МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

Спеціальність 211 «Ветеринарна медицина».

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
В.о.зав. кафедри фізіології та біохімії
с.-г. тварин
к. вет. наук, доц. _____ Владислав ЧУМАК
« » _____ 2022 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ ІНТЕСТИНАЛЬНОЇ СИСТЕМИ ЗА ЕПІДЕМІЧНОЇ ДІАРЕЇ СВИНЕЙ В УМОВАХ НАУКОВО-ДОСЛІДНОГО ЦЕНТРУ БІОБЕЗПЕКИ ТА ЕКОЛОГІЧНОГО КОНТРОЛЮ РЕСУРСІВ АГРОПРОМИСЛОВОГО КОМПЛЕКСУ ДНІПРОВСЬКОГО ДЕРЖАВНОГО АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНОГО УНІВЕРСИТЕТУ

26.06 – ДР. 761 22 04 15. 017. ПЗ

Здобувач вищої освіти _____ Едуард РОМАНЕНКО

Керівник дипломної роботи
док. вет. наук, проф. _____ Дмитро МАСЮК

Консультанти:
з охорони праці
канд. с.-г. наук, доц. _____ Валентина САПРОНОВА

з економічних питань
канд. вет. наук, доц. _____ Володимир ЗАЖАРСЬКИЙ

Дніпро – 2022

ЗМІСТ

Р Е Ф Е Р А Т	3
А Н О Т А Ц І Я	4
В С Т У П	6
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Роль бар’єрної функції інтестинальної системи в патогенезі інфекційних хвороб свиней	8
1.2 Роль адгезивних та імунних молекулярних маркерів у формуванні бар’єрної функції тонкого кишечника	14
1.3. Характеристика епідемічної діареї свиней	18
2. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ	22
2.1. Матеріал і методи досліджень	22
2.2. Характеристика науково-дослідного центру	38
2.3. Результати власних досліджень та їх аналіз	45
2.3.1. Оцінка патоморфологічних змін 12- палої кишки за епідемічної діареї свиней	45
2.3.2. Інтенсивність ураження клітин тонкої кишки за епідемічної діареї свиней	48
2.3.3. Динаміка рівня специфічних до вірусу епідемічної діареї свиней антитіл у сироватці крові інфікованих тварин	50
2.3.4. Адаптивна імунна відповідь у тонкий кишці поросят за епідемічної діареї свиней	52
2.3.5. Цілісність епітеліального бар’єру тонкої кишки свиней за епідемічної діареї свиней	54
2.4. Розрахунок економічної ефективності ідентифікації молекулярних маркерів	57
3.ОХОРОНА ПРАЦІ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ	60
3.1. Аналіз стану охорони праці в умовах НДЦ	60
3.2. Аналіз небезпечних та шкідливих виробничих факторів	62
3.3. Пожежна безпека	65
ВИСНОВКИ	66
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	68
ДОДАТКИ	75

РЕФЕРАТ

Дипломна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів власних досліджень та їх аналізу, розрахунку економічної ефективності, охорони праці, висновків та пропозицій виробництву, списку використаних літературних джерел та додатків. Список використаних літературних джерел нараховує 61 найменування, з них 51 латиницею. Робота викладена на 77 сторінках комп'ютерного тексту, ілюструє 18 рисунків та 4 таблиці.

Метою дослідження було встановити молекулярні маркери бар'єрної функції інтестинальної системи та з'ясувати їх прогностичне значення за епідемічної діареї свиней.

У дипломній роботі розкрито роль молекулярних маркерів бар'єрної функції інтестинальної системи. Доведене їх прогностичне значення в адаптивній імунній відповіді та у формуванні цілісності епітеліального бар'єру інтестинальної системи при епідемічній діареї свиней. Встановлено, що ізотонічний білковий розчин "Tonisity Px" виявляє протекторні властивості щодо цілісності бар'єрної функції кишечнику поросят. Внаслідок цього знижується динаміка екскреції вірусу ЕДС та зростає динаміка синтезу специфічних антитіл.

Доведено, що відносний вміст інтерферону-альфа характеризується хвилеподібною динамікою та корелює з часом протікання інфекції, в той час як відносний вміст Е-кадгерину спадає. Разом, зміни вмісту цих маркерів клітинної відповіді можливо використовувати як прогностичний показник розвитку епідемічної діареї свиней.

Проведення ідентифікації адгезивних та імунних маркерів інтестинальної системи свиней за допомогою метода імуноблотингу приносить лабораторії чистого прибутку на суму 170,96 грн за дослідження однієї проби.

Розгляд результатів дипломної роботи були винесені у вигляді доповіді на VII Міжнародної науково-практичної конференції викладачів та здобувачів вищої освіти «Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи» яка відбулася 16-17 червня 2022 року.

А Н О Т А Ц І Я

Дипломна робота Романенка Е.Р на тему «Ідентифікація та прогностичне значення молекулярних маркерів інтестинальної системи за епідемічної діареї свиней в умовах Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів агропромислового комплексу Дніпровського державного аграрно-економічного університету.

У дипломній роботі розкрито роль молекулярних маркерів бар'єрної функції інтестинальної системи. Доведене їх прогностичне значення в адаптивній імунній відповіді та у формуванні цілісності епітеліального бар'єру інтестинальної системи при епідемічній діареї свиней. Встановлено, що ізотонічний білковий розчин "Tonisity Px" виявляє протекторні властивості щодо цілісності бар'єрної функції кишечника поросят. Внаслідок цього знижується тривалість екскреції вірусу ЕДС та зростає динаміка сероконверсії до збудника ЕДС специфічних антитіл в сироватці крові поросят.

Доведено, що відносний вміст інтерферону-альфа збільшується з часом протікання інфекції, в той час як відносний вміст Е-кадгерину спадає. Це, ймовірно, вказує на те що певна ступінь руйнування ентероцитів викликає відповідну імунну відповідь, що супроводжується модуляцією імунної відповіді та втратою адгезивної міцності. Разом, зміни вмісту цих маркерів клітинної відповіді можливо використовувати як прогностичний показник розвитку епідемічної діареї свиней.

Ключові слова: молекулярні маркери, Е-кадгерин, інтерферон-альфа, бар'єрна функція, інтестинальна система, епідемічна діарея свиней.

SUMMARY

Thesis Romanenko E.R. on "Identification and prognostic value of molecular markers of the intestinal system in epidemic diarrhea of pigs in the Research Center for Biosafety and Environmental Control of agro-industrial resources of the Dnieper State Agrarian Economic University.

The thesis reveals the role of molecular markers of the barrier function of the intestinal system. Their prognostic value in the adaptive immune response and in the formation of the integrity of the epithelial barrier of the intestinal system in epidemic diarrhea in pigs has been proven. It has been established that the isotonic protein solution "Tonisity Px" has protective properties in relation to the integrity of the barrier function of the intestines of piglets. As a result, the dynamics of PEDV virus excretion decreases and the dynamics of specific antibody synthesis increases.

It has been shown that the relative content of interferon-alpha increases with the time of infection, while the relative content of E-cadherin decreases. This probably indicates that a certain degree of enterocyte destruction elicits an appropriate immune response, accompanied by modulation of the immune response and loss of adhesive strength. Together, changes in the content of these markers of cellular response can be used as a prognostic indicator of the development of epidemic diarrhea in pigs.

Key words: molecular markers, E-cadherin, interferon-alpha, barrier function, intestinal system, swine diarrhea

ВСТУП

На сьогодні однією з головних проблем свинарства є висока летальність серед поросят раннього постнатального періоду онтогенезу. Особливо небезпечними для поросят стають кишкові інфекції різної етіології. Кишечник - це зона, в якій організм зустрічає більше подразників, ніж будь-яка інша ділянка організму. Крім функцій травлення, всмоктування поживних речовин з корму, обміну води та електролітів, вироблення ендокринних і паракринних гормонів, кишечник повинен протистояти різним патогенам.

Поверхня слизової оболонки кишечника, яка складається з численних спеціалізованих компонентів, неоднорідних типів клітин та міжклітинних поліпептидних з'єднань, утворює один з основних фізіологічних бар'єрів, що захищає тварину від поширення інвазій та патогенів.

До міжклітинних адгезивних з’єднань відносять катеніни, інтегрини та кадгерини, основним з яких є Е-кадгерин. Руйнування ентероцитів та вивільнення Е-кадгерину пов'язане з порушеним гомеостазом кишечника і бар'єрними функціями, що призводить до стимуляції імунокомпетентних клітин, генеруючи імунну відповідь.

Одним з етіологічних факторів руйнування клітин слизової оболонки є вірусні кишкові інфекції, зокрема таких, як епідемічна діарея свиней (ЕДС).

Потрапляючи в організм свині, вірус починає свою репродукцію в цитоплазмі ентероцитів, спричинюючи дегенерацію клітин та вкорочення ворсинок.

