

УДК 636.09:616.98:599.731.1:578.82/.83

СИТЮК М.П., канд. вет. наук

Інститут ветеринарної медицини НААН України

E-mail: snp1978@ukr.net

РОЗРОБКА ТА ВИПРОБУВАННЯ ПРИЖИТТЄВОГО СПОСОБУ ВІДБОРУ СЛИНИ ВІД ДИКИХ КАБАНІВ З МЕТОЮ МОЖЛИВОСТІ ПРОВЕДЕННЯ МОНІТОРИНГОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ЗА АФРИКАНСЬКОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ

У статті наведені дані про розробку і випробування прижиттєвого способу відбору слини від диких кабанів з метою можливості проведення моніторингових діагностичних досліджень за африканської чуми свиней. Запропоновані варіанти тканин для утримання принад, види принад, способи їх фіксації. З метою видової ідентифікації представлені дані відносно виявлення методом полімеразної ланцюгової реакції наявності мітохондріальної ДНК диких кабанів у зразках тканин, пошкоджених під час поїдання кабанамі принад.

Ключові слова: дикі кабани, принади, слина, полімеразна ланцюгова реакція, мітохондріальна ДНК.

Постановка проблеми. Традиційно відбір біологічного матеріалу від диких кабанів для вірусологічних і бактеріологічних досліджень проводиться посмертно після відстрілу або загибелі тварин. Такий спосіб є ефективним, оскільки дозволяє під час розтину тварин оцінити патолого-анатомічні зміни і відібрати фрагменти різних органів. Однак цей спосіб має ряд недоліків: потребує певних затрат на проведення організації самого відстрілу і головне призводить до втрати біологічної одиниці (дика тварина), особливо, тоді, коли екологічна ніша не наповнена кількістю тварин тих чи інших видів. Також процес відстрілу сприяє розлякуванню диких свиней, що є передумовою до занесення збудників особливо небезпечних інфекцій – африканської і класичної чуми свиней на нові території.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. На сьогодні на території Східної Європи реєструється особливо небезпечне транскордонне захворювання – африканська чума свиней (АЧС), нозоареал якої постійно розширюється на території Росії та за її межами (Україна – 2012, 2014 рр., Білорусь – 2013 р., Литва – 2014 р., Польща – 2014 р.) [1–4]. Збудник АЧС у 2014 році на територію України, Литви та Польщі був занесений дикими кабанамі-вірусоносіями.

Крім існуючого класичного посмертного способу відбору біологічного матеріалу від диких кабанів, дослідники [5] запропонували так званий, «безконтактний метод» відбору слини у дикого кабана з метою моніторингу АЧС. Автори в експерименті на свійських свинях (після зараження вірусом АЧС) відпрацювали методику виявлення ДНК вірусу у слині методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). З урахуванням цього розробники в експерименті на диких кабанамі апробували прижиттєвий спосіб відбору їх слини, де як адсорбуючий матеріал застосовували зразки жгутів з синтетичного матеріалу і натуральних волокон (бавовна, льон), які обробляли різними смаковими принадами: глюкозою, рослинною олією, водним екстрактом комбікорму, медом, оселедцевим розсоллом. У цих дослідах було показано, що дикі кабани охоче підходять у більшості випадків до жгутів, просочених оселедцевим розсоллом, залишаючи під час жування слину. За результатами цих досліджень автори рекомендують цей метод використовувати для діагностики АЧС.

Мета дослідження – розробити і випробувати дещо відмінний прижиттєвий спосіб відбору слини від диких кабанів із застосуванням інших матеріалів і принад, а також молекулярно-генетично довести належність слини диким кабанам.

Матеріал і методи дослідження. Вибір матеріалу для утримання принад базувався на принципі підбору тканини з бавовни і грубої натуральної тканини (мішківина), які добре поглинають вологу та стійкі до розривів. Були взяті тканини сірого кольору: мішківина, до складу якої входили волокна рослин (джути, канатника, коноплі) і тканину з бавовни. З цих тканин були виготовлені мішечки шириною 30 і висотою 50 см. Всього було виготовлено 18 мішечків: 9 – з мішківини і 9 – з бавовни.

Згідно з даними літератури, як принади [6] використовували ті корми, які найкраще вживають дикі кабани – жолуді та зерно кукурудзи в сухому вигляді і зброджуване. Згідно з даними Michael J. Bodenchuk (Wild Life Services, м. Сан Антоніо, штат Техас, США) [7], зброджену кукурудзу не їдять інші парнокопиті тварини (лось, олень, козуля). В наших дослідах кукурудзу зброджували зволоженням водою за температури +18–20 °С протягом семи діб.

