

Препарат «БЮХЛОР» може застосовуватись для проведення профілактичної та вимушеної дезінфекції приміщень у благополучних і неблагополучних щодо туберкульозу великої рогатої худоби господарствах у вигляді 3 % водного розчину, виготовленого в день проведення дезінфекції, за умови експозиції від 24 до 48 годин із розрахунку від 800 до 1000 см³/м².

Список літератури

1. Аржаков, В.Н. Эпизоотологические и методологические подходы к оценке и направленному поиску новых средств дезинфекции и их композиций [Текст]: автореф. дис... д-ра вет. наук / В.Н. Аржаков; ВНИИБТЖ. — Новосибирск, 2002. — 35 с. 2. Березнёв, А.П. Дезинфекция животноводческих помещений при туберкулёзе [Текст] / А.П. Березнёв, В.Ф. Бричко // Ветеринария. — 1990. — № 6. — С. 20-22. 3. Высоцкий, А.Э. Бактерицидное действие растворов Витана и Глютекса на высокоустойчивых возбудителей [Текст] / А.Э. Высоцкий // Вет. медицина: міжвід. темат. наук. зб. — Х., 2003. — Вип. 82. — С. 132-135. 4. Гудзь, О.В. Современные подходы к применению хлорактивных дезинфекционных средств в учреждениях здравоохранения / [Текст] О.В. Гудзь // Провизор. — 2001. — № 11. С. 63-69. 5. Ефективність застосування Хлорантоїну для вологої та аерозольної дезінфекції / [Текст] М.В. Косенко [та ін.] // Вет. медицина України. — 1997. — № 7. — С. 36-37. 6. Методичні рекомендації з визначення бактерицидної дії дезінфектантів, перспективних для знешкодження збудників туберкульозу в доквіллі [Текст] / Ю.Я. Кассіч, А.І. [та ін.] // Вет. медицина України. — 2003. — № 11. — С. 43-44.

BACTERICIDAL ACTIVITY OF DISINFECTANT «BIOCHLOR» CONCERNING MYCOBACTERIA

Degtyaryov I. M.

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

Results of investigations at study of bactericidal properties concerning mycobacteria of chlorinated disinfectant “BIOCHLOR” are presented in the paper. The experiments were carried out according to existing of methodological aspects with use as atypical mycobacteria and agents of a tuberculosis M. bovis and M. avium. As a result of carried out investigations optimum usage modes of disinfectant «BIOCHLOR» at a tubercular infection were established.

УДК 619:616.921.5:636.5

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ H5N1 В ОРГАНИЗМЕ ИНФИЦИРОВАННЫХ КУР

Дёмина О. К., Сергеев А. А., Агафонов А.П., Сергеев А.А.,
Шиков А.Н., Дроздов И.Г.

ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор», п. Кольцово

Целью работы являлось изучение динамики распространения и тканевого тропизма вируса гриппа птиц (ВГП) в организме кур при интраназальном инфицировании.

В настоящее время существует множество работ, посвященных изучению патогенеза гриппа птиц в организме различных видов дикой и до-

машней птицы, однако эти исследования носят фрагментарный характер, т.е. либо в работах используют ограниченное число органов (легкие, кишечник, мозг), либо представлена информация о накоплении патогена, как правило, на одну временную точку [5, 8, 10]. Также зачастую в ряде научных публикаций для определения концентрации вируса гриппа птиц (ВГП) в органах используют ПЦР в режиме реального времени или иммуноферментный анализ, однако остается неизученной зависимость между значениями концентраций, измеренными с помощью методов титрования с использованием живых систем и метода ПЦР в реальном времени [8]. В научных работах по изучению патологической картины заболевания, вызванного ВГП, в организме дикой и домашней птицы в основном приводятся данные о поражении таких органов как сердце, мозг, почки, легкие, поджелудочная железа. На сегодняшний день остается малоизученным вопрос о первичных и вторичных органах мишенях для вируса гриппа птиц и степени участия этих органов в развитии инфекционного процесса в организме кур, а также вопрос о распространении вируса в организме. [10, 11].

В связи с этим целью работы являлось изучение динамики распространения и тканевого тропизма вируса гриппа птиц в организме кур при интраназальном инфицировании.

Материалы и методы. Вирус. В работе использовали штамм ВГП A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1), полученный из коллекции микроорганизмов ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, выделенный во время эпизоотии гриппа птиц в Курганской области. Штамм с момента его выделения был трехкратно пассирован в 9-и суточных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Биоконцентрация используемого в работе штамма в составе вирус-аллантоисной жидкости (ВАЖ), составляла $8,5 \pm 0,3 \lg 50$ % эмбриональных инфицирующих доз в 1 мл (ЭИД₅₀/мл). ВАЖ до использования в эксперименте хранили при температуре -70 °С.

