

УДК: 619:616.

КОЗИНА Є.С., магістрантка

Науковий керівник – ЦАРЕНКО Т.М., канд. вет. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

Liz-z@ukr.net

ДІАГНОСТИКА ВІРУСНОЇ ГЕМОРАГІЧНОЇ ХВОРОБИ КРОЛІВ МЕТОДОМ ПЛР ТА АНАЛІЗ ЕПІЗООТИЧНОГО СТАНУ БІЛОЦЕРКІВСЬКОМУ РАЙОНІ КИЇВСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Вірусна геморагічна хвороба кроликів (ВГХК, RHDV) – це висококонтагіозна хвороба домашніх та диких кроликів, яка викликається каліцивірусом роду *Lagovirus*. В роботі представлені результати апробації методу ПЛР для діагностики ВГХК, досліджено патологічний матеріал від кролів, який походить з Білоцерківського району Київської області. Проаналізовано епізоотичну ситуацію щодо ВГХК у господарствах району. Встановлено ефективність профілактичних заходів.

Ключові слова: ВГХК, RHDV, ПЛР, вірусна геморагічна хвороба, кролі, вакцина.

Вірусна геморагічна хвороба кроликів (некротичний гепатит, геморагічна пневмонія кроликів) – інфекційне захворювання, яке уражає домашніх і диких кроликів старше 1,5 місячного віку і викликає геморагічний діатез органів, особливо страждає печінка [1]. Заражені тварини гинуть вже через 48-72 години, зазвичай, без прояву специфічних клінічних ознак. Збудник ВГХК – РНК-вмісний вірус з родини *Caliciviridae*, має форму ікосаедру і не має оболонки [2, 3].

Хвороба поширена на всіх континентах і реєструється з 1984 року. В Україні діагностують з 1987 року [2]. ВГХК входить до переліку хвороб, які підлягають обов'язковій нотифікації згідно стандартів Міжнародного епізоотичного бюро. Нині про спалахи ВГХК в Україні повідомляють щороку, хвороба значно розповсюджена та є ендемічною для нашої країни.

Лабораторна діагностика може включати реакцію аглютинації, електронну мікроскопію, ІФА для виявлення вірусів, забарвлення імунофлюорисцюючими барвниками, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) з детекцією результатів в електрофорезі та ПЛР у реальному часі [3].

Так, як не існує специфічного лікування і перебіг хвороби зазвичай безсимптомний, гостро стоїть питання профілактики. На ринку представлений достатній вибір засобів специфічної профілактики, а саме вакцин для щеплення поголів'я кролів з 8-ми тижневого віку.

Метою роботи було апробувати метод молекулярної ПЛР діагностики ВГХК, проаналізувати епізоотичний стан у Білоцерківському районі Київської області та оцінити ефективність щеплення тварин доступними на ринку вакцинами проти ВГХК.

Було здійснено апробацію методу діагностики ВГХК за допомогою ПЛР у Проблемній науково-дослідній лабораторії новітніх методів (ІФА та ПЛР) БНАУ. У якості позитивних зразків були використані печінки від кролів, які загинули в наслідок захворювання ВГХК і це було підтверджено лабораторно у ДНДІЛДВСЕ (м. Київ). Для власних досліджень використовували апробований метод ПЛР, відбір зразків проводили на базі Державної лабораторії ветеринарно-санітарної експертизи №5. Для аналізу були відібрані печінки від домашніх дорослих кролів, які були доставлені на Центральний ринок для продажу. Відібрали 10 зразків з різних домашніх господарств розташованих в різних населених пунктах Білоцерківського району.

Лабораторні дослідження проводили на базі Міжфакультетської науково-дослідної лабораторії новітніх методів дослідження (ІФА та ПЛР) Білоцерківського національного аграрного університету. Для виділення РНК з печінки кролів використовували набір реактивів «QIAamp® cador® Pathogen Mini» (колоночний метод) (США), для зворотної транскрипції і отримання кДНК застосовували протокол з використанням «Thermo Scientific

RevertAid Reverse Transcriptase» (США), а для ампліфікації використовувати набір реагентів «NeoGene PCR Master Mix (2X)» (Україна). Детекцію результатів ампліфікації здійснювали методом електрофорезу у 2% агаровому гелі у присутності бромистого етидію з наступною візуальною оцінкою наявності специфічного фрагменту в ультрафіолетовому світлі.

Для однієї реакції використовували наступні компоненти:

PCR Master Mix (2X)	25 мкл
Forward primer	1 мкл
Reverse primer	1 мкл
Зразок ДНК	1 мкг
Дистильована вода	До 50 мкл
Загальний об'єм	50 мкл

Для постановки ПЛР використовували дані температури:

Крок	Температура, °C	Час	Кількість циклів
Початкова денатурація	95	3 хв.	1
Денатурація	95	30 сек.	
Відпал	52	30 сек.	40
Елонгація	72	1 хв.	
Завершення елонгації	72	15 хв.	1

У якості контролю ефективності виділення та транскрипції РНК з печінки кролів проводили ампліфікацію кДНК з усіх проб у присутності видоспецифічних для кролів праймерів.

Важливим етапом в профілактиці захворювання та недопущення розповсюдження являється вакцинація. На сучасному ринку представлено великий асортимент вакцин, таких як, «LAPIMUN GEM» (Україна ТОВ «Біо-Тест-Лабораторія»), «Песторін» (Чеська Республіка, акціонерне товариство «Біовета»), «Раббівак-V» (Росія ТОВ «Торговий Дім «БіАгро»), Вакцина проти вірусної геморагічної хвороби кролів тканинна інактивована гідроокисалюмінієва (Україна "Сумська біологічна фабрика"), Вакцина проти вірусної геморагічної хвороби кролів тканинна інактивована гідроокисалюмінієва (Україна Херсонське державне підприємство — біологічна фабрика), «Геморагівак» (Україна, ТОВ «Біо-Тест-Лабораторія»). Власники кролів активно застосовують вакцинацію, як основний метод профілактики ВГХК.

За останній рік повідомлення про спалахи ВГХК носили поодинокий характер та надходили з індивідуальних присадибних господарств. В досліджених зразках печінок кролів не було встановлено вірусної РНК, водночас у ПЛР спостерігали чітку реакцію на видоспецифічну РНК кролів та контрольні зразки, що вказує на коректну постановку досліджу.

Отже, відсутність у дослідному матеріалі вірусної РНК ВГХК та мала кількість повідомлень про випадки хвороби у кролів може свідчити про відсутність циркуляції вірусу у присадибних господарствах населення та стабільну епізоотичну ситуацію. Також важливу роль грає профілактика захворювання, а саме вакцинація сприйнятливих тварин, що стримує розповсюдження хвороби, та забезпечує епізоотичне благополуччя у районі.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мандигра М. С., Домбровський О. Б., Тирсін Р. В. Хвороба, "Вірусна геморагічна хвороба кроликів,". 2001. С. 1–83.
2. Velarde R. "Spillover Events of Infection of Brown Hares (*Lepus europaeus*) with Rabbit Haemorrhagic Disease Type 2 Virus (RHDV2) Caused Sporadic Cases of an European Brown Hare Syndrome-Like Disease in Italy and Spain," *Transbound. Emerg. Dis.* 2017. vol. 64. no. 6. P. 1750–1761. Doi: <https://doi.org/10.1111/tbed.12562>.
3. OIE, "Rabbit Haemorrhagic Disease: Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control References," 2019. P. 1–7.