



Рис. Діалогове вікно програми AmplifX – праймери для детекції генетичного матеріалу вірусу лихоманки Західного Нілу.

З метою видоспецифічної ампліфікації кДНК вірусу лихоманки Західного Нілу розроблені праймерні системи WNV_4 що фланкують ділянку довжиною 186 п.н. і характеризуються високою передбаченою специфічністю детекції та задовільними показниками ПЛР-quality.

Перспективи подальших досліджень. На основі отриманих результатів зі створення видоспецифічних праймерів для виявлення кДНК вірусу лихоманки Західного Нілу в подальшому планується розробка методик з індикації збудника в клінічних зразках за допомогою ПЛР.

Список літератури

- Office international epizootical Terrestrial Code [Electronic resource]. – Access mode : URL: http://www.oie.int/eng/normes/mcode/code2008/en_preface.htm – Title from the screen. 2. Molecular evolution of lineage 2 West Nile virus [Text] / A. R. McMullen [at al.] // J. Gen. Virol. – 2013. – № 94 (PT 2). – P. 318–325. 3. Герілович, А. П. Методологія розрахунку та теоретичної перевірки якості олігонуклеотидів для виявлення нуклеїнових кислот патогенів тварин на основі полімеразної ланцюгової реакції [Текст] / А. П. Герілович // Вет. біотехнологія : бюл. / ІВМ. – 2009. – № 14. – С. 56–69.

BIOINFORMATIC ANALYSIS OF THE WEST NILE VIRUS GENOME AND THE DEVELOPMENT OF OLIGONUCLEOTIDE SYSTEM FOR DETECTION OF THE PATHOGEN

Gerilovych A.P., Stegnyy B.T.

National Scientific Centre «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov

West Nile virus is an emergent RNA-containing virus that is spreading pandemic threat and demonstrates transmissibility. Reservoirs of disease are numerous species of wild migratory birds. Effective risk assessment on the spread of the pathogen and early diagnosis of caused disease require the development of new and emerging products. The article analyzes the genetic material of the virus and the development of oligonucleotides for the detection of viral RNA by PCR. Analysis of West Nile virus genome identified conserved regions and allowed to design oligonucleotide system. Further results of the research will be the basis for the creation of national monitoring of disease.

УДК 619:616.578.2:988.21

ВИЯВЛЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ ВІРУСУ СКАЗУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЗАРАЖЕННІ МИШЕЙ РІЗНИМИ СПОСОБАМИ

Бабкін М.В., Головка М.А., Романенко О.А.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Дерябін О.М.

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

Незважаючи на давню історію досліджень сказу певні питання патогенезу хвороби ще недостатньо вивчені. Відомо, що інкубаційний період може варіювати в значних часових межах від декількох діб до року і більше, але здебільшого становить 3–6 тижнів. Його тривалість залежить від тяжкості поранення та локалізації завданих укусів, ступеня стійкості покусаної тварини, вірулентності та кількості занесеного в рану вірусу. При інфікуванні молодих тварин період інкубації звичайно коротший, ніж у дорослих тварин [1–4].

Відомо, що центральна нервова система є основною мішенню, який вірус сказу інфікує та в якому реплікується. Це пов'язано з тропізмом вірусу. Але є повідомлення про випадки виділення вірусу із крові та органів хворих тварин, що свідчить про те, що на певних етапах розвитку інфекції вірус циркулює в крові. За даними багатьох дослідників найбільша кількість вірусу міститься в довгастому мозку, мозочку, амонових рогах, корі великих півкуль, спинному мозку. Результатом ураження цих областей є подразнення та пошкодження нервових клітин, що зумовлює підвищення збудливості та агресивності, зміну поведінки та супроводжується судомами м'язів. Згодом відбуваються функціональні розлади нервових клітин, що призводить до посиленого виділення слини й паралічів. Вірус виявляють у слинних залозах, витоках з очей, у легенях, нирках, кишечнику, надниркових залозах, серці, печінці, матці та м'язах скелета. Раннє та значне накопичення вірусу виявляють у слинних залозах, які відіграють значну роль у патогенезі та розвитку епізоотичного процесу. Концентрація вірусу в нервових елементах слинних залоз обумовлює інфекційність слини хворих тварин [5–7].