Для діагностики збудника ЕДС використовують методи молекулярно-генетичного та імуноферментного аналізу, але оцінити ступінь ураження тонкої кишки та адаптивні властивості імунокомпетентних клітин слизової оболонки можливо лише завдяки ідентифікації специфічних молекулярних маркерів інтестинальної системи. Однак дані щодо визначення молекулярних маркерів інтестинальної системи свиней за ЕДС, як

прогностичного показника, відсутні, тому це питання залишається відкритим.

Мета дослідження: встановити молекулярні маркери бар'єрної функції інтестинальної системи та з'ясувати їх прогностичне значення за епідемічної діареї свиней.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

– встановити особливості патоморфологічних змін 12- палої кишки за епідемічної діареї свиней;

– визначити інтенсивність ураження клітин тонкої кишки за епідемічної діареї свиней;

– дослідити динаміку рівня специфічних до вірусу епідемічної діареї свиней антитіл у сироватці крові інфікованих тварин;

– з'ясувати ефективність адаптивної імунної відповіді за вмістом альфа-інтерферону у тонкій кишці свиней при епідемічної діареї свиней;

– встановити показники цілісності епітеліального бар'єру за вмістом Е-кадгерину у тонкій кишці свиней при епідемічній діареї свиней;

– розрахувати економічну ефективність ідентифікації молекулярних маркерів бар'єрної функції кишечника за епідемічної діареї свиней.

Об'єкт дослідження – роль молекулярних маркерів міжклітинної адгезії та адаптивної імунної відповіді в індукції порушень бар'єрної функції та морфо-функціональних змін інтестинальної системи за епідемічної діареї свиней.

Предмет дослідження – тонка кишка, Е-кадгерин, альфа-інтерферон, специфічні антитіла та кількість РНК вірусу епідемічної діареї свиней.

Методи дослідження – клінічні, морфологічні, імунохімічні методи (імуноблотинг, ІФА), ПЛР, статистичні.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Роль бар’єрної функції інтестинальної системи в патогенезі інфекційних хвороб свиней

Поверхня слизової оболонки кишечника утворює один з основних фізіологічних бар'єрів, що захищає тварину від інвазій та системного поширення патогенів. Шлунково-кишковий тракт разом з лімфоїдною тканиною, пов’язаною з кишечником, є специфічною системою, яка постійно стикається з певними подразниками [19].

Кишечник – це область, де організм зустрічає більше антигенів, ніж будь-яка інша ділянка організму. Окрім функцій перетравлення, всмоктування нутрієнтів з корму, обміні води та електролітів, виробленні ендокринних і паракринних гормонів, кишечник повинен швидко розрізняти інвазійні патогени та нешкідливі харчові антигени, а також мікроорганізми, які утворюють мікробіоту [47].

Для патогенів вірусної етіології основними воротами входу є слизові оболонки та шкіра. Ентероінвазійні патогени викликають сильну імунну відповідь, яка захищає шлунково-кишковий канал, а тим самим і господаря, від розвитку захворювання та подальшого поширення патогенів. В результаті для підтримки цілісності слизових поверхонь повинні були розвинутися специфічні механізми, що відповідають за індукцію толерантності [18].

Шлунково-кишковий тракт розвивався разом з кишковими мікроорганізмами, що призвело до розвитку імунної толерантності. Втрата кишкової бар'єрної функції сприяє виникненню запалення кишечника, що може привести до розвитку запальних захворювань в цілому в організмі [22].

Фізичний бар'єр в шлунково-кишковому каналі формується епітеліальними клітинами. Тонка та товста кишка утворюють більшу

частину шлунково-кишкового тракту і епітеліальні клітини в цих зонах відрізняються своєю структурою та складом. Тонка кишка складається з трьох відділів: дванадцятипалої кишки, порожньої та клубової. Ворсинки слизової оболонки збільшують її площу і швидкість адсорбції поживних речовин, які завдяки ферментам перетравлюються в дванадцятипалій кишці. Крім того, відбуваються інвагінації слизової оболонки тонкої кишки, утворюючи крипти Ліберкюна, які складаються, переважно, з проліферуючих стовбурових клітин, локалізованих біля основи крипт [45].

Постійне ділення стовбурових клітин, розташованих біля основи крипт Ліберкюна, що перетинаються з клітинами Панета, породжує клітини-попередники, що диференціюються в зрілі ентероцити. Клітини Панета, завдяки близькості стовбурових клітин і секреції специфічних медіаторів захищають ентероцити. Крім того, вони є основним джерелом антимікробних пептидів, що містяться в слизу тонкої кишки, і відповідають за контроль мікробіоти кишечника, запобігання її розростання та розвитку запалення [40].

Ентероцити, абсорбтивні клітини, складаються з найчисленніших популяцій, і разом з клітинами келихів зустрічаються в криптах і фолікуло-асоційованому епітелії. Келихоподібні клітини відповідають за формування шару слизу, що покриває епітелій тонкої кишки, за рахунок секреції муцину.

Бар'єр слизу в тонкому кишечнику запобігає подразненню епітеліальних клітин. Фолікуло-асоційований епітелій містить розсіяні, позбавлені слизового шару макрофаги, які беруть участь у прояві специфічної імунної відповіді [55]. Ентероендокринові клітини розповсюджені в слизовій оболонці кишечника. Вони беруть участь у вироблені пептидів і гормонів, які стимулюють, серед іншого, перистальтику кишечника. Порушення бар'єру слизу призводить до проникнення і прямого контакту епітеліальних клітин з мікроорганізмами.

Це призводить до розвитку запального процесу, реакції нейтрофілів, стимуляції Т-клітин і В-клітин, а також секреції інтерферонів [13]. Запальна реакція призводить до травмування епітеліальних клітин.

Епітелій кишечника являє собою найбільш регенеруючу структуру клітин у ссавців. Для епітеліальної цілісності ці клітини постійно замінюються проліферуючими клітинами, отриманими зі стовбурових клітин кишечника, локалізованих в криптах Ліберкюна і криптах товстої кишки. Вони рухаються вниз до крипт, де вони дозрівають, і починають відігравати вирішальну роль у підтримці гомеостазу кишечника. Епітеліальні клітини можна відрізнити за здатністю до проліферації, швидкістю оновлення та віком [28].

Старі клітини піддаються апоптозу та їх вміст потрапляє в просвіт кишечника. Тим часом клітини Панета переміщуються з дна крипти клітинною фрагментацією і фагоцитуються макрофагами, які знаходяться в базальній мембрані [20]. Підраховано, що в гомеостатичних умовах всі ентероцити замінюються кожні 4-5 діб [11_bookmark12_bookmark13_bookmark16].

Макрофаги можна знайти в ізольованих лімфоїдних фолікулах, апендиксі, товстих бляшках і лімфоїдній тканині [29_bookmark20]. Всі ці популяції епітеліальних клітин кишечника взаємодіють, утворюючи захисний бар'єр. У той же час епітеліальні клітини служать сполучною ланкою з імунокомпетентними клітинами, локалізованими в базальній мембрані, посилаючи інформацію через прямий контакт клітин або медіаторів, тим самим гарантуючи імунну відповідь.

В цьому криптах знаходяться різноманітні популяції Т-клітин і В-клітин ізотипів IgA, IgG і IgM. Бактерії, які проникли в епітеліальний бар'єр, не викликаючи більш сильної імунної відповіді, видаляються резидентними макрофагами, а при запаленні в цю область приходять інші популяції макрофагів [44].

Особливе значення мають В-клітини, які активуються за допомогою макрофагів. В-ліфмоцити виділяють IgA, який передається трансцитозом через ентероцити в просвіт, контролюють мікробіоту кишечника. Ці взаємодії, що відбуваються в базальній мембрані, є двонаправленими, а імунокомпетентні клітини через вивільнені медіатори впливають на фізіологію епітелію [38, 61].

Участь епітеліальних клітин у формуванні захисного бар'єра гастро-ентистинальної системи. Основними функціями епітеліальних клітин в шлунково-кишковому тракті є «сегрегація» і «посередництво» для підтримки гомеостазу. Термін «сегрегація» - це просто відділення мікроорганізмів в просвіт кишечника від стерильної глибокої тканини. Цей поділ досягається, частково, шляхом формування двох типів бар'єрів: фізичних і хімічних, для просторової ізоляції патогенів кишечника та імунних клітин, локалізованих в базальній мембрані, щоб запобігти розвитку запалення.

Фізичний бар'єр, який зазвичай розглядається як монолітна структура, насправді складається з численних спеціалізованих компонентів, неоднорідних типів клітин і міжклітинних білкових з'єднань [58]. З іншого боку, термін «посередництво» являє собою транспортування сигналів від патогенів до імунних клітин господаря. Епітеліальні клітини здатні реагувати на сигнали, що надходять з мікроорганізмами або їх метаболітами, а також сигнали, що поставляються імунними клітинами кишечника через прямий контакт клітин або хемокінів і цитокінів.