Животные. В исследованиях использовали кур кросса Хайсекс Браун генетической линии Род-айленд массой 280-320 г, полученных от Новосибирской птицефабрики. Животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [4].

Инфицирование кур. Заражение кур проводили интраназальным способом с применением седативных средств традиционным методом, вводя каждому животному по 0,2 мл вирус-аллантоисной жидкости, содержащей 10-100 ЛД₅₀ для этого вида животных.

Определение накопления вируса в органах. Концентрацию жизнеспособного вируса в образцах гомогенатов органов и сыворотке крови животных проводили методом титрования на РКЭ с последующей регистрацией вируса в реакции гемагглютинации [3]. Для этого образцы органов (стенки носовой полости, трахея, легкие, пищевод, желудок, тонкий и толстый кишечник, печень, поджелудочная железа, почка,

клоака, селезенка, головной мозг, поперечнополосатая мышечная ткань) и сыворотки крови интраназально инфицированных кур отбирали через 1, 18, 30, 42 и 54 часа после заражения (п.з.), от 3-х животных на каждую временную точку, умерщвленных методом цервикальной дислокации. Образцы органов животных дезинтегрировали механическим способом с помощью речного песка в ступке с пестиком для получения гомогенатов.

Кроме того некоторые образцы гомогенатов органов были исследованы с целью определения концентрации вируса с помощью метода обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени. РНК из образцов гомогенатов органов выделяли методом нуклеосорбции на силикагеле с использованием набора «РИБО-сорб» (производитель - ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации проводили с наборами реагентов «Реверта-L» и «АмплиСенс Influenza virus A H5N1-FL» (производитель - ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора) в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР и детекцию продуктов амплификации в режиме реального времени производили в аппарате «Rotor-Gene 6000» (производитель – Corbett Research, Австралия). Стандартные образцы были получены из ВАЖ с концентрацией вируса гриппа $8,5 \pm 0,3 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, из которой были приготовлены разведения. Из образцов разведений была выделена РНК, синтезирована кДНК и проведена ПЦР с учетом накопления продуктов реакции в режиме реального времени.

Статистическая обработка результатов. Для вычисления значений концентрации вируса гриппа в образцах гомогенатов органов в ЭИД_{50} и их сравнения, использовали метод Спирмена-Кербера [12]. Корреляционный анализ значений концентраций вируса при использовании двух методов измерения проводили стандартным методом [12].

Результаты работы. На первом этапе были проведены исследования по изучению динамики распространения ВГП в организме кур при их интраназальном инфицировании дозой 10-100 ЛД₅₀ для этого вида животных. Результаты этих исследований представлены в таблице 1.

Отмечено, что первичным органом-мишенью размножения ВГП в организме интраназально зараженных кур является слизистая носовой полости, где возбудитель заболевания появляется через 18 часов п. з. и достигает максимальной концентрации к 54 часам п. з. Позднее, а именно, через 30 часов п. з. патоген начинает регистрироваться в легких, клоаке и сыворотке крови, и к 54 часам п.з. достигает максимальных концентраций. Также в этот период времени в легких наблюдается самые высокие концентрации вируса по сравнению с таковыми в других органах и сыворотке крови кур. Через 42 часа п. з. ВГП обнаруживается практически во всех органах кур. Обращает на себя внимание также тот факт, что к 54 часам п. з. вирус достигает самых высоких концентраций в почках, кишечнике, печени, селезенке и головном мозге.

Таблица 1 – Динамика распространения вируса гриппа птиц А/Н5N1 (штамм А/Сhicken/Kurgan/05/2005) у кур при интраназальном заражении 10-100 ЛД₅₀

№ n/n	Вид органов и тканей	Концентрация ВГП в органах кур [lg ЭИД ₅₀ /г(мл)] через разные временные промежутки после инфицирования:											
		1 ч		18 ч		30 ч		42 ч		54 ч			
		M	Sm	M	Sm	M	Sm	M	Sm	M	Sm	M	Sm
1	Стенки носовой полости	<0,20	-	0,43	0,27	1,60	0,21	3,15	0,29	5,80	0,17		
2	Легкие	<0,20	-	<0,20	-	1,39	0,28	4,01	0,27	7,76	0,30		
3	Клоака	<0,20	-	<0,20	-	1,05	0,22	2,17	0,27	6,39	0,27		
4	Сыворотка крови	<0,20	-	<0,20	-	0,70	0,17	1,50	0,24	7,20	0,21		
5	Почка	<0,20	-	<0,20	-	<0,20	-	4,33	0,27	7,07	0,29		
6	Кишечник (тонкий и толстый)	<0,20	-	<0,20	-	<0,20	-	1,97	0,28	6,07	0,22		
7	Печень	<0,20	-	<0,20	-	<0,20	-	3,27	0,22	5,98	0,27		
8	Селезенка	<0,2	-	<0,20	-	<0,20	-	4,24	0,21	5,80	0,15		
9	Головной мозг	<0,20	-	<0,20	-	<0,20	-	3,67	0,21	5,66	0,27		
10	Желудок	<0,20	-	<0,20	-	<0,20	-	2,54	0,28	5,47	0,22		
11	Поперечнополосатая мышечная ткань	<0,20	-	<0,20	-	<0,20	-	1,85	-	4,69	0,17		
12	Трахея	<0,20	-	<0,20	-	<0,20	-	1,47	0,27	3,66	0,17		
13	Пищевод	<0,20	-	<0,20	-	<0,20	-	2,00	0,30	3,57	0,27		
14	Поджелудочная железа	<0,20	-	<0,20	-	<0,20	-	<0,20	-	0,62	0,21		

