

РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ПРИЧИНЫ ПАДЕЖА КРОЛИКОВ

М.А. Ахмеджанов *, Е.Д. Крутская , М.К. Исакеев 

«Кыргызский научно-исследовательский институт ветеринарии
имени Арстанбека Дуйшеева», Кыргызская Республика
maksat.akhmedzhanov@gmail.com

Аннотация: в процессе патогоанатомических вскрытий павших и больных кроликов от неизвестной болезни были отобраны биоматериалы с целью выяснения причины болезни и гибели кроликов. Биоматериалы исследованы на наличие возбудителей пастереллеза, клостридиоза, вирусной геморрагической болезни кроликов (ВГБК). В опыте использованы полимеразная цепная реакция и реакция связывания комплемента, опытным путем установлены, что причина болезни и гибели кроликов является вирус ВГБК.

Ключевые слова: кролики, пастереллез, клостридиоз, вирусная болезнь кроликов

Введение

Такая инфекция как вирусная геморрагическая болезнь кроликов (ВГБК) распространяется невероятно быстро благодаря переносу воздушным путем не только между самими кроликами (контактно), но и их производными продуктами (бесконтактно): не продезинфицированными шкурками и продукцией переработки. Также ВГБК передается через зараженные и необработанные инвентарь, корма, фекалии, транспорт, сточные воды, которые и являются источником инфекции.

ВГБК часто характеризуется бессимптомностью, когда здоровая с виду особь умирает без признаков болезни, иногда с криками. Не подвержены инфекции кролики в возрасте менее 1 месяца. Наиболее вероятным к инфицированию является возраст 2 месяца – 6 лет. Важная группа риска – лактирующие и сукрольные самки.

Для ВГБК характерная симптоматика отсутствует. При геморрагической болезни кроликов могут проявляться симптомы самых разных болезней, выражаясь в следующем: повышенной температуре; затрудненном дыхании, тахикардии; летаргии; потере аппетита; спазмах; посинении губ, слизистых воспалении век; кровотечениях из носа, рта, ануса, слизистых выделениях; диареи и любых других симптомах.

Вакцинация кроликов позволит их защитить на период от 5-ти до 15-ти месяцев.

За редким исключением (при ВГБК смертность составляет 90 %) кролики могут выздороветь, но останутся переносчиками инфекции. Они также подлежат уничтожению. Тщательно обеззараживаются места содержания, кормления, поения, размножения кроликов; корма, места их хранения, приготовления, инвентарь для кормов и кормления; вода, средства транспортировки, продукты жизнедеятельности кроликов [1].

В последние годы вспышки ВГБК регистрировалась более чем в 40 странах мира, включая многие государства Европы, Северной и Латинской Америки, Африки, Китая, Австралию и другие [2, 3]. В 2019 г. зарегистрированы новые очаги ВГБК на ранее благополучных территориях США, Венесуэлы и Кубы. Первые сообщения о болезни в нашей стране датируются в конце 19 века. Благодаря массовой вакцинации в конце 90-х гг. регистрация болезни в Кыргызской Республике почти прекратилась.

Актуальная задача – выяснение причины падежа кроликов, содержащиеся в условиях изолятора Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии имени Арстанбека Дуйшеева.

Материалы и методы

В ходе экспертизы в работе испытаны 28 проб биологических материалов, отобранных от больных и павших кроликов, также использованы ПЦР наборы для выявления возбудителей пастереллеза и клостридиоза, для выявления антигена вируса ГБК использована РСК.

Постановка тест-систем проводили согласно наставлениям по их применению.

Результаты

От павших животных были отобраны биоматериалы, в дальнейшем приготовлены 20%-ные суспензии из биологических материалов и проведены лабораторные экспертизы.

Биологические материалы гомогенизировали в физиологическом растворе. Затем полученную суспензию 3-хкратно замораживали при минус 30 °С и оттаивали при комнатной температуре. После последнего оттаивания в полученную суспензию центрифугировали при 3000 об/мин в течение 40 мин. Надосадок использовали для постановки серологических и молекулярных методов исследований, таблица 1.