Проведення дослідів відносно випробування способу відбору слини від диких кабанів погоджували з головою Державної ветеринарної і фітосанітарної служби України – лист № 15-9-1-18/414 від 17.01.2013 року і начальником Головного управління ветеринарної медицини у Київській області – лист № 01-04/141 від 31.01.2013 року. Апробацію дослідів проводили на території лісомисливських угідь Броварського району Київської області. Досліди впродовж 2013 року були проведені двічі з метою їх апробації в різні пори року – зимою та влітку.

У першому досліді використано 9 мішечків, виготовлених із тканини бавовни. Три мішечки були с жолудями (3 кг в кожному), три – із сухим зерном кукурудзи і три – зі збродженим зерном кукурудзи (4,5 кг в кожному). Принади фіксували на деревах (сосни, берези) у лісі на відстані 150–200 метрів від доріг і просік, на висоті від поверхні ґрунту 0,5–0,6 метрів кріпленням всієї довжини верхньої частини мішечків шурупами через алюмінієві пластини (4–5 шурупів на один мішечок). Використання шурупів і алюмінієвих пластин сприяло надійній фіксації мішечків і виключало їх зривання під час поїдання принад кабанами. Характер розміщення принад враховували з біологічними особливостями умов харчування стада диких свиней: мішечки фіксували на деревах (один мішечок на дерево) таким чином, щоб всі вони знаходилися недалеко один від одного в діаметрі 10–15 метрів.

У другому досліді також було використано 9 мішечків, однак матеріалом для їх виготовлення слугувала мішкочина, яка виявилася більш міцною відносно розривів порівняно з тканиною бавовни. Місце і характер проведення другого дослідів відповідали першому. Зображення принад та їх розташування наведені на рисунках 1–3.



Рисунок 1. Використання жолудів як принад

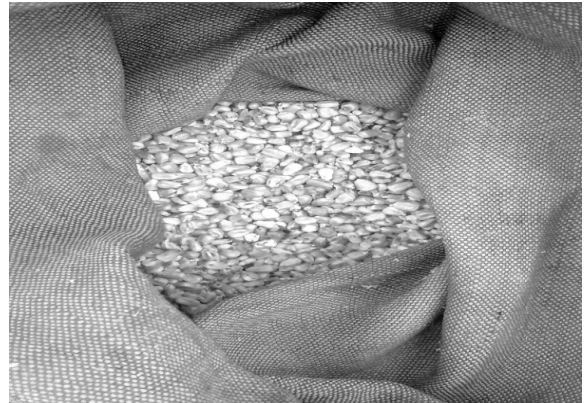


Рисунок 2. Використання зерна кукурудзи як принад

У досліді після поїдання принад за допомогою ножиць відрізували ті частини тканин, де був найбільший її візуальний контакт (пошкодження) із ротовою порожниною кабанів. З кожного мішечка відбирали по 2 зразки тканини розміром від 1,0 до 3,0 см – у окремий стерильний пластиковий посуд (пробірки, флакони), відповідно маркували і поміщали до термосумки із хладагентом. Після відбору зразків залишки мішечків були зняті з дерев. Відібрані зразки доставляли до лабораторії хвороб свиней і біотехнології ІВМ НААН та зберігали за температури –20 °С.

Видову ідентифікацію біологічного матеріалу (слини) у відібраних зразках тканин проводили за допомогою аналізу мітохондріальної ДНК у відділі селекції і генетики Інституту свинарства і агропромислового виробництва Національної академії аграрних наук України. Для цього використовували обладнання для постановки ПЛР і специфічні олігонуклеотидні праймери: прямий МІТPRO2F: CATACAAATATgTgACCCCAAA і зворотний МІТPROR: gTgAgCATgggCTgATTAgTC [8].

Результати дослідження та їх обговорення. Перший дослід проведено у зимовий період із 09.02 до 17.02, другий – влітку – з 09.06 до 21.06.2013 рр.

У першому досліді після розміщення принад впродовж п'яти діб щоденного спостереження поїдання не було відмічено. Лише на 6-ту добу були зареєстровані характерні для кабана сліди (рис. 4) підходу до принад та їх поїдання впродовж 2-х діб. Детальний огляд місця проведення дослідів свідчив про досить легкий доступ кабанів до принад, оскільки тканина бавовни була розірвана без ознак її жування.



