Т. 52. – Вып. 1. – 2016. – С. 60–67.

9. OIE Validation Guidelines – 3.6.3 “Development and optimisation of Nucleic acid detection assays”. – 2014. – P. 11.

Семенець В.Ю.

студентка;

Маринюк М.О.

асистент,

Національний університет біоресурсів і природокористування України

ДІАГНОСТИКА ПІСЛЯРОДОВОЇ ЕКЛАМПСІЇ СОБАК

Метою даної роботи було вивчення симптомів та перебігу післяродової еклампсії у сук.

Післяродова еклампсія (*Eclampsia puerperalis*) – гостре нервово захворювання, що характеризується раптово наступаючими тоніко-клонічними судомами. Хвороба спостерігається в основному у сук, рідше – у кішок і ще рідше у самок інших видів дрібних тварин [3].

Еклампсія у собак є досить поширеним явищем, яке може виникати як напередодні пологів, так і в післяпологовий період, під час лактації. Близько 85% усіх випадків еклампсії у сук припадає на перші 2 тижня лактації і 15% – на останні дні вагітності [2]. До захворювання схильні суки дрібних і середніх порід (пудель, такса, фокстер'єр, коккер та ін.).

Першою ознакою захворювання є занепокоєння: сука стає збудженою, лякливою, тремтить, скиглить, бігає. Через 15–20 хв. порушується координація рухів, паралізується задня частина тулуба, тварина падає й не може самостійно піднятися. З'являються тоніко-клонічні судоми, які пов'язані з вмістом Кальцію, Натрію, Калію і Фосфору в організмі, коли вони в нормі, тоді м'язові волокна працюють стабільно і скорочуються по команді, а не у вільному порядку. Тварина лежить на боці, шия витягнута, рот розкритий, з нього звисає язик й спостерігають витікання пінистої слини, яку самка конвульсивно заковтує.

Погляд нерухомий, переляканий. Кінцівки витягнуті, помітні їх поштовхоподібні й тремтячі рухи, зумовлені посмикуванням плечової і стегнової мускулатури. Рукою з деяким зусиллям можна зігнути кінцівку в суглобах, але потім вона швидко повертається у вихідне витягнуте положення [2].