Таблица 1 – Перечень 20%-ной суспензии биологических материалов

№ п/п	Наименование материалов	Объем полученный 20%-ной суспензии (см ³)
Кролик №1, масть черная		
1	Селезенка	5
2	Рубец	5
3	Кишечник	5
4	Печень	5
5	Почки	5
6	Сердца	5
7	Легкие	5
Кролик №2, масть черная		
1	Легкие	5
2	Сердца	5
3	Печень	5
4	Почки	5
5	Селезенка	5
6	Кровь в нативном виде	исходный материал 5 см ³
Кролик №3, масть серая		
1	Печень	5
2	Сердца	5
3	Селезенка	5
4	Трахея	5
5	Легкие	5
Кролик №4		
1	Почки	5
2	Легкие	5
3	Сердца	5
4	Селезенка	5
5	Печень	5
Кролик №5		
1	Почки	5
2	Легкие	5
3	Сердца	5
4	Селезенка	5
5	Печень	5

В дальнейшем биологические материалы исследованы на наличие возбудителей вирусной и бактериальной этиологии.

Биологические материалы в количестве 28 проб были исследованы на наличие возбудителей *Pasteurella multocida* и *Clostridium perfringens*.

Для постановки набора *Vactotype PCR Amplification Kit Pasteurella multocida* использованы ПЦР смеси в следующем составе:

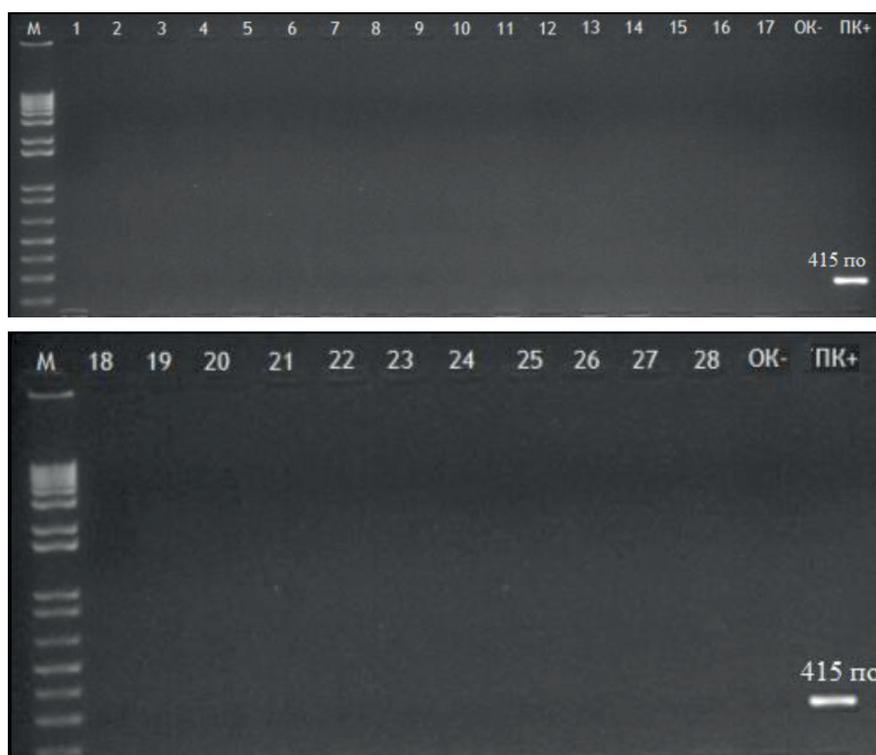
ПЦР смесь: общий объем – 25 мкл

PCR MIX	17 мкл
Magnesium Chloride	4,5 мкл
Nuclease-free Water	0,6 мкл
TaqDNA polymerase	0,4 мкл
DNA	2.5 мкл

Температурно-временные режимы:

пре-денатурация: 94 °С – 3 минут	} 35 циклов
денатурация: 94 °С – 30 секунд	
отжиг: 60 °С – 30 секунд	
элонгация: 72 °С – 30 секунд	
пост-репликация: 72 °С – 5 минут 4 °С – ∞	

Результаты представлены на рисунке 1.



