

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ІМ.М.В. ЗУБЦЯ
ЧЕРКАСЬКА ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ БІОРЕСУРСІВ



Збірник наукових праць

“ЕФЕКТИВНЕ КРОЛІВНИЦТВО І ЗВІРІВНИЦТВО”



Випуск №6

Черкаси 2020 р.

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ІМ.М.В. ЗУБЦЯ
ЧЕРКАСЬКА ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ БІОРЕСУРСІВ**

**Збірник наукових праць
“ЕФЕКТИВНЕ КРОЛІВНИЦТВО І
ЗВІРІВНИЦТВО”**

Випуск №6

Черкаси 2020

УДК. 636. 619. 92. 93

Збірник наукових праць “Ефективне кролівництво і звірівництво”, Черкаси: Черкаська дослідна станція біоресурсів НААН. 2020. вип. 6 - 205 с.

Висвітлені результати наукових досліджень із актуальних питань утримання, селекції, профілактики та лікування кролів і хутрових звірів. Матеріали розраховані на наукових працівників, викладачів, аспірантів, студентів аграрних ВНЗ та фахівців сільськогосподарського виробництва.

Редакційна колегія Сільськогосподарські науки

Головний редактор **Башенко М. І.** - доктор сільськогосподарських наук, академік НААН; **Заступник головного редактора** – **Гончар О.Ф.**, заступник директора Черкаської дослідної станції біоресурсів НААН, кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник; **Відповідальний секретар** – **Гавриш О.М.**, завідувач відділу біорозмаїття та екології Черкаської дослідної станції біоресурсів НААН, кандидат сільськогосподарських наук.

Члени редакційної колегії: **Гладій М.В.**, віце-президент НААН, доктор економічних наук, академік НААН; **Жукорський О.М.**, заступник академіка-секретаря Відділення зоотехнії НААН, доктор сільськогосподарських наук, член-кореспондент НААН; **Ковтун С. І.**, заступник директора з наукової роботи Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН, доктор сільськогосподарських наук, академік НААН; **Лучин І.С.**, заступник завідувача відділом біорізноманіття та екології Черкаської дослідної станції біоресурсів НААН, доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник; **Коцюбенко Г.А.**, доцент кафедри птахівництва, якості та безпечності продукції Миколаївського НАУ, доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник; **Рубан С.Ю.**, доктор сільськогосподарських наук, член-кореспондент НААН; **Небилиця М.С.**, завідувач відділу тваринництва та виробництва екологічно чистої продукції Черкаської дослідної станції біоресурсів НААН, кандидат сільськогосподарських наук; **Яремич Н.В.**, старший науковий співробітник відділу біорозмаїття та екології Черкаської дослідної станції біоресурсів НААН, кандидат сільськогосподарських наук.

Ветеринарні науки

Мандигра М.С., академік-секретар Відділення ветеринарної медицини НААН, член-кореспондент НААН, доктор ветеринарних наук, член-кореспондент НААН; **Долецький С.П.**, заступник відділу ветеринарної медицини та зоотехнії апарату Президії НААН, доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник; **Стегній Б.Т.**, директор ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», доктор ветеринарних наук, академік НААН; **Клєстова З.С.**, заступник директора з наукової роботи Державного науково-контрольного інституту біотехнологій та штамів мікроорганізмів, доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник; **Бойко П.К.**, професор кафедри Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки, доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник; **Завгородній А.І.**, заступник директора з наукової роботи та інновацій ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», доктор ветеринарних наук, член-кореспондент НААН; **Макогін В.В.**, науковий співробітник Черкаської дослідної станції біоресурсів НААН, кандидат ветеринарних наук.

Адреса редакційної колегії: 18036 м. Черкаси, вул. Пастерівська, 76 тел./факс (0472) 31-40-52

e-mail: bioresurs.ck@ukr.net

Опубліковано на сайті: <http://www.bioresurs.herokuapp.com/>

Внесено до переліку наукових фахових видань України, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукового ступеня доктора і кандидата наук. Затверджено наказом Міністерства освіти і науки України від **10.05.2017 року №693** Видано за рішенням Вченої Ради Черкаської дослідної станції біоресурсів НААН (протокол №2 від 27 лютого 2020 року)

ЗМІСТ

ТВАРИННИЦТВО

Honchar O.F., Shevchenko E.A.

SELECTION-GENETIC CHARACTERISTICS OF RABBITS POLTAVSKA SILVER BREED BY POLYMORPHISM OF PROGESTERONE RECEPTOR GENE

6

Аксьонов Є. О., Корх О. В., Петраш В. С.

ЗАКОНОМІРНОСТІ РОСТУ ТА ФОРМУВАННЯ М'ЯСНОЇ ПРОДУКТИВНОСТІ КРОЛІВ М'ЯСНОГО НАПРЯМУ ЗА КОМБІНОВАНОГО ТИПУ ГОДІВЛІ

13

Бойко О.В., Гончар О.Ф., Гавриш О.М., Осокіна Т.Г.

ВПЛИВ НА ВІДТВОРЮВАЛЬНУ ЗДАТНІСТЬ САМЦІВ ТА САМОК НОРОК БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ДОБАВОК

26

Гавриш О. М.

ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ ІНДЕКСНОЇ ОЦІНКИ В СИСТЕМІ ДОБОРУ ТА ВИКОРИСТАННІ ПЛЕМІННОГО ПОГОЛІВ'Я КРОЛІВ ПОРОДИ ПОЛТАВСЬКЕ СРІБЛО

38

Гончар О.Ф., Бойко О.В., Гавриш О.М.