Примечание: «M» – средняя концентрация вируса в грамме органа или миллилитре сыворотки крови; «Sm» – стандартное отклонение (коэффициент Стьюдента для оценки 95%-го доверительных интервалов для всех величин составляет 1,96); «0,20» – величина в lg ЭИД₅₀/г(мл) чувствительности использованного метода титрования вируса; «<>» – величина не определена.

На следующем этапе нами были проведены исследования, связанные с изучением возможности использования метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для определения динамики накопления ВГП во внутренних органах интраназально инфицированных животных. В качестве стандартных образцов были отобраны препараты кДНК, полученные из разведений ВАЖ с концентрациями вируса 5,5 и 1,5 lg ЭИД₅₀/мл. Результаты определения концентраций ВГП в гомогенатах органов с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Данные концентраций вируса гриппа птиц (ВГП) в органах и сыворотке крови интраназально инфицированных кур, оцененные с помощью методов ПЦР и титрования на РКЭ

<i>Вид органа (время после заражения, часы)</i>	<i>Средняя концентрация ВГП в различных органах интраназально инфицированных кур, оцененная разными методами:</i>	
	<i>титрование на КЭ, lg ЭИД₅₀/мл</i>	<i>ПЦР, lg копий РНК/мл</i>
Стенки носовой полости (42)	3,7	3,8
Стенки носовой полости (54)	6,3	6,2
Легкие (30)	1,2	4,0
Легкие (54)	7,2	6,5
Трахея (54)	4,3	5,2
Сыворотка крови (30)	0,7	0,0
Сыворотка крови (54)	7,2	7,2
Мозг (42)	3,7	4,8
Мышца (42)	1,8	3,2
Мышца (54)	4,8	5,8
Кишечник (42)	2,2	2,0
Кишечник (54)	6,3	6,0
Селезенка (42)	4,2	3,2
Селезенка (54)	5,9	6,1
Желудок (54)	5,8	6,2

Корреляционный анализ значений показателей концентраций вируса, измеренных двумя разными методами, свидетельствует о наличии зависимости между значениями (коэффициент корреляции $r=0,89$), что свидетельствует о высокой степени корреляции между полученными результатами.

Выводы и перспективы дальнейших исследований. В результате проведенных исследований установили, что у интраназально инфицированных кур первичным органом-мишенью для ВГП (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) можно считать слизистую полости носа, что полностью

подтверждается ранее полученными данными аналогичного эксперимента с использованием другого штамма ВГП: A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 [2]. Появление вируса одновременно через 30 часов п. з. в крови, легких и клоаке свидетельствует о том, что его проникновение в эти органы происходит, скорее всего, гематогенным путем из слизистой носа, например через фенестрированный эндотелий кровеносных сосудов обонятельной области. Более поздняя регистрация вируса в трахее, чем в легких, подтверждает также это предположение и демонстрирует низкий уровень вероятности существования нисходящего способа распространения патогена из носовой полости по дыхательному тракту кур так и по желудочно-кишечному тракту. Самые высокие концентрации вируса обнаружены через 54 часа п. з. в легких кур ($7,8 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{г}$) по сравнению со всеми другими исследованными органами. Это обстоятельство дает основание предполагать, что данный возбудитель потенциально способен выделяться в окружающую среду в виде аэрозоля, что представляет угрозу для других животных, а также людей. К моменту гибели кур (через 54 часа п. з.) в некоторых органах их пищеварительной системы (тонком и толстом кишечнике, печени, желудок) возбудитель заболевания накапливается до высоких концентраций ($5,0-6,1 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{г}$). Вероятно, эти органы инфицированных кур являются одним из источников поступления вируса в каловые массы. Однако более высокий уровень репликации вируса в этот период отмечен в клоаке, которая, несомненно, добавляет в ее содержимое основную массу патогена. В тоже время более высокие концентрации возбудителя заболевания регистрируются в почках ($7,1 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{г}$) по сравнению с таковыми в пищевode, желудке, тонком и толстом кишечнике, печени, поджелудочной железе и клоаке, что дает основание считать, что основной вклад в обсеменение клоакального содержимого инфицированных кур вносит вирус, поступающий в клоаку с мочой.