Примечания: биоматериалы от кролика №1, 1 – селезенка, 2 – рубец, 3 – кишечник, 4 – печень, 5 – почки, 6 – сердце, 7 – легкие; от кролика №2, 8 – легкие, 9 – сердце, 10 – печень, 11 – почки, 12 – селезенка, 13 – кровь; от кролика №3, 14 – печень, 15 – сердце, 16 – селезенка, 17 – трахея, 18 – легкие; от кролика №4, 19 – почки, 20 – легкие, 21 – сердце, 22 – селезенка, 23 – печень; от кролика №5, 24 – почки, 25 – легкие, 26 – сердце, 27 – селезенка, 28 – печень.

Рисунок 1 – Результаты исследований биоматериалов на наличие возбудителя *Pasteurella multocida* в ПЦР

В результате в биологических материалах возбудитель *Pasteurella multocida* не выявлен. Также пробы биологических материалов исследованы на наличие возбудителя *Clostridium perfringens* с помощью набора *Bactotype PCR Amplification Kit Clostridium perfringens*, рисунок 2.

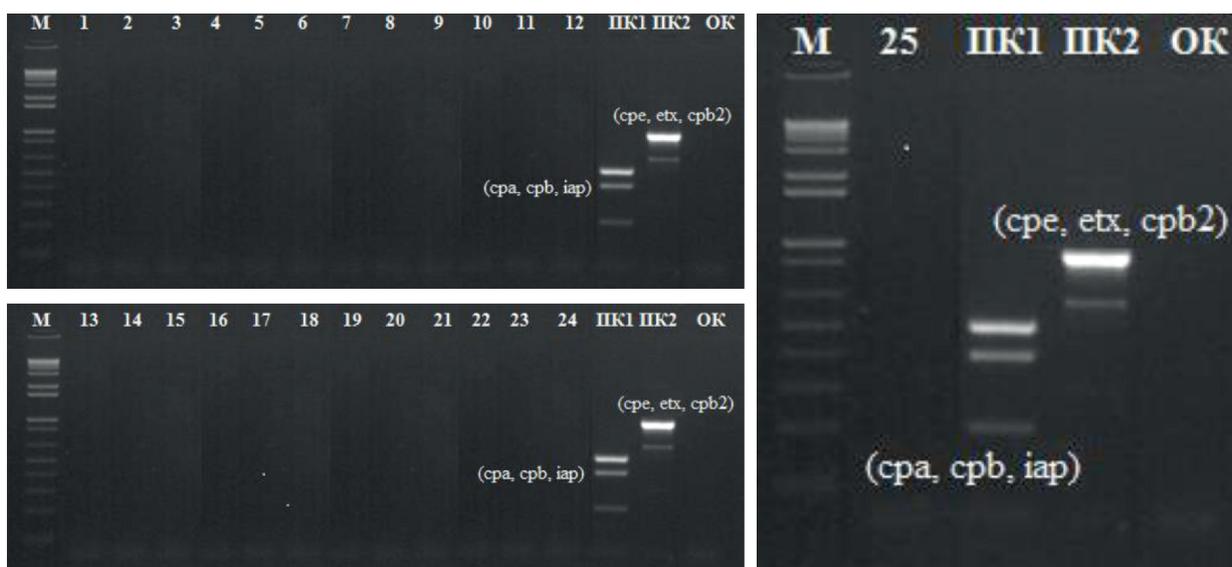
Для постановки применены нижеследующие параметры постановки ПЦР.