Мета роботи. Вивчення розповсюдження вірусу сказу в організмі лабораторних тварин у динаміці при різних методах зараження. Визначення ефективності цих методів.

Матеріали та методи. Для проведення досліду було сформовано чотири групи мишей по 21 голову. Перед зараженням мишей витримали у двотижневому карантині. Для інфікування використовували тест-штам вірусу сказу CVS з титром $10^{4.3}$ ЛД₅₀/0,03 см³. Кожну групу інфікували різними способами, вели спостереження за ними протягом 21 доби. Першу групу інфікували інтраперитоніально в об'ємі 0,5 см³, другу – інтрацеребрально по 0,03 см³, третю – у носову складку по 0,2 см³, четверту інфікували перорально по 0,2 см³. Проби на дослідження відбирали на 1; 3; 5; 7; 10; 14; 21 добу після інфікування. Для виявлення місця локалізації вірусу при різних способах інфікування для досліджень відбирали три види біологічного матеріалу (слину, кров, мозок).

Слину відбирали за допомогою стерильної зубочистки з ватним тампоном (попередньо автоклавованої), яку поміщали в епіндорф зі 100 мкл деіонізованої води. Кров відбирали об'ємом по 100 мкл із серця та поміщали у епіндорф з 30 мкл цитрату натрію (стабілізатор). Мозок відбирали в стерильний епіндорф. Після відбору всі проби зберігали за температури -70 °С.

Після закінчення досліду проби матеріалу досліджували в ПЛР з використанням тест-системи «RABIES-тест» розробленої в ДНКІБШМ (Р.п. ВВ-00352-06-11).

Результати досліджень. За результатами інтрацеребрального інфікування ми спостерігали загибель мишей на 7 добу, при інфікуванні мишей у носову складку тварини загинули на 10 добу (табл. 1).

Таблиця 1 – Результати вивчення ефективності різних методів зараження мишей вірусом сказу тест-штам CVS

№, з/п	Спосіб інфікування	Патматеріал	Відбір зразків (доба)						
			1	3	5	7	10	14	21
1	Інтраперитоніально	Слина	–	–	–	–	–	–	–
		Кров	–	–	–	–	–	–	–
		Мозок	–	–	+	+	+	+	+
2	Інтрацеребрально	Слина	–	–	–	*			
		Кров	–	+	+	*			
		Мозок	+	+	+	*			
3	У носову складку	Слина	–	–	–	–	*		
		Кров	–	–	–	–	*		
		Мозок	–	+	+	+	*		
4	Перорально	Слина	–	–	–	–	–	–	–
		Кров	+	–	–	–	–	–	–
		Мозок	–	+	+	+	+	+	+

Примітка: «-» – вірусу не виявлено; «+» – виявлено генетичний матеріал вірусу сказу; «*» – 100 % падіж

При інших методах інфікування загибелі дослідних тварин не спостерігали.

При інтраперитонеальному інфікуванні генетичний матеріал вірусу сказу виявляли на 5 добу лише в мозку, в крові генетичного матеріалу вірусу сказу виявлено не було.

При інтрацеребральному інфікуванні вірусний матеріал виявляли в мозку на першу добу, у крові – на третю добу. При інфікуванні в носову складку вірус виявляли в мозку на 3 добу до загибелі тварин, у крові вірус не було виявлено. Також при пероральному інфікуванні вірусний матеріал виявляли в крові на першу добу, у мозку на третю добу. У жодному випадку при різних способах інфікування, у слині вірусного матеріалу виявлено не було.