Секреція таких медіаторів призводить до мобілізації захисних імунних механізмів або індукування імунної толерантності. Фізичний бар'єр складається з шару слизу, який покриває поверхню стінки шлунково-кишкового каналу, глікокаліксу на мікроворсинках абсорбтивних ентероцитів, і клітинних з'єднань, відповідальних за

щільну герметизацію епітеліальних клітин, утворюючи бар’єр, непроникний для патогенів.

Хімічний бар'єр складається з багатьох складових, таких як травні кислоти, що виділяються шлунково-кишковим каналом, травні ферменти, мукополісахариди, глікопротеїди, гліколіпіди та інші сполуки, визначені як антимікробні пептиди.

Перший бар'єр в шлунково-кишкового тракту – це слиз. Він покриває слизову оболонку кишечника, утворюючи перешкоду, яка захищає від зв'язування і інфільтрації епітелію не тільки з бактеріями, але і кишковими вірусними інфекціями, а також перетравленими харчовими антигенами і токсинами, пов'язаними з їжею.

Слиз, який постійно виділяється, утворює захисний шар, має дуже важливу особливість – в'язкість, яка збалансована для забезпечення захоплення патогенів, але в той же час дозволяє протікати по слизовій поверхні. Цей захисний шар виявляє різні властивості в шлунку, тонкому кишечнику, товстій кишці. Слиз, в'язка рідина, виділяється келихоподібними клітинами, названими за своєю формою, що відрізняється здатністю зберігати і виділяти гранули в просвіт кишечника.

Основним джерелом слизу є келихоподібні клітини. Вони присутні по всій довжині кишечника, хоча зустрічаються в більших кількостях в криптах, ніж на ворсинках в тонкий кишці, і у верхніх криптах в товстій кишці.

Келихоподібні клітини, мігруючи з дна крипт вгору, заповнюють свої секреторні гранули, розташовані нижче верхівкової мембрани, основним компонентом яких є муцин, який є захисним фактором тканин. Він сприяє відновленню епітелію та відновленню слизової оболонки шляхом пригнічення апоптозу, міграції клітин та допомагає ангіогенезу [11, 17]. bookmark43

Слиз, що виділяється епітеліальними клітинами, утворює шар, що захищає епітеліальні клітини від колонізації бактеріями або навіть порушення цього тонкого фізичного бар'єру.

Найбільш численними популяціями серед епітеліальних клітин кишечника є ентероцити в тонкому кишечнику і колоноцити в товстому кишечнику. Ентероцити структурно поляризовані верхівковою поверхнею, спрямованою в просвіт, і базальною поверхнею, зверненою до базальної мембрани.

На верхівковій ділянці ентероцити утворюють мікроворсинки, виступи на основі актину, які збільшують абсорбтивну поверхню поживних речовин [41, 50_ bookmark24]. Абсорбційні ентероцити опосередковано транспортують IgA та IgM від базальної мембрани через епітеліальний бар'єр до слизових поверхонь [53, 58].

Мікроворсинки полегшують транспортування багатьох молекул (поживних речовин, мікроелементів, вітамінів, води, солей жовчі), однак вони не тільки знаходяться в постійному контакті з можливими ентеропатогенами, але і піддаються механічним впливам, пов'язаним з перистальтикою.

Над мікроворсинками утворюється багатий вуглеводами глікокалікс, який діє як захисний шар між слизом і основними епітеліальними клітинами. Шар глікокаліксу містить епітеліальні мембранні гліколіпіди і глікопротеїни, які діють як адгезійні рецептори для мікроорганізмів [45]. Таким чином, глікокалікс працює як механізм кріплення для мікробіоти і обмежує область потужної колонізації для патогенів. Крім того, глікокалікс допомагає в змащенні і гідрофобності слизових поверхонь [25_ bookmark46].

1.2. Роль адгезивних та імунних маркерів у формуванні бар’єрної функції тонкого кишечника

Епітелій кишечника утворює захисний шар для підтримки бар'єрної цілісності і обмеження надходження мікроорганізмів і токсинів, і в той же час допускає проникнення необхідних іонів, поживних речовин, води.

Навіть якщо мікроорганізми проникають в шар слизу в тонкому кишечнику, внутрішній шар слизу в товстій кишці або глікокаліксі, вони зустрічають бар'єр на рівні епітеліальних клітин, утворених структурою, що складається з трьох з'єднань, від верхівкових до базальних: щільних з'єднань, прилипних з'єднань і десмосом.

Прилипні з’єднання і десмосоми забезпечують клейові та механічні властивості, які сприяють бар'єрній функції, в той час як щільні з’єднання утворюють не тільки тісні зв'язки, а складають зв'язки між епітеліальними клітинами, які фізично блокують патогенну інвазію. Також вони ущільнюють міжклітинний простір та щільно обмежують транспортування гідрофільних молекул [15, 51._bookmark48].

Прилипні з’єднання утворюються між клітинними поліпептидами, такими як катеніни, кадгерини та інтегрини, які приймають участь у адгезії поверхні клітин, забезпечуючи механічну міцність між клітинами. Крім того, вони відповідають за зв'язування з цитоскелетом і, таким чином, беруть участь у клітинних сигнальних механізмах. Кадгерини присутні на мембранах суміжних клітин, що зв'язують один одного. Е-кадгерин, основна складова прилипних з’єднань, утворює гомофільні клітинні взаємодії і внутрішньоклітинно зв'язується з катенінами (α-катенін, β-катенін, p120-катенін), який пов'язує Е-кадгерин з цитоскелетом [12, 35_bookmark50].

Експресія Е-кадгерину відносно постійна в тонкий і товстій кишці. Порушення експресії Е-кадгерину в кишечнику пов'язане з порушеним гомеостазом кишечника і бар'єрними функціями.

Надмірна кількість Е-кадгеріну в кишечнику призводить до затримки міграції клітин з крипти у ворсинки, пригнічуючи їх проліферацію та індукцію апоптозу в крипті, а також затримуючи диференціацію ентероцитів. Втрата Е-кадгерину викликає, серед іншого, прискорену міграцію клітин і аберантну диференціацію, а також вкорочення ворсинок [14, 26, 27 _bookmark55]. Е-кадгерин необхідний для підтримки архітектури і функції епітеліуму, оскільки недостатня кількість цього білка впливає на клітини Панета і дозрівання клітин келихів [39].

Десмосоми, подібно до прилипних з’єднань, забезпечують механічну міцність для клітинних з'єднань, включаючи трансмембранні білки, так звані дезмосомальнимі кадгеріни, розділені на типи дезмогліну та дезмоколліну. Вони рясніють також в тканинах з високим механічним впливом. Обидва типи демосомальних кадгеринів необхідні для клітинної адгезії, утворюючи гомо- і гетерофільні взаємодії. Дезмосомальний кадгерин необхідний для цілісності епітеліального бар'єру шлунково-кишкового тракту.

Апікально розташований комплекс щільних з’єднань генерується трансмембранними білками і відіграє вирішальну роль у підтримці гомеостазу кишечника, а також в контролі проникності параклітинного транспортного шляху. Щільні з’єднання утворюють безперервний зв’язок білків між мембранами сусідніх клітин, повністю закриваючи верхівковий міжклітинний простір.

Крім того, деякі компоненти щільних з’єднань самі по собі складають межу всередині мембрани, обмежуючи міграцію трансмембранних білків і ліпідів з верхівкової в базальну сторону і беручи участь в поляризації ентероцитів [39, 56 _bookmark63 _bookmark62 _bookmark64 _bookmark65]. Утворення комплексу щільних з’єднань засноване на трансмембранних білках, які в основному належать до двох груп: сімейство клаудинів, що містить білки (окклудин, трицелюлін) та молекули адгезії переходів [60].

Ці трансмембранні структури перекриваються цитоскелетом актину та іншими сигнальними білками. Шар щільних з’єднань утворюється білками адаптера периферичної мембрани, зонулами-окклюденами-1(далі ZO-1), а також цингуліном, цингуліноподібними білками та афадином. Щільні з’єднання встановлюють основу першої лінії оборони господаря шляхом герметизації порталу входу для патогенів.

Різні екзогенні і ендогенні фактори регулюють цілісність цього шару і, як наслідок, проникність стінки кишечника. Окклудин сильно виражений при міжклітинному контакті і забезпечує структурну цілісність через взаємодію з ZO-1, а фосфорилювання окклудину регулює стабільність щільних з’єднань, а також проникність [11].