ПЦР смесь: общий объем – 25 мкл

PCR MIX	17 мкл
Magnesium Chloride	4,5 мкл
Nuclease-free Water	0,6 мкл
TaqDNA polymerase	0,4 мкл
DNA	2.5 мкл

Температурно-временной режим:

пре-денатурация: 94 °С – 3 минут	} 35 циклов
денатурация: 94 °С – 1 мин	
отжиг: 55 °С – 1 мин	
элонгация: 72 °С – 1 мин	
пост-репликация: 72 °С – 5 минут	
4 °С – ∞	



Примечания: биоматериалы от кролика №1, 1 – селезенка, 2 – печень, 3 – почки, 4 – сердце, 5 – легкие; от кролика 6 – легкие, 7 – сердце, 8 – печень, 9 – почки, 10 – селезенка; от кролика 11 – печень, 12 – сердце, 13 – селезенка, 14 – трахея, 15 – легкие; от кролика 16 – почки, 17 – легкие, 18 – сердце, 19 – селезенка, 20 – печень; от кролика 21 – почки, 22 – легкие, 23 – сердце, 24 – селезенка, 25 – печень.

Рисунок 2 – Результаты исследований биоматериалов на наличие возбудителя *Clostridium perfringens* в ПЦР.

С помощью ПЦР теста в 25 пробах биологического материала возбудитель *Clostridium perfringens* не выявлен.

Биологические материалы также были исследованы ПЦР в реальном времени для выявления возбудителя *Pasteurella multocida*, рисунок 3 и таблица 2. Для постановки ПЦР-РВ использованы нижеследующие параметры.

ПЦР смесь: общий объем – 20 мкл

10xбуфер (MgCl ₂)	2 мкл
dNTP	0,5 мкл
Праймер PF	0,5 мкл
Праймер PR	0,5 мкл
Проба 23	0,5 мкл
TaqDNA polymerase	0,5 мкл
Вода бидистиллированная	13,5 мкл
ДНК	2 мкл

Температурно-временной режим:

2 минут	95 °С	40 циклов на канале green
5 секунд	95 °С	
5 секунд	55 °С детекция	
5 секунд	72 °С	