Рисунок 3. Фіксація мішечків із принадою на дереві



Рисунок 4. Сліди диких кабанів під час поїдання принад (дослід № 1)

У другому досліді після розміщення принад впродовж 7-ми діб щоденного спостереження не було відмічено їх поїдання. Тільки на 8-му добу зареєстровано підхід кабанів до принад (рис. 5) і поїдання їх упродовж 4-х діб. Ретельне обстеження місця проведення досліді свідчило про нелегкий доступ кабанів до принад, оскільки тканина мішкови́ни на всіх мішечках була пожована з наявністю одного або декількох (2–3) розривів у вигляді смуг довжиною від 5 до 12 см, або дірок розміром від курячого яйця до дитячої голови (рис. 6). У місцях жування тканини остання була схожа на ретельно скуйовджену масу, волокна якої нерівномірно переплетені у різних напрямках (рис. 7–8).



Рисунок 5. Сліди диких кабанів під час поїдання принад



Рисунок 6. Вигляд мішечків через 4 доби після поїдання принад (дослід № 2)



Рисунок 7,8. Місця розриву та жування тканини

Відібрані зразки тканин були передані до лабораторії селекції і генетики Інституту свинарства і АПВ, де видову ідентифікацію біологічного матеріалу (слини) у принадах проводили за допомогою аналізу мітохондріальної ДНК. Результати постановки ПЛР наведені в електрофореграмі (рис. 9).

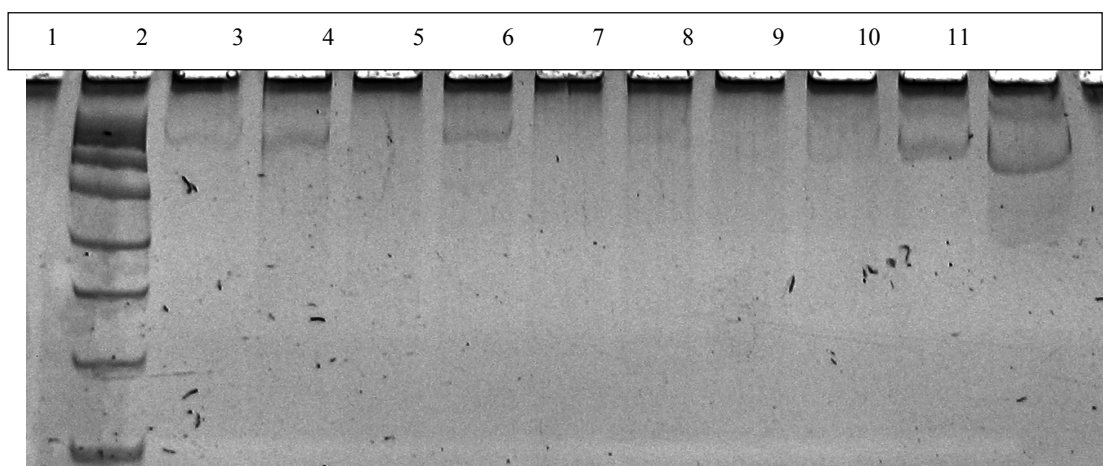


Рисунок 9. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації мітохондріальної ДНК диких кабанів у зразках тканин принад

Примітки: доріжки 2, 3, 5, 7, 9, 10 – зразки, де біологічний матеріал, специфічний для кабанів, присутній; доріжки 4, 6, 8 – зразки, де біологічний матеріал відсутній; доріжка 11 – контрольний зразок (мітохондріальна ДНК свині); доріжка 1 – маркер розміру ДНК *pUC19/MspI*.

Результати рис. 9 свідчать про те, що у шести зразках тканин з дев'яти досліджених було виявлено мітохондріальну ДНК, характерну для виду дикого кабана.

Під час розробки методу прижиттєвого відбору слини від диких кабанів за допомогою принад ми виходили із природних біологічних особливостей харчування цих тварин, обравши при цьому переважно улюблені ними корми – жолуді і кукурудзу. Знаючи, що дикі кабани, як і свійські свині, всеядні тварини, ми не використовували в наших дослідях принади у вигляді оселедцевого розсолу або м'ясного соку з метою виключення приваблення м'ясоїдних тварин (лиси, здичавілі собаки та ін.).

У процесі поїдання принад тварини, розжовуючи і розриваючи тканини мішечків, залишали слину, в якій знаходився відторгнений епітелій ротової порожнини та епітелій шкіри рила. Ми вважаємо, що саме мітохондріальна ДНК епітеліальних клітин була виявлена за постановки ПЛР. Таким чином, необхідно відмітити, що запропонований нами прижиттєвий спосіб одержання слини від диких кабанів з використанням принад є ефективним. Попередній дослід російських дослідників [5], які в якості принади використовували жгути, просочені оселедцевим розсолем, також показав свою ефективність.