Клаудини відповідають за регуляцію параклітинного простору. Позаклітинні петлі клаудину беруть участь у гетеро- або гомофільних взаємодіях з сусідніми клітинами, які генерують бар'єри для проходження селективних молекул в парацелілукулярному шляху [31_bookmark71].

Зміни в профілях клаудину в межах щільного шару впливають на цілісність кишкового бар'єру, в залежності від ізоформи клаудину. ZO-1, ZO-2, ZO-3 з'єднують клаудин і окклудин з цитоскелетом актину, і ці білки взаємодіючі підтримують функцію і розташування міжклітинного щільного з’єднання [59]

Адгезивні білки в кишечнику ущільнюють епітеліальні клітини, утворюючи ефективну блокаду, яка захищає проти вторгнення патогенів і будь-яких змін, які можуть зашкодити господареві. Непроникний кишковий бар'єр створює мішень для патогенних мікроорганізмів. У багатьох випадках патогени використовують фактори вірулентності для від'єднання адгезивних білків від з'єднувального комплексу.

Порушення цього бар'єру патогенами стимулює імунокомпетентні клітини, локалізовані в базальній мембрані, викликаючи імунну відповідь, що призводить до посилення дисрегуляції кадгеринів, що сприяє розвитку запалення.

Молекули інтерферонів є ключовими компонентами вродженого імунітету у відповідь на вірусну інфекцію. Існує 3 типи інтерферонів (1, 2 і 3) та нещодавно було виявлено інтерферон лямбда [30].

Нещодавно було показано, що інтерферон лямбда переважно діє в органах слизової оболонки, включаючи епітеліальні поверхні печінки, дихальної та шлунково-кишкової системи, які є основними точками входу для багатьох патогенів [29]. Подібно до інтерферону 1 типу, інтерферон лямбда швидко виробляється після інфікування і, після взаємодії з вірусним рецептором, індукує експресію гена, стимульованого інтерфероном, що опосередковано проявляє противірусну активність.

Наявність достатньої кількості молекул інтерферона-альфа в лімфоцитах слизової оболонки кишечника потрібна для активації максимальної імунної реакції. Також молекула інтерферону альфа може частково замінювати молекули інтерферону гамма в процесі імунної відповіді [30, 31].

Доведено, що на відміну від інтерферонів типу 1, які націлені на різні типи клітин і органів, інтерферон лямбда в основному діє на епітеліальні клітини слизової оболонки і проявляє потужну противірусну активність на її поверхні. Існують данні про те, що свинячий інтерферон альфа пригнічує репродукцію вірусу ЕДС в клітинах слизової оболонки кишечника, тому питання використання інтерферону-альфа як терапевтичний засіб в боротьбі з ЕДС у поросят дуже актуальне [14, 29].

За даними деяких авторів [15, 16], при штучному ураженні поросят вірусом трансмісивного гастроентериту інтерферон альфа, який виділяється в кров, має кишкове походження, оскільки за імуногістохімічними дослідженнями кількість цього маркеру в селезінці та периферичних лімфатичних вузлах була достатньо менша, ніж в

клітинах кишечника. Тому руйнування клітин слизової оболонки кишечника буде впливати на синтез та екскрецію інтерферону альфа.

Інтерферони проявляють високу противірусну активність в просвіті кишечника, а також в клітинах слизової оболонки поросят вже на ранніх стадіях інфікування. До цього, високий титр молекулярних маркерів виявляють в порожній та клубовій кишці, що вказує на можливість клітин слизової оболонки кишечника виділяти велику кількість інтерферону альфа під час гострої фази захворювання [15].

1.3 Характеристика епідемічної діареї свиней

Епідемічна діарея свиней – це гостра висококонтагіозна інфекційна хвороба, викликана вірусом родини Coronaviridea, роду Alphacoronavirus та характеризується гострою виснажливою діареєю та зневодненням організму хворих тварин незалежно від їх статі та віку [50].

Хвороба характеризується високою летальністю у поросят віком до 10 діб й може викликати зниження продуктивності в свиней на відгодівлі та є одним з етіологічних чинників абортів у поросних свиноматок.

Уперше хворобу виявили та описали в Європі, та згодом вірус поширився країнами Азії й Америки, ставши причиною економічних збитків у свинарстві [21].

Збудник ЕДС – одноланцюговий РНК-вмісний вірус, що належить до родини Coronaviridae. Він має спорідненість із вірусом трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС) [30]. Уперше вірус ідентифікували в 1978 р. у Великобританії як етіологічний чинник, що спричинив спорадичні спалахи діареї у свиней в Європі, набувши статусу ендемічної хвороби [46]. У країнах Азії вірус почали ідентифікувати з 1982 р., проте високовірулентний тип з 85–100 % захворюваністю та 40–85 % летальністю спеціалісти виявили лише в 2010-му. Сьогодні збудник епідемічної діареї

свиней є однією з основних причин економічних збитків у галузі свинарства [16, 50]. Перші спалахи ЕДС у США було зафіксували на початку квітня 2013 р., і відтоді щомісяця реєструють нові випадки захворювань. У 2014 р. хворобу було за реєстровано в країнах Європи й опубліковано дані про виявлення даного захворювання в Україні [7, 8]**.**

Епідеміологія . Фекально-оральний шлях передачі вірусу є основним за ЕДС. Ураження тварин відбувається при поїданні інфікованих кормів, котрі забруднені рештками фекалій із вмістом вірусу [34]. Не менш важливим є людський фактор, а саме взуття, одяг працівників, а також інструменти й обладнання, за допомогою якого вірус переміщується між приміщеннями й боксами. Одним з головних факторів, що забезпечує поширення збудника між приміщеннями та господарствами, – транспорт, оскільки він бере участь у роздачі та перевозці корму, транспортуванні свиней на м'ясопереробні підприємства, вивезенні санітарного браку [24]. Свині можуть інфікуватися збудником ЕДС вживаючи контаміновані корма, а також через гній, воду та сперму.

Патогенез. Після потрапляння збудника в організм тварини починається активна фаза репродукції вірусу в цитоплазмі ентероцитів тонкого кишечнику вже через 6–12 год після інокуляції [43]. Максимальну концентрацію вірусу спостерігають на 20–36-ту годину після інокуляції, що збігається з початком клінічних ознак. Унаслідок впливу вірусу вкорочується довжина ворсинок, що є причиною порушення бар'єрної функції кишечника та всмоктування поживних речовин, а постійне подразнення спричиняє розвиток профузних діарей [23].

Клінічні ознаки. Інкубаційний період становить 12–24 год. Основною клінічною ознакою розвитку хвороби є водянисті несформовані фекалії жовто-сіро-зеленого кольору. У дорослих свиней спостерігають прояв апатії та анорексії, інколи – у формі діареї. У свиноматок третього триместру вагітності спостерігають аборти. У поросят, яких відлучили від свиноматки, після гострої фази захворювання спостерігають діарею та виснаження, що

збігається з часом втрати колострaльних антитіл [38]. Хворіють свині всіх вікових груп. Інтенсивність хвороби може сягати 100 %. Летальність поросят до 10-добового віку внаслідок кахексії та дегідратації сягає 60–100 %, свині старших груп одужують після тижня хвороби.

Патоморфологія. При патологоанатомічному розтині свиней, загиблих від ЕДС, помітний катарально–геморагічний ентерит тонкого кишечника [37]. Слизова оболонка вкрита виразками та некротизованими ділянками, стінки тонкої кишки потоншені. Сама кишка, переважно порожня, місцями наповнена рідкими жовто–зеленими масами. В печінці, нирках та серці наявна зерниста дистрофія. Також спостерігають запалення брижевих лімфатичних вузлів. Загалом трупи зневоднені, виснажені, з ознаками анемії. При більш детальних патогістологічних дослідженнях виявляють некротичні зміни в епітелію тонкої кишки та її ворсинках. Також виявляють вакуолізацію клітин епітелію тонкого кишечника та їх відшаровування. Внаслідок цього зменшуються розміри ворсинок, що призводить до погіршення бар'єрної функції кишечника.

Діагностика. Під час гострого спалаху захворювання досліджують вміст кишечника та власне тканину кишечника на наявність РНК-вірусу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), що дає змогу відразу провести диференціацію від ТГС [9]. Кількість вірусу у досліджуваних зразках різко зменшується після завершення гострої фази захворювання, що зумовлене тиском колострaльних антитіл [54]. Доцільним є пошук специфічних антитіл у сироватці крові свиней-реконвалесцентів вже на 7-ому добу після перших клінічних ознак хвороби. Детекцію імуноглобулінів здійснюють серологічними методами – за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) та вірус-нейтралізації в культурах клітин [23]. Полімеразна ланцюгова реакція та імуноферментний аналіз мають високу чутливість та специфічність, але для проведення таких досліджень потрібне спеціальне обладнання та кваліфіковані спеціалісти, це ускладнює процес детекції безпосередньо на виробництві [32]. Для проведення експрес-діагностики в

умовах господарств розроблені набори для імунохроматографічного аналізу, які виявляють білки оболонки вірусів. Цей метод дозволяє провести дослідження протягом 10-15 хвилин, але є значно гіршим за ступенем чутливості і специфічності, тому підтвердження діагнозу методом ПЛР є обов'язковим.