Наиболее часто в научных исследованиях для идентификации вируса гриппа и определения его концентрации в органах используются молекулярно-биологические методы, в частности коммерческие и лабораторные варианты тест-систем, основанные на ОТ-ПЦР [8] и количественной ПЦР с регистрацией сигнала накопления продуктов амплификации в режиме реального времени [6]. Однако на сегодняшний день не представлено данных в научных публикациях о наличии зависимости между значениями концентрации ВГП, измеренными с помощью методов титрования в РКЭ, и значениями, полученными с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени. По результатам наших исследований была определена высокая степень корреляции (коэффициент корреляции $r=0,89$) между значениями, регистрируемыми двумя методами (титрование в РКЭ и ОТ-ПЦР в режиме реального времени). Соответственно, применение молекулярно-генетического метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени вполне оправдано для изучения накопления ВГП в различных органах интраназально инфицированных кур.

Список литературы

1. Ашмарин, И.П., Воробьев, А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Гос. Издат. Мед. Лит.; 1962. 2. Демина, О.К., Сергеев, А.А., Пьянков, О.В. и др.

Характеризация и оценка биологических свойств штаммов вируса гриппа птиц субтипа H5N1 // Проблемы совершенствования межгосударственного взаимодействия в подготовке к пандемии гриппа: Материалы междунар. научно-практической конф. 9-10 окт. 2008 г., Новосибирск, Россия, С. 116-117. 3. Мейхи, Б. ред. Вирусология. Методы. М.: Мир; 1988. 4. Национальный научно-исследовательский совет. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Вашингтон: Национальная Академия; 1996. 5. Antarasena C., Sirimujalin R., Prommuang P., Blacksell S.D., Promkuntod N., Prommuang P. Tissue tropism of a Thailand strain of high-pathogenicity avian influenza virus (H5N1) in tissues of naturally infected native chickens (*Gallus gallus*), Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and ducks (*Anas spp.*). *Avian Pathol* 2006 Jun; 35(3):250-3. 6. Lee, C.W., Suarez, D.L. Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. *Journal of Virological Methods*. 2004; 119(2): 151-158. 7. Meijer, A., van der Goot, J.A., Koch, G., et al. Oseltamivir reduces transmission, morbidity, and mortality of highly pathogenic avian influenza in chickens. *International Congress Series*. 2004; 1263: 495-498. 8. Pantin-Jackwood, M. J., Swayne, D. E. Pathobiology of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in ducks. *Avian Dis* 2007 Mar; 51 (1 Suppl):250-9. 9. Phipps, L.P., Essen, S.C., Brown, I.H. Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region. *Journal of Virological Methods*. 2004; 122(1): 119-122. 10. Swayne, D.E. Pathobiology of H5N2 Mexican avian influenza virus infections of chickens. *Vet Pathol* 1997 Nov; 34(6):557-567. 11. Swayne, D.E., Beck J.R. (2005). Experimental study to determine if low-pathogenicity and high-pathogenicity avian influenza viruses can be present in chicken breast and thigh meat following intranasal virus inoculation. *Avian Diseases*. 2005; 49(1): 81-85. 12. Заксб Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика; 1976.

STUDY OF THE DYNAMICS OF SPREAD OF AVIAN INFLUENZA (H5N1) VIRUS IN THE ORGANISM OF INFECTED CHICKENS

Demina O.K., Sergeev A.A., Agafonov A.P., Sergeev A.A., Shikov A.N., Drozdov I.G.

State Research Center of Virology and Biotechnology «VECTOR» of the Russian Ministry of Public Health and Medical Industry, Koltsovo

Purpose of the work was to study the dynamics of spread and tissue tropism of avian influenza virus in the organism of chickens during intranasal infection.

УДК:619:636.5:611:616-085.371

ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ МАСИ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ ОРГАНІВ КУРЧАТ ПРИ ІМУНІЗАЦІЇ ПРОТИ ІНФЕКЦІЙНОГО БРОНХІТУ КУРЕЙ

Довганюк А.О.¹

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Дослідженнями маси та індексів маси органів імунітету курчат визначено особливості дії вакцини проти інфекційного бронхіту курей після інтрабрюшального та внутрішньом'язового її введення. Встановлено, що на 6 добу після вакцинації відбувалось зниження маси та індексів маси селезінки і тимусу при обох методах вакцинації, проте на 10 добу спостерігалась їх активізація з наступним незначним зниженням показників маси тимусу і Фабрицієвої бурси на 20 день і вираженим повторним підвищенням як маси,

¹ Науковий керівник — доктор ветеринарних наук, професор, академік НААН України Г.А. Красніков