АНАЛІЗ СТАНУ ГАЛУЗІ КРОЛІВНИЦТВА В УКРАЇНІ

47

Гончаренко І.В., Агій В.М.

БАЖАНА КОНСТИТУЦІЯ КРОЛІВ ДЛЯ ВІДТВОРЕННЯ ТА ДЕЯКІ ТЕХНОЛОГІЧНІ ЕЛЕМЕНТИ СТИМУЛЯЦІЇ ОХОТИ КРОЛЕМАТОК

58

Коцюбенко В.І.

ТИПОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КРОЛІВ РІЗНИХ КОЛЬОРОВИХ ЛІНІЙ ПОРОДИ СРІБЛЯСТИЙ

65

Лучин І. С., Дармограй Л.М.

ПРОДУКТИВНА ДІЯ ПІДКИСЛЮВАЧА КОРМУ ACID STAG S BF НА ІНТЕНСИВНІСТЬ РОСТУ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ОРГАНІЗМУ МОЛОДНЯКУ КРОЛІВ ЗА ІНТЕНСИВНОГО ВИРОЩУВАННЯ НА М'ЯСО

74

Михно В.В.

ВІДТВОРНІ ЯКОСТІ САМЦІВ КРОЛІВ У ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ПАРАТИПОВИХ ФАКТОРІВ

88

Небилиця М. С., Бойко О. В.

СИСТЕМА МОНІТОРИНГУ ЗАБРУДНЮЮЧИХ ГАЗІВ ТА СПОСІБ РЕГУЛЮВАННЯ ТЕМПЕРАТУРНО-ВОЛОГІСТНОГО РЕЖИМУ ТВАРИННИЦЬКИХ ПРИМІЩЕНЬ	99
---	----

Піроцький О.М.

ВПЛИВ ВИПОЮВАННЯ РІЗНИХ ДОЗ ПІДКИСЛЮВАЧА «F1» НА ПРОДУКТИВНІСТЬ ТА ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ КРОЛЕНЯТ	110
--	-----

Сотніченко Ю.М., Башенко М.І., Бойко О.В., Гончар О.Ф., Гавриш О.М.

ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ М'ЯСНОЇ ПРОДУКТИВНОСТІ КРОЛІВ М'ЯСО-ШКУРКОВОГО НАПРЯМКУ ПРОДУКТИВНОСТІ	117
---	-----

Уманець Д.П., Уманець Р.М.

ПРОДУКТИВНІСТЬ РЕМОНТНОГО МОЛОДНЯКУ КРОЛІВ ЗА ЗГОДОВУВАННЯ ПОВНОРАЦІОННИХ КОМБІКОРМІВ З РІЗНИМ РІВНЕМ КАЛЬЦІЮ ТА ФОСФОРУ	125
--	-----

Якубець Т.В., Бочков В.М., Василенко В. М.

ПРОДУКТИВНІСТЬ КРОЛЕМАТОК РІЗНИХ КЛАСІВ РОЗПОДІЛУ ЗА ЖИВОЮ МАСОЮ ТА РІСТ КРОЛЕНЯТ, ОТРИМАНИХ ВІД НИХ	135
--	-----

ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА

Іваницька А. І., Лесик Я. В.

ВПЛИВ СПОЛУК СИЛІЦІЮ НА ГЕМАТОЛОГІЧНІ, БІОХІМІЧНІ ТА КЛІНІЧНІ ПОКАЗНИКИ ОРГАНІЗМУ КРОЛІВ	144
--	-----

Напненко О.О., Гордієнко О.І., Дерябін О.М., Мандзя І.М., Іванченко П.О.

ДІАГНОСТИКА ВІРУСНОЇ ГЕМОРАГІЧНОЇ ХВОРОБИ КРОЛІВ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ	155
--	-----

Николаев С.В.

МОРФОМЕТРИЯ И ОСОБЕННОСТИ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ЯИЧНИКОВ КРОЛИКОВ С МОМЕНТА РОЖДЕНИЯ ДО ОТЪЕМНОГО ВОЗРАСТА	165
--	-----

Федотов Д.Н., Ковалев К.Д.

ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗ В ЯИЧНИКЕ ЕНОТОВИДНОЙ СОБАКИ В УСЛОВИЯХ РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ	175
--	-----

Шевчук Т.В.

ХІМІЧНИЙ СКЛАД І ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОБІЧНИХ ПРОДУКТІВ ЗАБОЮ ТОВАРНОГО МОЛОДНЯКУ ПЕСЦЯ БЛАКИТНОГО	189
---	-----

УДК 636.09:57.083:636.92

ДІАГНОСТИКА ВІРУСНОЇ ГЕМОРАГІЧНОЇ ХВОРОБИ КРОЛІВ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Напненко О.О., канд. вет. наук, ст. наук. сп., **Гордієнко О.І.,** канд. с.-г. наук,
Дерябін О.М., Мандзя І.М., Іванченко П.О.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