Отже, епідемічна діарея свиней реєструються у продовж усього періоду життя, але особливо вразливі поросята підсисного періоду [9]. Вірус колонізує клітини слизової оболонки кишечника, розмножується, руйнує клітини, викликаючи при цьому діареї, що суттєво впливає на продуктивність тварин. Лікувально - профілактичні заходи під час виникнення кишкової інфекції не дають гарного результату в поросят, що призводить до високої летальності та суттєвих економічних збитків. З огляду на це, оцінки вмісту молекулярних маркерів в тканинах тонкої кишки, а саме Е-кадгерину та інтерферону альфа можуть стати вагомими прогностичними показниками в оцінці ефективності застосування лікувальних та профілактичних засобів проти кишкових інфекцій.

2. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали і методи дослідження

Дипломна робота виконана в умовах Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю агропромислового комплексу Дніпровського державного аграрно-економічного університету, у відділі імунохімії та молекулярно-генетичних досліджень та відділі морфологічних досліджень.

Експериментальну частину роботи проведено на базі віварію клініко-діагностичного центру ветеринарної медицини ДДАЕУ. Для досліду було сформовано 2 групи поросят 14 денного віку (по 16 поросят в кожній з масою тіла в середньому 2.9 кг) – контрольну та дослідну. Поросята утримувались в одному приміщенні, підлога бетонна, стіни вкриті кахлем. Температура в приміщенні була 18^0С. Впродовж експерименту поросята з однієї групи не контактували з поросятами з іншої групи, та з іншими тваринами. Знаходились поросята в спеціальних боксах, з решітчастою підлогою. Кожен бокс підігрівався зверху за допомогою інфрачервоної лампи. До початку експерименту в приміщенні проводилась механічна чистка з подальшою дезінфекцією 5% розчином «Мікасан», на вході в приміщення знаходиться дезінфікуючий килимок.

Поросятам піддослідних груп згодовували замінник цільного молока «ПрофіМілк Лакто Старт» (Україна), до складу якого входили сирий протеїн – 26,9%, жири – 13,4%, вуглеводи – 41,8%, клітковина – 3,5%, вітамін А – 40000 МО, вітамін D3 – 8000 МО, вітамін Е – 350 мг; престартовий комбікорм «Nutrimin» (Данія), до складу якого входили (на 1кг): сирий протеїн – 19,3%, сира зола – 5,95%, лактоза – 56,05г, кальцій – 7,44г, фосфор – 6,64г, натрій – 3,02г, цинк – 132мг, залізо – 180мг, вітаміни групи В – 6,07мг, вітамін А – 1000 МО.

Поросятам дослідної групи додатково до раціону вводили ізотонічний протеїновий розчин “Tonisity Px” (Ірландія), до складу якого входить,

сироватковий білок, сира клітковина, калію хлорид, натрію хлорид, декстроза, мононатрійфосфат та мінеральні речовини (Додаток 1).

Поросятам обох груп перорально, за допомогою одноразово шприця, вводили 1мл гомогенату з інокульованим вірусом ЕДС у концентрації 500 геном-еквівалентів. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та імуноферментного аналізу (ИФА) біологічний матеріал відбирали від тварин на 2-, 5-, 14-, 21- та 31-добу після інокуляції, а для проведення імуноблотингу та гістологічних досліджень на 5-, 14-, 21- та 31-добу (Рис. 1).

Рис. 1 Схема дослідження

Для проведення гістологічних досліджень та імуноблотингу поросят піддавали евтаназії в кожний запланований період досліду, та відбирали фрагменти 12- палої кишки. Для полімеразної ланцюгової реакції робили мазки з товстої кишки за допомогою свебів без транспортного середовища. Для імуноферментного аналізу відбирали кров в пробірки об'ємом 5 мл за допомогою голки Боброва методом пункції орбітального синусу. Відібрані проби одразу транспортувались до лабораторії.

Для проведення гістологічних досліджень з фрагментів 12- палої кишки виготовляли гістопрепарати, окрашені гематоксиліном та еозином, результати розглядали за допомогою світлового цифрового мікроскопу «ACCU-SCOPE 3000 Led Series» з цифровою камерою «ABAXIS Excelis HDS», США.

Для визначення інтенсивності ураження клітин тонкої кишки методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі використовували комерційну тест-систему «EXOPOL EXOone BASIC PEDV», Іспанія, з попередньою екстракцією нуклеїнових кислот набіром «BioExtract SuperBall» Іспанія, (Додаток 2, 3).

Для визначення рівня динаміки специфічних антитіл до вірусу ЕДС у сироватці крові методом імуноферментного аналізу користувались комерційною тест-системою «ID Screen® PEDV Indirect», Франція (Додаток 4).

Для ідентифікації молекулярного маркера адгезії користувались комерційним маркером «E-cadherin Antibody»(каталоговий номер sc-8426), а для ідентифікації молекулярного маркера імунної відповіді – «Interferon-α Antibody» (каталоговий номер sc-135665) компанії «Santa Cruz Biotechnology», США.

Відбір біологічного матеріалу здійснювався з дотриманням вимог Закону України від 21.02.2006 р. № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та відповідає основним принципам: «Європейської конвенції про захист тварин від жорстокого поводження,

захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних і наукових цілях» (Страсбург 1986), Декларації «Про гуманне поводження з тваринами» (Гельсінкі 2000) і Національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (Київ, 2001).

Одержані цифрові дані опрацьовували статистично: визначали середньоарифметичну величину (M) та її похибку (m). Імовірність різниць середніх значень встановлювали за критерієм Стьюдента. Зміни показників вважали достовірними за $p<0.05$, $p<0.01$. Розрахунки проводили за допомогою програмного комплексу «Microsoft Office Excel 2020».

Оцінка патоморфологічних змін 12- палої кишки за епідемічної діареї свиней

Шматочки відібраної 12- палої кишки мали розмір 2см^2 з товщиною 0,5-1,3мм. За 48 годин до відбору патологічного матеріалу підготували розчин формаліну. Для цього свіжий формалін нейтралізували, додавши до нього мелену крейду в співвідношенні на 1000 мл формаліну – 100 г крейди. Отриманий розчин через 48 годин використовували для виготовлення 10% розчину формаліну. Відібрані фрагменти тонкого кишечника фіксували в розчині формаліну протягом 24 годин. Після фіксації шматочки промивали проточною водою. Наступною після промивання маніпуляцією є зневоднення (дегідратація). Зневоднення здійснювали етанолом зростаючої концентрації, а саме 50-, 70-, 80-, 90–96 %-м. .Для цього заздалегідь приготували розчини етанолів потрібної концентрації, бравши за основу 96^0 етанол. При приготуванні робочих розчинів потрібної концентрації користувались формулою:

$$X=A\times B / C$$

де X – потрібна кількість етанолу;

A – потрібна кількість спирту;

B – необхідна міцність спирту;

С – міцність спирту, на базі якого готується спирт необхідної міцності.

При зневодненні шматочки кишечника ущільнюються. Їх потрібно поступово переносити в етаноли зростаючої концентрації. Час перебування шматочків органу в етанолі 1 година в кожній концентрації. При перекладанні шматочків із етанолу однієї концентрації в іншу користувались фільтрувальним папером. Надлишок етанолу у цьому разі видаляється і тільки потім шматочки перенесли в іншу банку з етанолом вищої концентрації. Помутнілий і зафарбований етанол замінювали на новий.

Після зневоднення шматочків кишечника переходили до етапу ущільнення. Для цього зразки помістили в розчин етанол-ксилолу у співвідношенні 3:1 на 2-3 години. Потім перенесли зразки в розчин ксилолу на 2-3 години. Наступним етапом є переведення шматочків у ксилол-парафін (насичений розчин при + 37 °С) на 1 годину. Після ксилол-парафіну шматочки занурювали в розплавлений парафін при температурі 55 °С на 2 години. Всі етапи ущільнення та робота з ксилолом та парафіном відбувалась в термостаті. Надалі просочені шматочки патматеріалу перенесли у паперову форму і заливали розплавленим парафіном. Остиглі блоки зберігали у сухому темному місці. Перед виготовленням зрізів парафінові блоки приклеювали на дерев'яні кубики.

Після застигання парафінових блоків приступали до етапу виготовлення зрізів. Для цього використовували санний мікротом «МС-2» (Рис. 2).

