МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждекние высшего образования
«Алтайский государственный аграрный университет»

ОТЧЕТ
по научным исследованиям

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

ТЕМА: «Ассоциированное течение вирусных болезней собак в условиях Прибайкалья»

Выполнила:
аспирантка 2 года обучения
кафедры микробиологии
Никоненко Т.Б. _____

Научный руководитель:
Профессор, д.в.н.
Барышников П.И.

Барнаул, 2017

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы исследования

В период с 2016 – 2017 г.г. исследованию подвергались здоровые и больные с клиническими признаками вирусных заболеваний собаки, поступающие в питомник К-9 г. Иркутск и пункт передержки безнадзорных животных п. Кутулик филиала «Аларский» ОГБУ «Черемховская станция по борьбе с болезнями животных» (далее ОГБУ «Черемховская СББЖ»). Лабораторная диагностика ассоциированных вирусных болезней собак осуществлялась на базе вирусологического и бактериологических отделов ФГБУ «Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория» (далее Иркутская МВЛ), а также диагностической ветеринарной лаборатории ОГБУ «Черемховская СББЖ».

В исследовании участвовали беспородные собаки в возрасте от 3 мес. до 15 лет. Объём выполненных исследований представлен в таблице 1.

Таблица 1.

Объем выполненных исследований

Направление исследований	Животные		Всего
	больные	здоровые	
Кол-во обследованных собак	10	10	20
Кол-во выделенных и идентифицированных вирусов	10	-	10
Кол-во выделенных и идентифицированных микроорганизмов	8	2	10
Кол-во выделенных и идентифицированных паразитов	1	1	2
Кол-во штаммов микроорганизмов, у которых изучена резистентность к антимикробным препаратам	8	2	10

Материалом для лабораторных исследований являлись ректальные мазки или фекалии от собак. Для получения данного материала использовали готовые тампоны и пробирки с аналитическим разбавителем (буферный раствор), которые шли в комплекте экспресс-теста VetExpert CPV/CCV Ag – твердофазный иммунохроматографический анализ для качественного обнаружения антигенов Canine Coronavirus и Canine Parvovirus. Отбор проб материала был осуществлён согласно прилагаемой инструкции к применению вышеуказанного экспресс-теста.

Методы исследования

Вирусологические методы

В условиях питомника полученный биоматериал подвергался прямому одношаговому исследованию (экспресс-диагностика), основанный на методе иммунохроматографического анализа (ИХА) с использованием тест-кассет VetExpert CPV/CCV Ag с одновременным обнаружением и дифференциацией антигенов парвовируса и коронавируса собак. Для этого стерильной пипеткой брали надосадочную жидкость из пробирки, и вносили её постепенно по 4 капли в лунку каждой кассеты. Через 10 минут производили интепретацию результатов по схеме, изображенной на рисунке 1.

Рис. 1.

Интерпретация результатов иммунохроматографического анализа



В условиях лаборатории (вирусологический отдел Иркутской МВЛ) парвовирусный энтерит собак подтверждали методом иммуноферментного анализа (ИФА) в соответствии «Инструкции по применению набора для выявления антигенов парвовируса собак, вирусов энтерита норок и панлейкопении кошек иммуноферментным анализом (ИФА), регистрационный номер ПВР-1-1.0/00325», утвержденной Россельхознадзором 12.08.2010 года, коронавирусный энтерит подтверждали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в соответствии «Инструкции по применению тест-системы «КОРОНАВИР» для выявления и идентификации коронавирусов кошек и собак методом полимеразной цепной реакции», утвержденной 14.12.2009.

Для ***ИФА*** использовали специфические компоненты: специфический иммноглобулин G (IgG) к вирусу парвовиурса собак, вирусов энтерита норок и панлекопении кошек (ВЭС); положительный контроль (К+) – специфический антиген ВЭС; отрицательный контроль (К-) – лизат клеток без вируса; конъюгат – специфический иммуноглобулин G к ВЭС, меченый пероксидазой хрена. Неспецифические компоненты: карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ); 20-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБТ); буферный раствор для разведения реагентов (БДР); субстратный раствор с перекисью водорода для разведения хромогена (СР); хромоген, тетраметил бензидин (ТМБ); 1 М серная кислота; плоскодонный полистироловый планшет 96-луночный.

Метод основан на взаимодействии иммубилизованного на поверхности лунок планшета специфического иммуноглобулина с антигеном ВЭС из исследуемой пробы и последующем выявлении полученного комплекса конъюгатом (меченым пероксидазой хрена специфическим иммуноглобулином G к антигенам ВЭС). Связаная пероксидаза вызывает разложение находящейся в хромоген-субстратном растворе перекиси водорода и окисление хромогена. В лунках развивается окраска, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству антигена в

определяемой пробе.