Стаття присвячена розробленню чутливого та високоспецифічного засобу діагностики вірусної геморагічної хвороби кролів (ВГХК, RHDV). Діагностику захворювання виконували комплексно з урахуванням епізоотологічних даних, клінічного прояву, патологоанатомічних змін та дослідження біологічного матеріалу від загинувших кролів в реакції гемаглютинації (РГА) та зворотно-транскриптазній полімеразній ланцюговій реакції (ЗТ-ПЛР). Летальність захворювання для кролів різних вікових груп починалася від 1 місяця. Клінічна картина характеризувалася в більшості випадків раптовою загибеллю тварин, у деяких відмічали носову кровотечу. На розтині спостерігали явище геморагічного діатезу та ураження печінки. Для дослідження відбирали печінку кролів, готували-суспензію гомогенату та досліджували в РГА з еритроцитами людини О-групи крові. Для уточнення діагнозу проводили ЗТ-ПЛР, для чого були розроблені та штучно синтезовані олігонуклеотидні праймери, специфічні до гена VP1 (VP60) – основного капсидного білку вірусу геморагічної хвороби кролів, які забезпечують синтез фрагмента ДНК розміром 325 пар нуклеотидів. Реакція ЗТ-ПЛР виконувалася 35 циклами за умови відпалу праймерів при температурі 60°C. Аналіз результату ЗТ-ПЛР проводили в 1,5 % гелі агарози з інтеркалятором - бромистим етидієм. Результати оцінювали при перегляді гелю після електрофорезу під УФ-світлом за наявності (чи відсутності) червоно-помаранчевих фрагментів нуклеїнової кислоти певного розміру (325 п.н.). Специфічність ампліфікованого фрагмента ДНК визначали за його розміром по відношенню до фрагментів стандартних маркерів ДНК.

Дослідженнями встановлено, що РГА не забезпечує достатній рівень чутливості та специфічності. ЗТ-ПЛР дає можливість достовірно підтвердити наявність у матеріалі рибонуклеїнової кислоти ВГХК, проте використана пара праймерів визначає видову належність, але не генотип збудника. Ізоляти ВГХК виділено з матеріалів від кролів приватних господарств Сумської, Черкаської, Полтавської, Київської та Харківської областей.

Ключові слова: вірусна геморагічна хвороба кролів, діагностика, полімеразна ланцюгова реакція.

Актуальність. Однією із найбільш спустошливих для кролівництва хвороб є вірусна геморагічна хвороба кролів, яка гостро протікає і характеризується явищами геморагічного діатезу у всіх органах, особливо в легенях і печінці.

До вірусу чутливі усі кролі, незалежно від породи і статі, серед них найбільш чутливими є дорослі особини масою 3,0 – 5,0 кг. Кроленята до 1,5-місячного віку, як правило, стійкі до захворювання, але по досягненню віку старше 2-х місяців вони можуть захворіти й загинути. Клінічно хвороба майже не проявляється, перебігає надгостро (блискавично): клінічно здорові кролі раптом падають, роблять декілька судомних рухів і гинуть. Інколи при цьому кролі видають короткий писк і в них виявляють носову кровотечу [1-3].

Вакцинацію зазвичай починають від 1,5 - 2-х місячного віку, коли зникає вроджений імунітет. Проте, у неблагополучних господарствах вакцинують навіть місячних кроленят [1, 2].

Така інформація була достовірною і неспростовною впродовж 20 років після виявлення та вивчення збудника хвороби, проте у 2010 році на території Франції під час масового захворювання кролів з ознаками ВГХК було виявлено й ідентифіковано новий антигенний варіант збудника ВГХК, якого спочатку позначили як RHDVFra2010, а згодом класифікували як вірус геморагічної хвороби кролів другого генотипу - RHDV2 [4, 5].

Станом на 2019 рік хвороба поширилася практично по всьому світу, окрім арктичних та антарктичних територій [3].

Для діагностики ВГХК відповідно до рекомендацій Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин (Міжнародного епізоотичного бюро) потрібно поєднувати результати різних методів виявлення антигену: реакцію гемаглютинації (РГА), полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) та імуноферментний аналіз (ІФА), імунопероксидазну реакцію, електронну мікроскопію, а також постановку біологічної проби [6].

В Україні в повсякденній лабораторній діагностиці ВГХК застосовують РГА з наступною постановкою біологічної проби [2].

Метою дослідження було розроблення способу молекулярної діагностики ВГХК на основі сконструйованих високоспецифічних олігонуклеотидних праймерів і ПЛР з аналізом фрагментів ДНК методом електрофорезу в агарозному гелі та визначення його діагностичної цінності.

Матеріал та методи досліджень. Діагностику захворювання виконували комплексно з урахуванням епізоотологічних даних, клінічного прояву, патологоанатомічних змін та досліджень біологічного матеріалу від кролів, що загинули, в реакції гемаглютинації з еритроцитами людини та полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР) зі специфічними праймерами.

У ході виконання роботи впродовж квітня 2018 по травень 2019 років було отримано інформацію про спалахи ВГХК в п'яти областях України: Київській, Сумській, Черкаській, Харківській та Полтавській.

Співробітниками ДНКІБШМ були здійснені виїзди у неблагополучні пункти та проведено аналіз епізоотичної ситуації на місцях.

За вказаний період було відібрано та досліджено: 16 проб з Черкаської області; 8 проб – із Сумської; 3 проби - з Київської; 5 проб - із Харківської та 3 проби - з Полтавської областей.

Тваринам, що загинули, здійснювали секційний розтин. Від трупів тварин були відібрані зразки печінки та доставлені до ДНКІБШМ.

Зі зразків печінки (1 г) був приготовлений гомогенат та 10 % суспензія на фосфатно-сольовому буферному розчині (рН 7,2) . Суспензію досліджували в реакції гемаглютинації з еритроцитами людини груп «О».