Застосування розробленого способу відбору слини від диких кабанів як моніторингові дослідження на африканську чуму свиней, має підґрунтя, оскільки збудник цієї інфекції здатний у патогенезі захворювання накопичуватися та виділятися з усіма секретами та екскретами з організму хворих тварин і вірусоносіїв [9]. Доказом цього є результати [5] виділення вірусу АЧС за експериментального зараження свійської свині та передачі його зі слиною у принаду. Ми звісно ж не проводили досліджень щодо зараження свиней та передачі вірусу АЧС у принади, але, враховуючи дослід російських колег, можна стверджувати, що цей спосіб може бути ефективним у разі моніторингових досліджень диких кабанів щодо АЧС.

Висновки. 1. Розроблено і випробувано спосіб прижиттєвого відбору слини від диких кабанів із застосуванням тканинних мішечків з утриманням принад (жолуді, зерна кукурудзи).

2. Методом полімеразної ланцюгової реакції у складі тканин мішечків виявлено наявність мітохондріальної ДНК, яка характерна для дикого кабана.

Надалі необхідно випробувати цей спосіб у неблагополучних зонах поширення африканської чуми свиней серед диких кабанів з метою моніторингових діагностичних досліджень.

Автор статті висловлює глибоку вдячність завідувачу відділу селекції і генетики Інституту свинарства та агропромислового виробництва НААН К.Ф. Почерняєву і співробітникам за надану допомогу у проведенні молекулярно-генетичних досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Experimental transmission of hog cholera virus in pigs / [W. Hermanns, G. Trautwein, H. Meyer, B. Liess] // Zbl. Vet. Med.: B. – 1981. – Vol. 28. – P.669–683.

2. Preparation of african swine fever contingency plans / [M.L. Penrith, V. Guberty, K. Depner, J. Lubroth]. – Rome : FAO Animal production and health. – 2009. – № 8. – 69 p.
3. Good practices for biosecurity in the pig sector / FAO Animal production and health // Rome, 2010. – № 169. – 74 p.
4. Penrith M.L. Review of african swine fever: transmission, spread and control / M.L. Penrith, W. Vosloo // Tydskr. S. Afr. Vet. Ver. – 2009. – № 80. – Vol. 2. – P. 58–62.
5. Бесконтактный метод отбора слюны у дикого кабана при африканской чуме свиней / [А.Ю. Чичикин, И.Х. Газаев, С.Ж. Цыбанов, Д.В. Колбасов] // Ветеринария. – 2012. – № 6. – С. 26–28.
6. Майнхардт Х. Моя жизнь среди кабанов / Хайнц Майнхардт; пер. с нем. А.И.Цыганова; под ред. канд. биол. наук Г.И. Ивановой. – М.: Лесная промышленность, 1983. – 128 с.
7. Боденчук М. Матеріали тренінгу з епізоотології розширеної тематики, щодо моніторингу захворювань, які поширюються з дикої природи для спеціалістів з ветеринарної медицини. – Київ, 15–18 квітня 2013 р.
8. Почерняєв К.Ф. Визначення гаплотипів свиней з використанням методу породоспецифічного ПЛР-ПДРФ мітохондріальної ДНК // Ветеринарна біотехнологія. – 2005. – № 6. – С. 138–143.
9. Эпизоотология и инфекционные болезни сельскохозяйственных животных / [А.А. Конопаткин, И.А. Бакулов, Я.В. Нуйкин и др.]; под ред. А.А. Конопаткина. – М.: Колос, 1984. – С. 351–357.

Разработка и испытание прижизненного способа отбора слюны от диких кабанов с целью возможности проведения мониторинговых исследований при африканской чуме свиней

Н.П. Ситюк

В статье приведены данные о разработке и испытании прижизненного способа отбора слюны от диких кабанов с целью возможности проведения мониторинговых диагностических исследований при африканской чуме свиней. Предложены варианты тканей для содержания приманок, виды приманок, способ их фиксации. С целью видовой идентификации представлены данные относительно выявления методом полимеразной цепной реакции наличия митохондриальной ДНК диких кабанов в образцах тканей, поврежденных при поедании кабаном приманок.

Ключевые слова: дикие кабаны, приманки, слюна, полимеразная цепная реакция, митохондриальная ДНК.