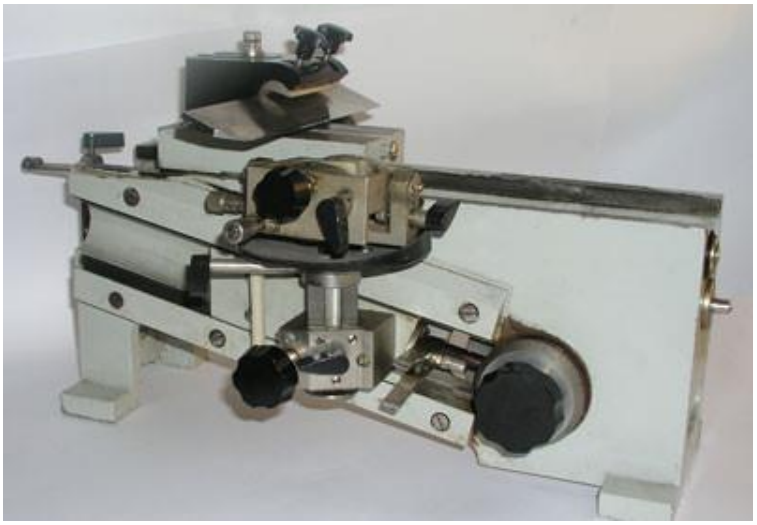


Рис. 2 Санний мікротом «МС-2» (Україна)

Брусочки з блоком, якому попередньо надавали форму чотирикутної призми із зрізаною вершиною, закріпляли у тримачі блоку. У спеціальний тримач вставляли і закріпляли мікротомний ніж. Потім підібрали кут різання і нахилу ножа. Механізмом мікроподачі підіймали блок до поверхні ножа. Рухами мікротомного ножа зрізали з вершини блока парафін до тих пір, поки в зріз не почав потрапляти матеріал. Після цього, за допомогою механізму мікроподачі, задавали товщину зрізів 5 мкм. Отримані зрізи зняли з ножа препарувальною голкою і перенесли у теплу (40 ºС) прокип'ячену воду поверхнею, яка прилягає до ножа. У теплій воді зрізи розплавляються. Після чого перенесли їх на предметні стекла та фіксували над полум'ям спиртівки.

Наступним етапом є фарбування гістозрізів. Користувались методом фарбування гематоксиліном та еозином.

Спочатку видалили зі зрізу парафін, занурivши його в розчин ксилолу на 1 хвилину. Потім видалили ксилол в 96° спирті протягом 1 хвилини та промили у дистильованій воді 2 хвилини. Після цього занурили предметне скло зі зрізом в розчин гематоксиліну на 2 хвилини. Потім промили зріз у дистильованій воді на 3 хвилини. Після промивки занурили зріз в розчин еозину на 2 хвилини, та промили у дистильованій воді – 1 хв. Наступним етапом є зневоднення в 96° спирті на 2 хв. Потім просвітлення в карбол-ксилолі на1 хвилину, та просвітлення в ксилолі теж на 1 хвилину. Після

цього зрізи заключали у бальзам. Досліджували готові зрізи методом світлової мікроскопії за допомогою цифрового мікроскопа «ACCU-SCOPE 3000 Led Series» з цифровою камерою «ABAXIS Excelis HDS» (Рис. 3).

Рис. 3 Світловий цифровий мікроскоп «ACCU-SCOPE 3000 Led Series» з цифровою камерою «ABAXIS Excelis HDS» (США).

Інтенсивність ураження клітин тонкої кишки за епідемічної діареї свиней

Гомогенізація біологічного матеріалу.

Одним із етапів полімеразної ланцюгової реакції є гомогенізація біологічного матеріалу. Для цього проби фекалій помістили в спеціальні пробірки об’ємом 2 мл з додаванням 500 мкл буферного лізуючого розчину “ATL Buffer ” виробництва Biosellal (Франція), та по 2 цирконієві кульки діаметром 2-3 мм. Пробірки перенесли у ротор приладу для гомогенізації «FastPrep24» (Рис. 4). Проби гомогенізовували протягом 40 секунд зі швидкістю 6 м/с та часом прискорення у 2 секунди. Після гомогенізації пробірки центрифугували зі швидкістю 13000 об/хв впродовж 1 хвилини. По закінченню центрифугування відбирали з пробірок 200 мкл надосадової рідини.

Рис. 4 Гомогенізатор біологічного матеріалу для молекулярних досліджень «FastPrep-24» (Франція).

Екстракція НК з біологічного матеріалу.

Перед початком екстракції нуклеїнових кислот повносили реагенти до 96-луночного планшету, а саме:

В ряд E 96-луночного планшету додали по 700 мкл W1 Buffer (розведеного етанолом). В ряд F додали по 700 мкл W2 Buffer (розведеного етанолом). В ряд G додали по 750 мкл етанолу. В стрип для елюції (в кожну лунку) додали по 100 мкл EL Buffer. В ряд A 96-луночного планшету додали по 20 мкл Proteinase K. Потім додали 200 мкл досліджуваних зразків. Далі додали LA Buffer в кількості 100 мкл, LB Buffer (розведений) в кількості 400 мкл та Magnetic Beats в кількості 25 мкл. Готовий розчин з доданими зразками проб помістили в прилад для екстракції НК «Kingfisher Duo» (Thermo Fisher, США). Помістили у прилад стрип для елюції. Вставили на кінцівки для магнітної головки в ряд B 96-луночного планшета. В меню приладу обрали протокол виділення «BioExtract_KF_Duo» (Рис. 5) та натиснули кнопку «START». Через 40 хвилин екстраговані нуклеїнові кислоти помістили в нові епіндорфи.

Рис. 5 Прилад для автоматичної екстракції нуклеїнових кислот «BioExtract_KF_Duo» (Thermo Fisher, США)

Приготування реакційної суміші та проведення ампліфікації.

Виділені чисті нуклеїнові кислоти в епіндорфах перенесли в бокс для приготування реакційної суміші. В спеціальні мікропробірки об’ємом 0.2 мл вносили по 1 аліквоті робочої суміші ПЛР та по одній аліквоті НК зі зразків. Також змішав негативний та позитивний контролі з робочою сумішшю. Мікропробірки відцентрифугували та поміщали в ампліфікатор «BioRad CFX96» (Рис. 6). Ампліфікацію проводили за наступним температурним режимом (табл. 1).

Рис. 6 Ампліфікатор з системою детекції продуктів ПЛР в режимі реального часу «BioRad CFX96» (США.)

Таблиця 1

Температурний режим ампліфікації

№ етапу	Температура 0С	Час	Кількість циклів
1	45	15 хв.	1
2	95	5 хв.	1
3	95	5 сек.	40
4	60	15 сек.	

Вимірювання рівня флуоресценції проводили під час 4 етапу температурного режиму за каналом FAM за довжини збудження флуоресценції при 490 нм та реєстрації рівня флуоресценції при 520 нм. Інтерпретація отриманих результатів ґрунтується на наявності флуоресценції у пробірці за каналом FAM. При цьому пробу вважали позитивною, якщо крива рівня флуоресценції перетинає порогову лінію, що свідчить про наявність у ній специфічної ділянки кДНК, яка характерна для патогену. Цикл, на якому відбувається перетин порогової ліні визначали як показник Ct.

Динаміка рівня специфічних антитіл у сироватці крові за епідемічної діареї свиней

Зразок крові у кількості 5 мл перенесли у спеціальні пробірки для центрифугування за допомогою механічного дозатора зі змінним об’ємом. Для кожного зразка використовували окремий одноразовий наконечник. Пробірки з кров’ю центрифугували протягом 10 хв. При швидкості обертання 1200 об/хв. Механічним дозатором з новим наконечником брали по 0,1 мл сироватки крові у мікропробірку об’ємом 0,5 мл. Перед початком роботи всі необхідні розчини та реактиви витримували при кімнатній температурі 20-30 хв.

У лунки стрипів вносили по 0,09 мл буферу для розведення зразків, та по 0,01 мл розчинів позитивних та негативних контролів. У останні лунки додавали по 0,01 мл зразків досліджуваних сироваток крові. Кожен реактив та окремий дослідний зразок набирали окремим одноразовим пластиковим накінцівником. Стрипи з реактивами заклювали клейкою стрічкою та перенесли у термошейкер «Thermo-Shaker PST-60HL-4» (Рис. 7) для інкубації при температурі 21 ºС, та витримували їх протягом 45 хв.

Рис. 7 Термошейкер для мікропланшет Thermo-Shaker PST-60HL-4, BioSan (Латвія).

Після закінчення інкубації кожну лунку звільняли від вмісту та промивали 3 рази по 0,3 мл концентрованим робочим розчином для промивання з використанням автоматичної мийки мікропланшет «BioTek ELx50» (Рис. 8).