Постановку біологічної проби виконували в умовах ізолятору державного підприємства «Сумська біологічна фабрика». Для цього відбирали кролів, вільних від антитіл до ВГХК, статус підтверджували в реакції затримки гемаглютинації.

Для пошуку нуклеотидних послідовностей ВГХК були використані бази даних: GenBank (США), EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека) та DDBJ (Японська база даних). Вирівнювання відібраних нуклеотидних послідовностей проводили з використанням модулю “ClustalW” з програмного пакету “Vector NTI” v.11.0.1 (Invitrogen, США) та за допомогою електронної служби BLAST 2.0 Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) США. Конструювання специфічних олігонуклеотидних праймерів виконано з використанням програмного забезпечення "Vector NTI" v.11.0.1.

Для виділення вірусної РНК з відібраних зразків був використаний набір реагентів «РНК-сорб» (Синтол, РФ). Для зворотно-транскриптазної реакції використали набір “Thermo Scientific RevertAid Premium Reverse Transcriptase” (Thermo Fisher Scientific, США).

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на термоциклері «T1 Personal Comby» (Biometra, Німеччина) в об’ємі 0,025 см³. З метою мінімізації утворення неспецифічних димерів праймер-матриця і їх ампліфікації був використаний метод приготування реакційної суміші з фізичним розділенням компонентів ПЛР. Для приготування „нижньої” реакційної суміші змішували відповідні праймери (з кінцевою концентрацією кожного 20 пМоль/зразок) і суміш нуклеотидтрифосфатів (2мМ) в одній пробірці, після чого суміш розкапували в мікропробірки по 0,005 см³ і нашаровували зверху по 0,015 см³ розплавленого воску. Після застигання воску в пробірку вносили по 0,017 см³ „верхньої” суміші та по 2 краплі мінерального масла. До складу „верхньої” ПЛР-суміші в розрахунку на один зразок входило: 0,005 см³ 5-х ПЛР-буферу, 0,0025 см³ 50 мМ MgSO₄ (або MgCl₂), 0,009 см³ H₂O MilliQ та 0,0005 см³ Taq-полімерази (5 од/мкл). Досліджувану кДНК вносили під масло в об’ємі 0,003 см³ - 0,005 см³. Термопрофіль реакції представлений в таблиці 1.

Таблиця 1. Термопрофіль ЗТ-ПЛР з праймерами dVP60-F2 та dVP60-R1

Назва циклу	Режим ампліфікації	Тривалість циклу	Кількість циклів
Початкова денатурація ДНК	95° C	4 хв	1
Денатурація	95° C	30 с	35
Відпал праймерів	60° C	30 с	
Елонгація	72° C	30 с	
Фінальна елонгація	72° C	7 хв	1
Зберігання	10° C	-	-

В якості позитивного контролю були використані матеріали вакцинного вірусу ВГХК штаму «Воронезький-87 (В-87) з колекції Національного центру штамів мікроорганізмів.

Результати досліджень та їх обговорення. В усіх господарствах, де виникали спалахи, лише частина кролів були щеплені комерційними вакцинами проти вірусної геморагічної хвороби кролів, зареєстрованими в Україні, а біля третини поголів'я виявилися взагалі нещепленими проти ВГХК.

Кролі гинули з явними клінічними ознаками ВГХК. Особливістю було те, що серед тварин, що загинули, були кроленята 1-2-х місячного віку. У більшості випадків це була раптова загибель; інколи тварини були пригнічені протягом 2-3 діб, після чого гинули. Відмічали випадки загибелі й серед щепленого поголів'я.

На розтині у більшості кролів виявляли явище геморагічного діатезу - патологічні зміни, характерні для ВГХК: кровонаповнені легені, крововиливи під плеврою, печінка у частини загинилих кролів була кровонаповнена, червоно-коричневого кольору з жовтим відтінком. У тварин, розтин яких виконували через декілька (3-5) годин після загибелі, відмічали світло-коричневий колір печінки, збільшення розміру та кровонаповнення нирок, а також збільшення розміру серця, яке містило темно-червону кров, та в'ялість серцевого м'язу.

В реакції гемаглютинації досліджували зразки 10% суспензії гомогенату печінки на фосфатно-сольовому буферному розчині за кімнатної температури (18-21°C). Діагноз підтверджували постановкою біологічної проби на кролях, вільних від антитіл до ВГХК. У результаті постановки біологічної проби усі дослідні тварини загинули. Відібрані зразки печінки були перевірені на наявність ВГХК молекулярно-біологічним методом (ЗТ-ПЛР).

Як відомо, геном ВГХК складається з двох відкритих рамок зчитування ORF1 і ORF2 [3]. Перша рамка кодує поліпротеїн, який розщеплюється кодовою вірусом трипсиноподібною цистеїною протеазою з утворенням основного структурного білку капсиду (VP60), неструктурних білків p16, p23, гелікази, p29, VPg, протеази і RdRp, а друга рамка зчитування (ORF2) - кодує мінорний структурний білок VP10. У віріонах виявляється також субгеномна мРНК, що кодує як білок VP60, так і VP10. Геномна і субгеномна РНК поліаденільовані на 3'- кінці і містять кодований вірусом білок VPg, який ковалентно приєднаний до їх 5'- кінця (рис.1).