Результаты ИФА учитывали сразу после остановки реакции на спектофотометре при длине волны 450 нм. Вычисляли средние значения оптической плотности для проб положительного контроля (ОПсрК+), для проб отрицательного контроля (ОПсрК-) и испытуемых проб (ОПсрР). Показатель ОПсрК+ должен быть выше 0,4, а ОПсрК+/ОПсрК-≥ 3,0. Реакцию считали положительной, если отношение средней величины оптической плотности в лунках с исследуемой пробой (ОПсрР) к средней величине оптической плотности в лунках с отрицательным контролем (ОПсрК-) не менее 2,1, т.е. ОПсрК+/ОПсрК-≥ 2,1. Если ОПсрК+/ОПсрК- <2,1, реакцию считали отрицательной.

Для ***ПЦР*** использовали тест-систему варианта FRT, предназначенной для выявления РНК коронавирусов в биологическом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. В состав данной тест-системы, включая контроли, входят: комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» вариант 50 и комплект реагентов для ПЦР-амплификации к ДНК коронавирусов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «ПЦР-комплект» варианта FRT.

В основе метода ПЦР с использованием тест-системы варианта FRT лежит амплификация специфического участка кДНК коронавируса за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и зондов, меченных флуоресцентными красителями, и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента Taq-полимеразы.

ПЦР-анализ проводили в два этапа в отдельных помещениях. Для проведения реакции обратной транскрипции, ПЦР-амплификации и детекции продуктов ПЦР - амплификации использовали прибор Rotor-Gene 3000/6000,

Corbett Research, Австралия. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Ct». Результат считали достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения РНК. Образец считали положительным на наличие РНК коронавирусов, если значение Ct на канале JOE (Yellow) было менее 33. Если по каналу JOE (Yellow) отсутствовало значение Ct, а по каналу FAM/Green значение Ct не превышало 31, образец считали отрицательным.

Микробиологические и паразитологические методы

Микробиологические и паразитологические методы исследований производили в условиях лабораторий, куда в течение суток доставляли полученные пробы биоматериала.

При поступлении в бактериологический отдел пробирки инкубировали в термостате при температуре 37°С в течение 24 часов. Затем проводили посев исследуемого материала на дифференциально-диагностические среды (Эндо, Левина, Плоскирева). При наличии роста на указанных дифференциально-диагностических средах проводили отбор колоний и их пересев на скошенный мясопептонный агар (МПА). Пробирки с посевами инкубировали в течение 18-24 часов при температуре 37°С.

Идентификацию полученных культур проводили при помощи аппарата-анализатора (название прибора).

При проведении паразитологических исследований применяли методы прижизненной диагностики. Для этого полученные от собак пробы фекалий исследовали на наличие гельминтов методами Фюллеборна и Дарлинга.

Статистические методы

Статистическая обработка ретроспективных данных и результатов исследований проводили с использованием параметрических и непараметрических критериев статистики (Лакин Г.Ф., 1980; Гланц С., 1999 и др.).

Изучение инфекционной патологии собак проводили с использованием уравнения прямой линии, корреляционный анализ - с определением коэффициента множественной линейной корреляции.

Для оценки различий полученных результатов использовали критерий Стьюдента. При работе с относительной численностью (в процентах) единиц совокупности, обладающих данным значением признака, применяли критерий Боярского. При использовании критерия Боярского учитывали несколько показателей:

1. число наблюдений;
2. разность между сравниваемыми показателями в %;
3. меньший из сравниваемых показателей в %.

Определяли разность между полученными величинами и сравнивали ее с минимальной разностью, достижение которой свидетельствовало, что превышение одного показателя над другим неслучайно. При разном числе наблюдений в сопоставимых группах использовали формулу расчета усредненного числа наблюдений:

$$\frac{2 \times n_1 \times n_2}{n_1 + n_2}$$

где n_1 – число наблюдений в первой выборке, n_2 – число наблюдений во второй выборке.

При сравнении попарно связанных выборок использовали критерий знаков, принцип которого заключается в подсчете числа однонаправленных

эффектов в попарно сопряженных вариантах. Исходили из проверки гипотезы о статистической значимости различий сравниваемых выборочных совокупностей. Для этого формулируется нулевая гипотеза – предположение о том, что разница между генеральными параметрами сравниваемых совокупностей равна нулю, и различия, наблюдаемые между выборочными показателями, носят случайный характер (Гланц С., 1999). При проверке справедливости принятия (или не принятия) данной гипотезы с помощью критерия знаков ориентировались на максимальное количество знаков (менее часто встречающихся), при которых различия в парных сравнениях можно считать существенным.