Рис. 8 Автоматична мийка для мікропланшету «BioTek ELx50» (США).

У кожну лунку вносили по 0,1 мл кон'югату. Стрипи заклеювали клейкою плівкою та перенесли у термошейкер для інкубації при температурі 21 °С, протягом 30 хв. Після закінчення інкубації повторювали процедуру промивання вмісту лунок**.** У кожну лунку додавали по 0,1 мл робочого розчину субстрату. Стрипи перенесли у термошейкер (без клейкої плівки) для інкубації при температурі 21 °С, протягом 15 хв. Після закінчення інкубації у лунки з субстратом додавали по 0,1 мл стоп-розчину і залишали на експозицію 3-5 хв при кімнатній температурі для повного зупинення реакції. Планшет зі стрипами перенесли у каретку універсального рідера для мікропланшета «BioTek ELx800» (Рис.9) і за допомогою комп'ютерної програми задавали довжину хвилі 450 нм, при якій відбувається зчитування оптичних щільностей кожної з лунок. Присутність кольорової реакції означає наявність антитіл до вірусу в сироватці крові свиней, відсутність кольору означає, що специфічні антитіла відсутні.

Рис. 9 Універсальний автоматичний спектрофотометр «BioTek ELx800» (США).

Визначення відносного вмісту адгезивних та імунних маркерів за епідемічної діареї свиней

Колориметричні методи визначення кількісного вмісту поліпептидів в біологічних зразках застосовують завдяки їх простоті та точності. Похибки у результатах здебільшого виникають внаслідок різниці досліджуваних білків за своєю природою від білка-стандарту (найчастіше використовують бичачий сироватковий альбумін). Крім того, зразки білкових фракцій гомогенату різних відділів кишечника містять речовини, які впливають на інтенсивність забарвлення [36]. Тому контрольні проби для вимірювання готували на буферах, які використовували для одержання білкових фракцій кишечника. Вміст загального білка у кожному зразку визначали двома методами (методом Лоурі і методом Бредфорд). Застосування двох методів для паралельного аналізу концентрації білка дає змогу отримати більш точні результати завдяки їх обробці методами дисперсійного аналізу з використанням F- критерію Фішера. Вимірювання кожної проби та калібрувальних зразків проводили тричі, у подальших розрахунках використовували середнє арифметичне значення вмісту білка.

Вміст білка (мкг/мл) у пробах фракцій кишечника визначали з урахуванням розведення за формулою

$$C = \frac{X \times R}{0{,}1}$$

де *С* – концентрація білка в гомогенатах тканини кишечника, мкг/мл; *Х* – кількість білка у розведених зразках, знайдена за калібрувальним графіком, мкг; *R* - розведення гомогенатів тканини кишечника.

*Електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ***).**

В зовнішньому електричному полі білки мігрують крізь гель зі швидкістю, що зумовлена опором середовища. Таким чином, відстань, пройдена білками, зворотньо пропорційна їх молекулярній масі, яку визначали шляхом порівняння зі швидкістю проходження середовища білками-маркерами. Використовували двошаровий гель з різним розміром пор і пари буферів, які відрізнялись між собою за складом і значенням pH, забезпечуючи цим концентрацію досліджуваних маркерів в кожній відповідній зоні [5].

Електрофорез проводили у пластинці ПААГ товщиною 1 мм відповідно методики, описаною Laemmli U [33]. У гелі для розділення білків формували градієнт акриламіду Т=7–18%. Склад розділяючого гелю: Т = 7–18% і С = 0,8–2,5%; 0,375 М трис-HCI буфер (pH 8,8); 0,1% ДСН; 0,025% тетраетилендіаміну (ТЕМЕД); 0,025% персульфату амонію (ПСА). У 18%-ий гель додавали гліцерин до концентрації 5% для запобігання нерівномірного набрякання гелю при пофарбуванні і та надання йому еластичності.

Склад концентруючого гелю: Т = 4,5%, С = 6%; 125мМ трис-HCI буфер (pH 6,8); 0,1% ДСН; 0,025% ТЕМЕД; 0,025% ПСА.

Білкові проби вносили у буфері (pH 6,8), з таким складом: 1 М трис-HCl, 5% ДСН; 2% дитіотриетолу; 1% 2-меркаптоетанолу; 30% гліцерину; 0,001% бромфенолового синього. Загальна концентрація білка не перевищувала 100 мкг на один зразок.

В якості електродного буферу використовували розчин, який містив 25 мМ трис-HCI (pH 8,3); 0,192 М гліцину; 0,1% ДСН.

Розділення проводили при фіксованому струмі і часі. Для забарвлення поліпептидних зон гель фіксували протягом 12–16 год. при кімнатній температурі у розчині 12,5%-ої трихлороцтової кислоти (ТХО). Електрофореграми забарвлювали у 0,1%-ому розчині кумасі G-250, розчиненого у 50%-му етанолі та 15%-вій оцтовій кислоті протягом 12–16 год. Знебарвлення проводили у тому ж розчині, який не містив барвника. Гелі для імунохімічного виявлення ГФКБ після закінчення електрофорезу промивали у дистильованій воді для вилучення надлишку ДСН.

Імуноблотинг.

Імуноблотинг є різновидом імунохімічного аналізу. Його суть полягає у переносі молекул досліджуваної речовини з одного твердого носія на інший та подальшого імуноспецифічного виявлення. Цей метод дає змогу провести аналіз складу окремих поліпептидів, які несуть ідентичні антигени , а також визначити їх відносний вміст.

Перенесення білків з 2 гелей на нітроцелюлозу відбувалося активно під дією електричного поля [8, 10].

Імуноблотинг цитоскелетних і мембранних білків кишечника проводили за методикою, запропонованою Towbin [57]. Після електрофорезу на пластину ПААГ накладали нітроцелюлозні мембрани (діаметр пор 0,27 мкм), фіксували фільтрувальним папером. Перенос білків проводили у камері з 12,5 мМ трис-HCl буфером (pH 8,3), який додатково містив 0,195 М гліцин, 30% метанол та 2 М сечовину протягом 60 хв. при струмі 150 мА. Після завершення переносу мембрани відмивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР) з 0,05% Tween-80.

Блокування на нітроцелюлозі проводили розведеною у ЗФР (1:6) сироваткою крові бика протягом 12 год. при t = 4ºС.

Після блокування нітроцелюлозні мембрани інкубували 12 год. при 4ºС з розведеною 1:1500 специфічною кролячою антисироваткою, промивали ЗФР із 0,05%-вим Tween-80 та інкубували 60 хв. при 37ºС з розведеними 1:1500 вторинними антитілами, міченими пероксидазою хрому.

Для візуалізації поліпептидних зон, нітроцелюлозну мембрану обробляли протягом 10 хв. при кімнатній температурі у 50 мМ трис-HCI буфері (pH 7,4), який містив хромоген – діамінобензидин (0,01%), а також 0,02% перокису водню.

Інтенсивність імунозабарвлення певної поліпептидної зони, що реагує з антисироваткою, пропорційна кількості антигену. Для сканування і порівняння інтенсивності поліпептидних зон на нітроцелюлозній мембрані після проведення імуноблотингу використовували програму “Image 2000” (UVP, Велика Британія). Інтенсивність забарвлення молекулярних маркерів з кишечника поросят контрольних груп приймали за 100%.

2.2. Характеристика науково-дослідного центру

Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету «Biosafety-Center» (далі НДЦ) відкритий на факультеті ветеринарної медицини на базі проблемної науково-дослідної лабораторії фізіології та функціональної морфології продуктивних тварин за наказом ректора Дніпровського державного аграрно-економічного університету № 1484 від 14 липня 2008 року, у відповідності з рішенням Вченої ради, протокол № 8.

Науково-дослідний центр знаходиться за адресою м. Дніпро, Соборний р-н, вул. Мандриківська 276, у приміщенні факультету ветеринарної медицини ДДАЕУ.

Очолює «Biosafety-Center» доктор ветеринарних наук, професор Масюк Дмитро Миколайович.

Для забезпечення високого технічного рівня організації та проведення досліджень, випробувань, досягнення високого рівня якості послуг, НДЦ «Biosafety-Center» впроваджує та підтримує сучасні системи менеджменту якості та підтвердження компетентності, про що свідчать отримані впродовж існування НДЦ атестати, сертифікати, свідоцтва.

«Biosafety-Center» сертифікований «Українським біологічним центром сертифікації» (сертифікат визнання вимірювальних можливостей ОС «УБСЦ», No LB/13/19 від 26.12.2019 р.) та акредитований Державним науково-дослідним контрольним інститутом ветеринарних препаратів та кормових добавок на проведення ПЛР та ІФА-діагностики, біохімічних, хіміко-токсикологічних і морфологічних досліджень у сфері ветеринарної медицини та сільського господарства (атестат акредитації ДНДКІВПКД No 027/вир. лаб., від 11.06.2017 р.), має дозвіл на роботу зі збудниками III - IV групи патогенності.