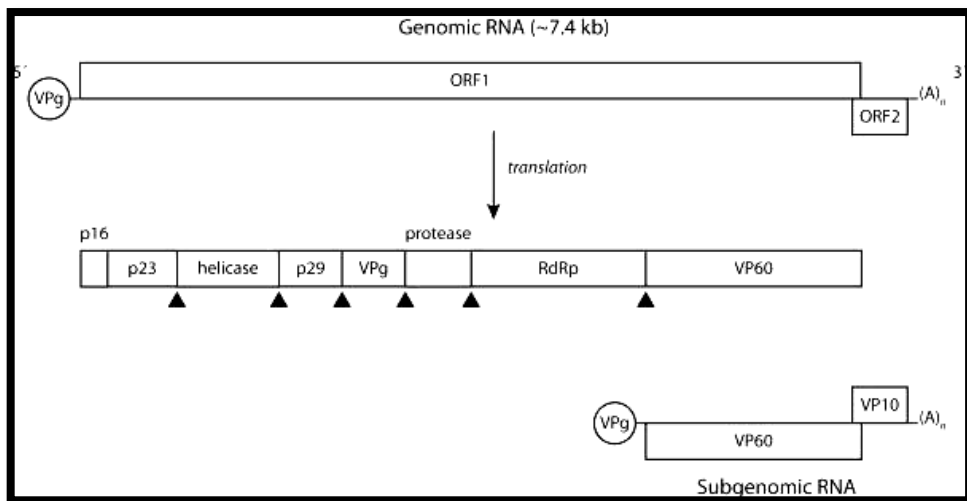


Рисунок 1. Структурна організація геному ВГХК [3].

В якості таргетного гену для ЗТ-ПЛР був обраний ген структурного білку VP60. Розроблені олігонуклеотидні праймери dVP60-R1 та dVP60-F2, специфічні консервативній ділянці гена VP60 РНК вірусу ВГХК, враховують певну варіабельність серед генотипів вірусу (рис.1) і забезпечують синтез фрагменту ДНК розміром 325 п.н. при температурі відпау 60°C (табл. 2, рис. 2). Зворотній праймер є «виродженим», де Y = C/T, а K= G/T.

Після оптимізації умов реакції, праймери були перевірені на специфічність. Критерієм специфічності вважали неспроможність праймерів гібридизуватись з ДНК гетерологічних зразків

Таблиця 2. Характеристика олігонуклеотидних праймерів

Праймер	Послідовність 5'→3'	T _m , °C	%GC	Фрагмент п.н.
dVP60-F2	ATGTACGCTGGCTGGGCTG	55,9	63,2	325
dVP60-R1	GCCTTGTTCCACYGTKACCTG	56,6	54,5	

Після оптимізації умов реакції, праймери були перевірені на специфічність. Критерієм специфічності вважали неспроможність праймерів гібридизуватись з ДНК гетерологічних зразків.

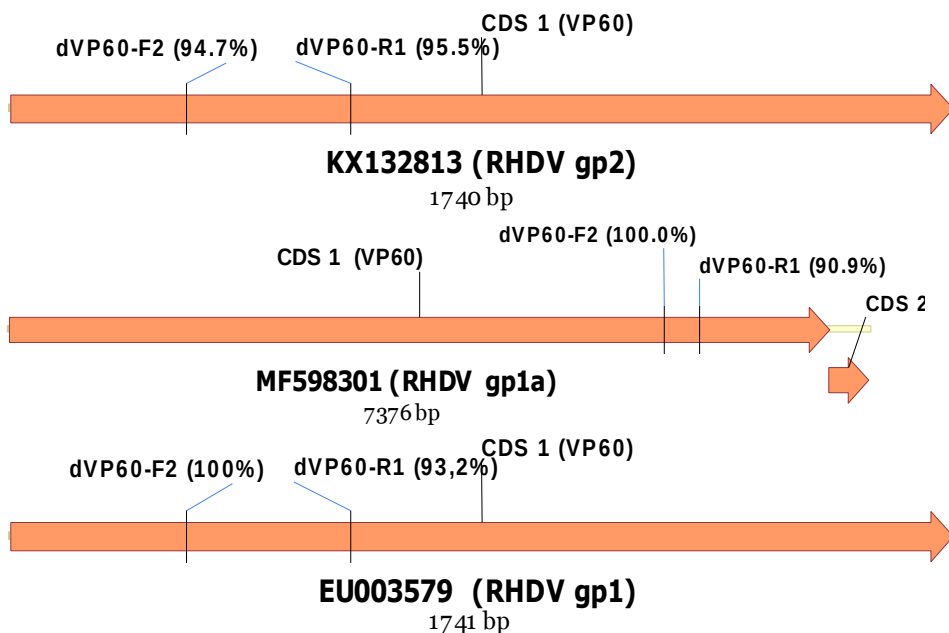


Рисунок 2. Специфічність олігонуклеотидних праймерів гену VP60 різних генотипів вірусу ГХК