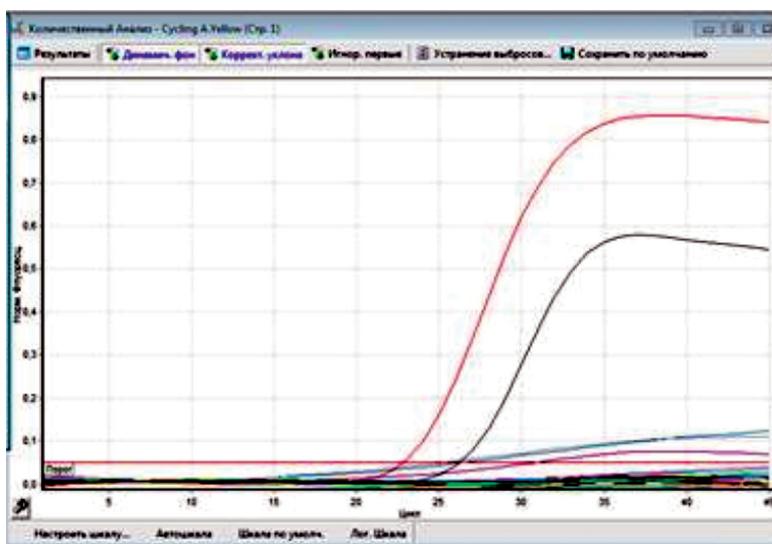


Рисунок 3 – Результаты ПЦР-РВ на наличие возбудителя *Pasteurella multocida*

Таблица 2 – Результаты ПЦР-РВ по выявлению возбудителя *Pasteurella multocida*

№ проб	Цвет	Имя	Тип	СТ	Сред. Ст
1		Селезенка от кролика №1	Образец		
2		Печень от кролика №1	Образец		
3		Сердца от кролика №1	Образец		
4		Легкие от кролика №1	Образец		
5		Легкие от кролика №2	Образец		
6		Печень от кролика №2	Образец		
7		Селезенка от кролика №2	Образец		
8		Печень от кролика №3	Образец		
9		Сердце от кролика №3	Образец		
10		Селезенка от кролика №3	Образец		
11		Трахея от кролика №3	Образец		
12		Легкие от кролика №3	Образец		
13		Почки от кролика №4	Образец		
14		Легкие от кролика №4	Образец		
15		Сердце от кролика №4	Образец		
16		Селезенка от кролика №4	Образец		
17		Печень от кролика №4	Образец		
18		Почки от кролика №5	Образец		
19		Легкие от кролика №5	Образец		
20		Сердце от кролика №5	Образец		
21		Селезенка от кролика №5	Образец		
22		Печень от кролика №5	Образец		
23		ОК	Образец		
24		ПК	Образец	26,26	26,26
25		К-	Образец		
26		К+	Образец	22,84	22,84

В исследованных 22 пробах возбудитель *Pasteurella multocida* не выявлен.

Исследование биологических материалов на наличие антигена вируса ВГБК.

Постановка РСК для выявления антигена вируса ГБК

Для обнаружения антигена вируса ГБК из исследуемых биологических материалов в РСК проверяли со сывороткой специфической (СС) и сывороткой нормальной (СН).

28 проб биологического материала и контрольные препараты – антиген специфический (АнС) и антиген нормальный (АнН) исследовали в разведениях 1:8, 1:16, 1:32, 1:64. Для постановки РСК использовали СС и СН, которые брали в рабочем титре, указанном на

этикетке препарата. Все разведения антигенов и сывороток делали на физиологическом растворе.

В реакции использовали 2 гемолитические единицы комплемента, которые определяли в предварительном титровании. Гемолизин использовали в учетверенном титре в смеси с равным объемом 2,5%-ной взвеси эритроцитов барана (гемолитическая система).

Все компоненты реакции использовали в объеме 0,1 см³. Общий объем смеси реакции составил 0,5 см³.

Сыворотки, используемые в реакции, предварительно разводили и прогревали в водяной бане при температуре (60±1) °С в течение 40 мин. Фазу связывания комплемента проводили в холодильнике при (4±1) °С в течение (16-18) ч, фазу гемолиза – в термостате при (37±1) °С в течение 30 мин.

Результаты реакции начинали учитывать с контроля, при этом в пробирках, содержащих контрольный АнН с СН и СС, без них, должен наступить полный гемолиз эритроцитов.

Задержка гемолиза должна быть в пробирках, содержащих контрольный АнС и СС.

Реакцию считали положительной, если испытуемый патологический материал в разведении 1:8 и выше со СС вызывали задержку гемолиза эритроцитов на 3-4 креста при полном гемолизе эритроцитов в аналогичных разведениях испытуемых проб в смеси с СН и физиологическим раствором. За титр антигена принимали наибольшее разведение материала, дающее задержку гемолиза на 3-4 креста с соответствующими специфическими компонентами реакции.

Используя вышеуказанных диагностических препаратов, была поставлена РСК для выявления антигена ВГБК, результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты лабораторных исследования биологических материалов, отобранных от павших и вынужденно убитых кроликов в РСК на ВГБК

№ п/п	Наименование материалов	Результат
Кролик №1, масть черная, павший 12.08.2021 года ночью		
1	Селезенка	-
2	Рубец	-
3	Кишечник	-
4	Печень	1:16
5	Почки	1:8
6	Сердце	-
7	Легкие	-
Кролик №2, масть черная вынужденный забой 13.08.2021 года		
8	Легкие	-
9	Сердце	-
10	Печень	-
11	Почки	1:32
12	Селезенка	-
13	Кровь в нативном виде	1:8
Кролик №3, масть серая павший 12.08.2021 года под утро		
14	Печень	1:64
15	Сердце	1:8
16	Селезенка	1:32
17	Трахея	1:8
18	Легкие	1:16

Кролик №4 павший 13.08.2021 года днем		
19	Почки	1:8
20	Легкие	-
21	Сердце	-
22	Селезенка	1:8
23	Печень	1:16
Кролик №5 павший 13.08.2021 года днем		
24	Почки	1:8
25	Легкие	-
26	Сердце	-
27	Селезенка	-
28	Печень	1:16
<i>Примечание – «-» - отрицательный результат</i>		

Таким образом, с помощью РСК из исследованных 28 проб биологического материала в 14 пробах был выявлен антиген вируса ГБК с активностью 1:8-1:64.