Результати досліду демонструють, що самими ефективними методами інфікування які викликають загибель лабораторних мишей є інтрацеребральний метод і зараження в носову складку. При цьому, слід відмітити, що клінічні ознаки та результати лабораторних досліджень біологічного матеріалу підтверджують те, що метод інтрацеребрального інфікування є самим ефективним при зараженні мишей.

Висновки. 1. Установлено придатність різних методів для інфікування мишей вірусом сказу тест-штам CVS.

2. Для оцінки імуногенності вакцин найбільше придатним є метод інтрацеребрального зараження мишей.

Список літератури

1. Ботвинкин, А.Д. Обнаружение вируса бешенства в головном мозге и слюнных железах животных с помощью иммуноферментного метода [Текст] / А.Д. Ботвинкин, С.М. Чернов, Л.Я. Грибанова // *Вопр. вирусологии.* – 1987. – № 6. – С. 747–750.
2. Сафиева, Н.В. Зависимость вирулентности уличного вируса бешенства от способа инокуляции [Текст] / Н.В. Сафиева // *Вет. консультант.* – 2004. – № 2(73). – С. 10.
3. Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных [Текст] / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев. – М., 1998. – 928 с.
4. Таршис, М.Г. Бешенство животных [Текст] / М.Г. Таршис, Н.А. Ковалёв, П.П. Кузнецов. – Минск : Ураджай, 1990. – 175 с.
5. Aubert, M.F.A. Sensibilité et fidelite du diagnostic de rage au laboratoire [Text] / M.F.A. Aubert // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* – 1982. – № 5. – P. 369–376.
6. Barrat, J. Experimental diagnosis of rabies. Adaptations to field and tropical conditions [Text] / J. Barrat // *Proceedings of the International Conference on Epidemiology, Control and Prevention of Rabies in Eastern and Southern Africa.* – Lusaka, Zambia, 2–5 June 1992. – P. 72–83.
7. Bourhy, H. Methodes de laboratoire pour le diagnostic de la rage; Methodos de laboratorio para el diagnostics de la rabia; Laboratory methods for rabies diagnosis [Text] / H. Bourhy, P. Sureau // *Commission des Laboratoires de reference et d'Expertise de l'Institute Pasteur.* – Paris, France, 1991. – 197 p.

DETECTION OF GENETIC MATERIAL OF RABIES VIRUS IN EXPERIMENTAL INFECTION OF MICE BY DIFFERENT METHODS

Babkin M.V., Golovko M.A., Romanenko O.A.

State Scientific-Control Institute of Biotechnology and Strains of microorganisms, Kyiv

Deryabin O.M.

Institute of Veterinary Medicine of NAAS, Kyiv

In article results of the study the spread of rabies virus in laboratory animals in the dynamics at different infection methods using molecular genetic methods are presented.

УДК 619:608.3:614.48:637.4:636.082.474

ОБЕСПЕЧЕНИЕ БИОБЕЗОПАСНОСТИ СРЕДЫ ИНКУБАТОРИЯ

Бреславец В.А., Стегний А.Б., Стегний А.А.

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

Верное средство обеспечения биобезопасности среды инкубатория – строгое соблюдение ветеринарно-санитарных правил. В связи с этим на многих современных инкубаторах начали устанавливать системы дезинфекции шкафов, работающих как после их загрузки, так и в процессе инкубации яиц. Например, фирмой «Petersime» специально разработана автоматическая система дезинфекции инкубаторов. При этом, любое агрессивное, жидкое дезинфицирующее средство, будь оно разбавлено или нет, может быть распыленным в инкубаторе через форсунки увлажнения. Система является полностью безопасной для персонала инкубатория, работает самостоятельно, что снижает затраты на обслуживание.