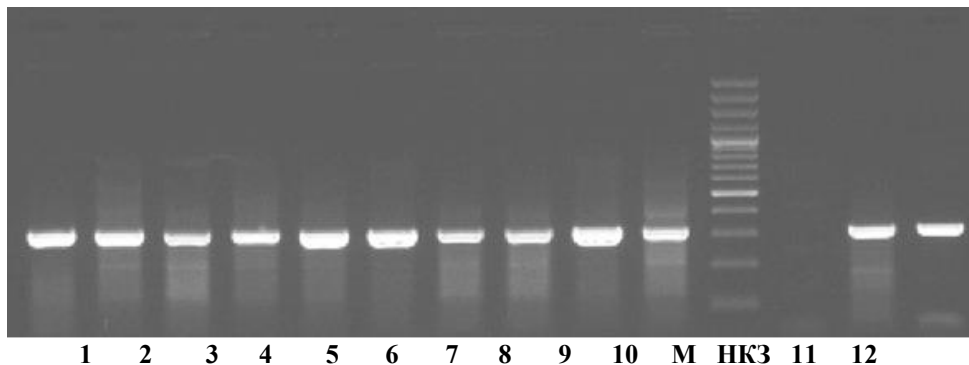


Рисунок 3. Електрофоретичний аналіз продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами dVP60-F2 та dVP60-R1. Варіанти: 1, 2 – зразок п/м Київської обл.; 3, 4 – зразок п/м Харківської обл.; 5, 6 – зразок п/м Черкаської обл.; 7, 8 – зразок п/м Сумської обл.; 9, 10 – зразок п/м Полтавської обл.; М – маркер розміру фрагментів ДНК “Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder” (BioLabs, UK); НКЗ – негативний контрольний зразок; 11– шт. «Воронежський-87» 2п. (5,23lg) від 09.02.07 р. (НЦШМ); 12– «Воронежський-87» 10п. від 05.10.10р. (НЦШМ).

Аналіз результатів дає підстави стверджувати, що РГА має значно нижчу чутливість та специфічність, ніж ЗТ-ПЛР.

Негативними факторами, які можуть впливати на достовірність результатів постановки РГА, є підготовка проб матеріалу, температура приміщення, у якому здійснюють постановку реакції, якість реагентів (еритроцити крові людини) тощо.

У ході проведених досліджень було підтверджено, що кролі загинули від вірусної геморагічної хвороби кролів (таблиця 3).

Таблиця 3. Результати дослідження матеріалу в РГА та ПЛР

№ п/п	Область, походження кролів	Кількість досліджених проб	Кількість позитивних проб		
			РГА	Біопроба	ЗТ-ПЛР
1	Київська	3	2	3	3
2	Сумська	8	8	7	7
3	Харківська	5	4	5	5
4	Черкаська	16	12	14	14
5	Полтавська	3	2	3	3
6	Контроль – вірус ВГХК штам «В-87»	3	3	3	3

Висновки та перспективи подальших досліджень

1. Результати дослідження в реакції гемаглютинації при діагностиці ВГХК не можуть бути підставою для остаточного діагнозу.
2. Розроблені пари видоспецифічних олігонуклеотидних праймерів, які забезпечують синтез фрагменту ДНК розміром 325 п.н. при температурі відпау 60°C й можуть бути використані для діагностики ВГХК методом зворотно-транскриптазної ланцюгової реакції; за їх допомогою встановлено циркуляцію збудника на території Черкаської, Сумської, Київської, Харківської та Полтавської областей.
3. Подальші дослідження будуть здійснені в напрямку вивчення чутливості ЗТ-ПЛР для діагностики ВГХК та розроблення типоспецифічних праймерів для диференціації різних генотипів і груп вірусу геморагічної хвороби кролів.

Література

1. Геморрагическая болезнь кроликов / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Сольовьев, Н.В. Фомина // Вирусные болезни животных. – М.: ВНИТИБП. – 1998. – С. 485- 494.
2. Вирусная геморрагическая болезнь кроликов / А.Ф. Евтушенко // Болезни кроликов. – Киев: Урожай. – 1992. – С. 40-47.
3. Abrantes J. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review / J. Abrantes, W. van der Loo, J. Le Pendu and P.J.Esteves // Veterinary Research 2012, 43:12.
4. Puggioni G. The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*) / G. Puggioni, P. Cavadini, C. Maestrale et al. // Veterinary Research 2013, 44:96.
5. Pendu J. Le Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses / J. Le Pendu, J. Abrantes, St. Bertagnoli // Journal of General Virology 2017; 98:1658–1666.
6. Rabbit haemorrhagic disease Chapter 3.6.2 // OIE Terrestrial Manual, 2018 - https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.02_RHD.pdf

References

1. Sjurin V.N., Samujlenko A.Ja., Sol'ov'jov B.V., Fomina N.V. (1998). Gemorragicheskaja bolezni' krolikov [Rabbit haemorrhagic disease]. Virusnye bolezni zhivotnyh. – Animal viral diseases. - Moscow. S. 485- 494 [in Russian].
2. Evtushenko A.F. (1992). Virusnaja gemorragicheskaja bolezni' krolikov [Rabbit haemorrhagic viral disease]. - Bolezni krolikov. – Diseases of rabbits. – Kiev S. 40-47 [in Russian].
3. Abrantes J. Loo W. van der, Pendu J. Le & Esteves P.J. (2012) Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. - Veterinary Research, 43:12 [in English].

4. Puggioni G., Cavadini P., Maestrale C. et al. (2013). The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). Veterinary Research. 44:96 [in English].

5. Pendu Le J., Abrantes J., Bertagnoli St. et al. (2017). Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. - Journal of General Virology. - 98:1658–1666 [in English].

6. Rabbit haemorrhagic disease Chapter 3.6.2 // OIE Terrestrial Manual, 2018 - https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.02_RHD.pdf [in English].