Заключение

Проведена экспертиза на биоматериал отобранных от павших и больных кроликов, для этого использованы диагностические наборы против пастереллеза, клостридиоза и вируса ГБК.

Опытным путем установлены, что в 14 пробах из 28 исследованных проб с помощью РСК был выявлен антиген вируса ГБК. Таким образом, причиной болезни и гибели кроликов установлен возбудитель ВГБК.

Литература

- 1 Moss S.R., Turner S.L., Trout R.C., White P.J., Hudson P.J., Desai A., Armesto M., Forrester N.L., Gould E.A. Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus // J. Gen. Virol. – 2002. – P. 2461-2467.
- 2 Tian L., Liao J., Li J., Zhou W., Zhang X., Wang H. Isolation and identification of a non-haemagglutinating strain of rabbit hemorrhagic disease virus from China and sequence analysis for the VP60 Gene // Virus Genes. – 2007. – P.745-752.
- 3 Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office intrrnational des epizooties. – 2008. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual>

References

- 1 Moss S.R., Turner S.L., Trout R.C., White P.J., Hudson P.J., Desai A., Armesto M., Forrester N.L., Gould E.A. Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus // J. Gen. Virol. – 2002. – P. 2461-2467.
- 2 Tian L., Liao J., Li J., Zhou W., Zhang X., Wang H. Isolation and identification of a non-haemagglutinating strain of rabbit hemorrhagic disease virus from China and sequence analysis for the VP60 Gene // Virus Genes. – 2007. – P. 745-752.
- 3 Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office intrrnational des epizooties. – 2008. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual>

ҚОЯНДАРДЫҢ ӨЛУ СЕБЕБІН АНЫҚТАУ БОЙЫНША ЗЕРТХАНАЛЫҚ ЗЕРТТЕУЛЕРДІҢ НӘТИЖЕЛЕРІ

М.А. Ахмеджанов *, Е.Д. Крутская , М.К. Исакеев 

«Арстанбек Дуйшеев атындағы Қырғыз ветеринария ғылыми-зерттеу институты»,
Қырғыз Республикасы

Аннотация: белгісіз індеттен ауырған және өлген қояндардың патологиялық анатомиялық жарып-союдың барысында қояндардың ауруының және өлімінің себебін анықтау мақсатында биоматериалдар алынды. Биоматериалдар пастереллез, кластридиоз, қояндардың вирустық геморрагиялық ауруларының қоздырғыштарының бар-жоғына зерттелді.

Тәжірибеде полимеразды тізбекті реакция және комплементті байланыстыру реакциясы қолданылды, нәтижесінде қояндардың ауруы мен өлуінің себебі қояндардың вирустық геморрагиялық індеті екені тәжірибе жүзінде анықталды.

Түйін сөздер: пастереллез, кластридий, қояндардың вирустық геморрагиялық індеті.

THE RESULTS OF LABORATORY STUDIES TO DETERMINE THE CAUSE OF THE DEATH OF RABBITS

M.A. Akhmedzhanov *, E.D. Krutskaya , M.K. Isakeev 

«Kyrgyz Scientific Research Institute of Veterinary Medicine
named after Arstanbek Duisheyev», Kyrgyz Republic

Abstract: in the process of pathoanatomical autopsy of dead and sick rabbits from an unknown disease, biomaterials were selected in order to determine the cause of the disease and death of rabbits.

Biomaterials were examined for the presence of pathogens of pasteurellosis, clastridium, viral hemorrhagic disease of rabbits.

In the experiment, polymerase chain reaction and complement fixation reaction were used, it was experimentally established that the cause of the disease and death of rabbits is the virus Rabbit Hemorrhagic Disease.

Key words: rabbits, pasteurellosis, clastridium, viral hemorrhagic disease of rabbits.