Однако использование таких автоматических систем дезинфекции инкубаторов не сможет полностью защитить эмбрионы от контаминации патогенами. Необходимо строгое соблюдение целого комплекса ветеринарно-санитарных правил: санация помещений и оборудования инкубатория, дезобработка воздуха подаваемого в помещения и удаляемого из них, своевременный автоматический отбор погибших зародышей, дезобработка инкубационных яиц с момента их снесения и до вывода молодняка и ряд других. Перейдем к рассмотрению каждого из них.

Санация помещений и оборудования инкубатория. Для влажной дезинфекции инкубатория обычно используют такие дезинфицирующие средства как виркон С, полидез, бактерицид, виросид, септодор и другие, которые не оказывают негативного воздействия на дальнейшую эксплуатацию инкубационных и выводных машин, оборудования и помещений. Однако вместе с тем необходимо знать, что на эффективность дезинфекции влияют следующие факторы: срок контакта, температура, концентрация, рН, совместимость с моющими средствами. Способы и методы использования дезсредств подробно изложены в научно-практических рекомендациях Бордуновой О.Г. и соавт. («Використання дезінфікуючих препаратів у промисловому птахівництві», Суми, 2013).

Следует отметить, что растворы дезинфицирующих средств готовят согласно инструкции к каждому из них. Влажную дезинфекцию проводят в той же последовательности, что и мойку помещений и оборудования после просушки их поверхностей, согласно требованиям действующих нормативно-правовых актов ветмедицины по проведению дезинфекции, дезинвазии, дезинсекции, дератизации, утвержденных в установленном порядке.

После влажной дезинфекции пол, потолок, стены, оборудование должны быть тщательно просушены. Окончательная дезинфекция аэрозолями следующая. Перед осуществлением аэрозольной дезинфекции проводят герметизацию помещений (плотно закрывают окна, двери, вентиляционные и канализационные отверстия). Для аэрозольной дезинфекции помещений и оборудования инкубатория используют различные дезинфицирующие средства, в т.ч. и формалин. Раствор формальдегида (35–38 %-й) для аэрозольной дезинфекции готовят из расчета 20 мл на 1 м³ помещения. Дезинфицирующие средства распыляют с помощью специальных устройств и установок (Ураган, Торнадо и др). Обработанное помещение выдерживают в течение 24 часов. Температура воздуха в помещении во время проведения дезинфекции не должна быть ниже 25 °С, относительная влажность – не менее 65–95 %.

Для нейтрализации формальдегида применяют 25 %-ный раствор аммиака в половинной дозе по отношению к распыленному формалину, срок нейтрализации – не менее одного часа. После нейтрализации помещение проветривают в течение 12 часов. Санация инкубатория должна обеспечить ветеринарно-санитарные условия, соответствующие или максимально приближенные к тем, которые установлены при вводе в эксплуатацию новых помещений.

Текущая санация помещений в период инкубации яиц. Санитарные мероприятия в инкубатории должны предусматривать предупреждение возможного экзогенного проникновения патогенных возбудителей в яйцо (через микротрещины, поры в скорлупе и т.п.). Поэтому для каждого помещения инкубатория должна быть разработана инструкция и график по очистке и санации. Сроки уборки и влажной дезинфекции помещений инкубатория представлены в таблице.

Следует иметь в виду, что в инкубационном зале при наличии в шкафах зародышей кур менее 4 суток, а уток индеек и гусей – менее 6 суток обработку формалином проводить не рекомендуется.

Посетители должны следовать инструкциям по гигиене, как и работники инкубатория. Для профилактики инфицирования птицы в инкубатории необходимо тщательно выполнять следующие технологические, зоогигиенические, ветеринарные и санитарные требования:

- В период вывода дезинфекцию воздушного пространства в выводных шкафах проводить растворами препаратов (полидез, виросид, септодор и других), которые не вызывают гибели зародышей и не портят оборудование. Возможно использование испарений 20–30 % раствора формалина (для этого емкость 20 x 30 см поместить на полу выводного шкафа и наполнить раствором формалина при высоте слоя 8–10 см, режим работы вентилятора – обычный).