UDC 636.09:57.083:636.92

THE DIAGNOSIS OF RABBIT HAEMORRHAGIC VIRAL DISEASE BY THE METHOD OF POLYMERASE CHAIN REACTION

O. Napnenko, O. Gordienko, O. Deriabin, I. Mandzja, P. Ivanchenko

This article is about development of a sensitive and highly specific method for the diagnosis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). The diagnosis of the disease was performed in combination with epizootic data, clinical manifestations, pathological changes and study of biological material from dead rabbits with use of the hemagglutination assay (HA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The rabbits of different age groups from 1 month were dying. Clinically it was characterized in most cases by sudden death of animals, in some cases the nasal bleeding was noted. At the autopsy, hemorrhagic diathesis and liver damage were noted. Rabbit liver was selected for the study, a suspension of liver homogenate was obtained and examined in HA with the human red blood cells, O-group. To clarify the diagnosis RT-PCR was performed and "degenerate" oligonucleotide primers with the corresponding nucleotide sequence specific for the VP1 gene (VP60) were developed and artificially synthesized to use this method. VP60 is the major capsid protein of the rabbit hemorrhagic disease virus, which provides the synthesis of 325 base pairs. The RT-PCR is performed for 35 cycles with annealing of the primers at 60°C.

Analysis of the result of RT-PCR is carried out in 1.5% agarose gel with an adding of ethidium bromide. 0.10-0.012 cm³ of the amplified mixture is appended in agarose gel wells. The results were evaluated by viewing the gel after electrophoresis on the transilluminator under UV light by the presence (or absence) of red-orange nucleic acid fragments of a certain size (325 b.p.). The specificity of the amplified nucleic acid fragment was determined by its position (size) relative to the fragments of standard markers. The studies have shown that HA has low level of sensitivity and specificity. RT-PCR has reliable affirmed the presence of RHDV ribonucleic acid in the material, however, this pair of primers makes it impossible to determine the genotype of the pathogen. The pathogen is identified from dead rabbits of private farms of Sumy, Cherkasy, Poltava, Kiev, Kharkiv regions.

Keywords: viral haemorrhagic rabbit disease, diagnosis, polymerase chain reaction.

УДК 636.09:57.083:636.92

ДИАГНОСТИКА ВИРУСНОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ КРОЛИКОВ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Напненко О.О., Гордиенко О.И., Дерябин О.Н., Мандзя И.Н., Иванченко П.О.

Эта статья посвящена разработке чувствительного и высокоспецифического средства диагностики вирусной геморрагической болезни кроликов (ВГБК, RHDV). Диагностику заболевания выполняли комплексно с учетом эпизоотологических данных, клинических проявлений, патологоанатомических изменений и исследования биологического материала погибших кроликов, в реакции гемагглютинации и обратимо-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Гибли кролики разных возрастов, начиная от 1 месяца. Клиническая картина характеризовалась в большинстве случаев внезапной гибелью животных, у некоторых имело место носовое кровотечение. На вскрытии отмечали явление геморрагического диатеза и поражения печени. Для исследования отбирали печень кроликов, получали суспензию гомогената и исследовали в реакции РГА с эритроцитами человека О-группы крови. Для уточнения диагноза проводили ОТ-ПЦР, для чего были разработаны и искусственно синтезированы «вырожденные» олигонуклеотидные праймеры с соответствующей последовательностью нуклеотидов, специфичных к гену VP1 (VP60) - основного капсидного белка вируса геморрагической болезни кроликов, которые обеспечивают синтез фрагмента ДНК размером 325 пар нуклеотидов. Реакция ОТ-ПЦР выполнялась 35 циклами, с отжигом праймеров при температуре 60°C. Анализ результата ОТ-ПЦР проводили в 1,5% геле агарозы с красителем - бромистым этидием. В лунки агарозного геля вносили 0,010-0,012 см³ амплифицированной смеси. Результаты оценивали при просмотре геля после электрофореза на трансиллюминаторе под ультрафиолетом по наличию (или отсутствию) красно-оранжевых фрагментов нуклеиновой кислоты определенного размера (325 п.н.). Специфичность амплифицированного фрагмента нуклеиновой кислоты определяли его положением (размером) по отношению к фрагментам стандартных маркеров.

Исследованиями установлено, что РГА имеет недостаточный уровень чувствительности и специфичности. ОТ-ПЦР дает возможность достоверно подтвердить наличие в материале рибонуклеиновой кислоты ВГБК, однако эта пара праймеров не дает возможности определить генотип возбудителя. Возбудителя выделено из материалов от кроликов частных хозяйств Сумской, Черкасской, Полтавской, Киевской и Харьковской областей.

Ключевые слова: вирусная геморрагическая болезнь кроликов, диагностика, полимеразная цепная реакция.

ПАМ'ЯТКА ДЛЯ АВТОРІВ СТАТЕЙ

Мови видання - українська, російська, англійська.

РЕДАКЦІЙНА ПОЛІТИКА ЩОДО ПУБЛІКАЦІЙ

1. До збірника приймаються статті проблемно-постановчого, узагальнюючого та методичного характеру, в яких висвітлюються результати наукових досліджень з статистичною обробкою даних, що мають теоретичне та практичне значення, актуальні для сільського господарства які раніше не публікувались.

2. Автори несуть відповідальність за оригінальність (плагіат) тексту наукової статті, достовірність наведених фактів, цитат, статистичних даних, власних назв, географічних назв та інших відомостей, а також за те, що в матеріалах не містяться дані, що не підлягають відкритій публікації.

3. Автори дають згоду на збір і обробку персональних даних з метою включення їх в базу даних відповідно до Закону України № 2297-VI «Про захист персональних даних» від 01.06.2010 р. Редакція збірника гарантує, що особисті дані, окрім тих, що публічно подаються у статті, будуть використовуватись виключно для виконання внутрішніх завдань редакції та не будуть поширюватись і передаватись стороннім особам.

4. Автори, які є здобувачами наукового ступеня кандидата наук, аспіранти та магістри повинні вказати наукового керівника.

ПОРЯДОК ПОДАННЯ НАУКОВОЇ СТАТТІ

До редакції збірника на електронну адресу bioresurs.ck@ukr.net надсилається електронний пакет документів:

- відомості про авторів (формат файлу *.docx або *.doc);
- наукова стаття (формат файлу *.docx або *.doc);
- оригінал зображень та графіки в електронному вигляді, формату (*.jpg, *.png, *.gif тощо), але не у вигляді текстового документу;
- рецензія, підписана доктором або кандидатом наук і завірена печаткою тієї установи, де працює рецензент (кольорова сканована копія);
- лист-клопотання завірений печаткою тієї установи, де працює автор із проханням публікації (кольорова сканована копія);
- експертний висновок про те, що в матеріалах не містяться дані, які не підлягають відкритій публікації (кольорова сканована копія).

1. Назва кожного документу повинна починатися з Прізвища Ім'я По-батькові автора (*Приклад: Прізвище І.П. Відомості про авторів.; Прізвище І.П. Стаття.; Прізвище І.П. Малюнок1.; Прізвище І.П. Графік1.; Прізвище І.П. Рецензія.; Прізвище І.П. Клопотання.; Прізвище І.П. Експертний висновок.*).

2. Після отримання та розгляду редколегією наукової статті авторам буде надіслано відповідне повідомлення на електронну пошту.

3. Остаточне рішення про публікацію ухвалює редколегія, яка також залишає за собою право на додаткове рецензування, редагування і відхилення наукових статей.

4. Матеріали, оформлені з відхиленням від зазначених нижче вимог щодо порядку подання та оформлення наукової статті, редколегія не розглядає.

ВИМОГИ ОФОРМЛЕННЯ НАУКОВОЇ СТАТТІ

1. До розгляду приймаються наукові статті обсягом 5-12 сторінок тексту, формат паперу - А4, орієнтація - книжкова, поля з усіх сторін - 20 мм, міжрядковий інтервал - 1, кегль шрифту - 12, гарнітура - Times New Roman, абзацний відступ 1,25 см (для основного тексту анотацій і статті).

2. Структура наукової статті:

- **УДК** (вирівнювання по лівому краю, шрифт - напівжирний).
- **НАЗВА НАУКОВОЇ СТАТТІ** (вирівнювання по центру, шрифт - напівжирний, великі літери);
- Прізвище та ініціали автора (співавторів, вирівнювання по центру, шрифт - звичайний);
- *науковий ступінь, вчене звання, місце роботи* (повна назва структурного підрозділу, вирівнювання по центру, шрифт - звичайний курсив);
- *Анотація основною мовою статті* (вирівнювання по ширині, кегль шрифту - 12, курсив). Обсяг анотації повинен бути не менше 2000 знаків (враховуючи не друковані знаки), містити основні висновки та результати роботи;
- **Ключові слова:** від 5 до 10 слів (вирівнювання по ширині, кегль шрифту - 12, напівжирний курсив);
- Текст наукової статті (вирівнювання по ширині, кегль шрифту - 12, міжрядковий інтервал - 1, абзацний відступ - 1,25 см) із зазначенням наступних елементів:

Актуальність, де висвітлюється важливість дослідження

Мета дослідження, де вказуються мета і завдання наукового дослідження.

Матеріали і методи дослідження, де висвітлюються основні методи і прийоми, застосовані у науковій статті.

Результати дослідження та їх обговорення, де висвітлюються основні отримані результати дослідження, подані у науковій статті;

Висновки і перспективи, де подаються конкретні висновки за результатами дослідження та перспективи подальших розробок.

Література (не менше 8-ми джерел) у порядку згадування або у алфавітному порядку (автоматична нумерація списку, кегль шрифту - 12, міжрядковий інтервал - 1, вирівнювання по ширині). Оформляється за міждержавним стандартом ДСТУ ГОСТ 7.1:2006. Посилання оформляються у квадратних дужках.

References транслітерований (автоматична нумерація списку, кегль

шрифту - 12, міжрядковий інтервал - 1, вирівнювання по ширині).

- *Переклад НАЗВИ СТАТТІ, Прізвище ініціали автора та Анотації з Ключовими словами* двома мовами (вирівнювання по ширині, кегль шрифту - 12, курсив).

3. В наукових статтях не допускається автоматичних переносів слів та використання макросів. Абзаци позначати тільки клавішею “Enter” з використанням функції відступів, суворо заборонено застосовувати пробіли або табуляцію (клавіша “Tab”) для абзацування в статті. Не допускається використання ущільненого або розрідженого шрифту:

- **Табличний та графічний матеріал** може бути лише книжкового формату, а його кількість доречною.
- **Таблиця** повинна мати порядковий номер, вказується зліва перед назвою таблиці. Назва таблиці подається над таблицею (кегль шрифту - 12, напівжирний, міжрядковий інтервал - 1,5, вирівнювання по ширині). Текст таблиці подається гарнітурою Times New Roman (кегль шрифту - 10, міжрядковий інтервал - 1).
- **Рисунок** повинен мати порядковий номер та бути цілісним графічним об'єктом (згрупованим); номер і назва вказуються поза об'єктом (кегль шрифту - 12, напівжирний, міжрядковий інтервал - 1, розміщення по ширині).
- Формули (зі стандартною нумерацією) виконуються в редакторі Microsoft Equation.