В 2015 р. на базі НДЦ «Biosafety-Center» було створено Випробувальний центр, побудована та впроваджена система управління якістю за вимогами ДСТУ EN ISO/IEC 17025, (Рис. 10), а Випробувальний центр підтвердив свою компетентність проходженням процедури акредитації в Національному агентстві з акредитації України (атестат акредитації НААУ № 201727 від 16.06.2021р.). Це дало змогу Випробувальному центру підписати угоду на використання комбінованого знаку ILAC MRA і мати можливість зазначати знак ILAC MRA на своїх протоколах і висновках з випробувань та демонструвати те, що його компетентність підтверджена органом з акредитації-підписантом Угоди ILAC MRA.

НАЦІОНАЛЬНЕ АГЕНТСТВО З АКРЕДИТАЦІЇ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН УКРАЇНИ З АКРЕДИТАЦІЇ

АТЕСТАТ ПРО АКРЕДИТАЦІЮ

Зареєстрований у Реєстрі
16 червня 2021 року
за № 201727
чинний до 15 червня 2026 року

Дата первинної акредитації: 16 червня 2021 року

НАЦІОНАЛЬНЕ АГЕНТСТВО З АКРЕДИТАЦІЇ УКРАЇНИ ЦИМ ЗАСВІДЧУЄ КОМПЕТЕНТНІСТЬ

Випробувального центру
Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів аграрно-промислового комплексу
ДНІПРОВСЬКОГО ДЕРЖАВНОГО АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНОГО УНІВЕРСИТЕТУ

Місцезнаходження юридичної особи:
49000, м. Дніпро, вул. Сергія Єфремова, 25
Місцезнаходження ООВ:
49000, м. Дніпро, вул. Мандриківська, 276

0 0 4 9 3 6 7 5
(Код ЄДРПОУ)

ВІДПОВІДНО ДО ВИМОГ ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019
(EN ISO/IEC 17025:2017, IDT; ISO/IEC 17025:2017, IDT) У СФЕРІ:

мікробіологічні, молекулярно-генетичні та хіміко-токсикологічні дослідження харчових продуктів; кормів, комбікормів, комбікормової сировини, зерна; відбір проб.

Сфера акредитації визначена додатком до цього атестата.
Додаток є невід'ємною частиною цього атестата, складається з 03 аркушів.

В.о. директора Сергій ПОПИК

м. Київ, 01133, вул. Генерала Алмазова, 18а Зареєстровано у журналі обліку за № 1873

НААУ є підписантом: 1) Угоди EA BLA у сферах «Випробування», «Калібрування», «Сертифікація персоналу», «Сертифікація систем менеджменту» та «Медичні лабораторії»; 2) Угоди ILAC MRA у сферах «Випробування», «Калібрування» та «Медичні лабораторії»; 3) Угоди IAF MLA у сферах «Сертифікація персоналу», «Сертифікація систем менеджменту».

Рис. 10. Атестат про акредитацію ДСТУ EN ISO/IEC 17025.

Це означає, що дані документи будуть визнані по всьому світу іншими організаціями, які підписали Угоду про взаємне визнання ILAC. На даний момент такі організації є в 101 країні.

У структурі НДЦ «Biosafety-Center» працюють 25 співробітників, з них – 3 доктори наук, 7 кандидатів наук, 2 доктори філософії та аспіранти.

Науково-дослідний центр біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК складається з п’яти основних відділів:

- імунохімії та молекулярно-генетичного аналізу;
- фізіології, біохімії та хіміко-токсикологічного аналізу;
- бактеріології та біотехнології;
- морфологічних досліджень;
- інформаційної аналітики.

Відділ фізіології, біохімії та хіміко-токсикологічного аналізу.

До складу відділу входять 3 взаємодоповнюючих сектори: клінічної фізіології та біохімії, фізико-хімічних методів досліджень та інструментальних методів досліджень.

У відділі проводяться різнобічні дослідження, спрямовані на встановлення метаболічного статусу сільськогосподарських та непродуктивних тварин, оцінку кормів та продуктів харчування за показниками якості та безпеки.

Відділ оснащений сучасним обладнанням (автоматичними біохімічними «Biochem 200» і «Miura 200», та гематологічними аналізаторами, КФК-3, спектрофотометри «Спектрофотометр 2000» і «Spectrometer T 60 U», Флюорат 02 – 2М, мікроскоп Olympus CH 20, концентратор центрифужного типу «Eppendorf Plus», газовий хроматограф «Цветхром-500», має два рідинні хроматографи «Agilent Technologies 1260 Infinity», атомно-абсорбційний спектрофотометр Selmi - 115 FCM, роторний випаровувач РИ 2 тощо), завдяки яким визначають показники крові, сечі та інших біологічних рідин та тканин (понад 50 показників). Досліджують

якість продуктів харчування, кормів, кормових добавок і преміксів (аналіз основних показників поживності, забезпеченості мікро- та мікроелементами, жиророзчинними вітамінами, незамінними амінокислотами). Встановлюють відповідності харчових продуктів і кормів для тварин за вмістом токсикантів (основних мікотоксинів, хлор- і фосфорорганічних пестицидів, нітратів, нітритів, важких металів, антибіотиків та гормонів).

Відділ бактеріології та біотехнології

До основних напрямків роботи лабораторії відносяться: одночасне визначення збудників та їх чутливості до антибіотиків, ідентифікацію патогенів методом MALDI-TOF; ідентифікація збудників за біохімічними показниками. Проводять серологічну типізацію культур. Визначають фактори патогенності молекулярно- генетичними методами (токсини, адгезини, гемолізини та ін.). Проводять визначення чутливості до антибіотиків за методом Кірбі-Баер, визначають MIC серійними мікро- та макророзведеннями.

Також встановлюють ефективність дезінфекції приміщень та обладнання різного призначення. Визначають чутливість до дезінфікуючих засобів епізоотичних та еталонних штамів мікроорганізмів;

Усі випробування проводяться в будь-яких матрицях згідно діючої нормативної документації (ISO, ДСТУ).

Цей відділ обладнаний наступним устаткуванням: термостати ТС-80 та ТСО-80, шафа ламінарна II класу біобезпеки «ШЛВ-2а», стерилізатор ВК-75, автоклав «Napco», ваги електронні лабораторні PS 210 та ін.

Відділ імунохімічних та молекулярно-генетичних досліджень

Відділ складається з двох лабораторій - лабораторії ПЛР-діагностики та лабораторії імунохімії та виконує роботи з діагностики інфекційних хвороб

тварин, проводить дослідження продуктів харчування і кормів для тварин з використанням сучасних молекулярних лабораторних методів.

Молекулярні дослідження у лабораторії проводяться сучасним, швидкісним, високочутливим та високоспецифічним методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) за технологією «Real Time».

Завдяки цьому методу можлива якісна діагностика і диференціація збудників інфекційних хвороб тварин (більше 30 вірусних та 65 бактеріальних патогенів). В лабораторії проводять генотипування вірусів (Influenza virus; Avian coronavirus; Infectious bursal disease virus; Marek's disease virus; Avian metapneumovirus; Porcine reproductive and respiratory syndrome; Herpesvirus-1 type та ін.) і бактерій (A. pleuropneumoniae, Brachyspira spp; E. coli; Cl. perfringens; Cl. difficile; Eimeria spp.; Mycoplasma spp.; P. multocida; та ін.). Диференціюють епізоотичні ізоляти збудників хвороб тварин від вакцинних варіантів. Визначають нуклеотидну послідовність геному збудників інфекційних хвороб тварин (секвенування).

Проводять скринінг ГМО у продуктах харчування та кормах для тварин за регуляторними послідовностями 35S; NOS; FMV; Pat; EPSP із подальшою ідентифікацією модифікованої лінії організму та визначення кількості ГМО. Проводять дослідження продуктів харчування на предмет фальсифікації.

В лабораторії імунохімії проводяться дослідження, спрямовані на виявлення антигенів та антитіл до збудників хвороб с.- г. та домашніх тварин.

Лабораторія використовує такі методи дослідження, як: імуноферментний аналіз (ІФА / ELISA), імуноблотинг, імунодот та імуноелектрофорез.

На підставі цих досліджень спеціалісти ветеринарної медицини встановлюють диференційний діагноз на окремі захворювання.

Застосування імунохімічних методів дослідження біологічного матеріалу дає змогу виявити антитіла та оцінити їх рівень до більш ніж 70

збудників інфекційних хвороб ВРХ, ДРХ, свиней, коней, кролів, птиці та дрібних тварин.

Цей відділ обладнаний наступним устаткуванням: холодильною камерою, ламінарним боксом II класу біобезпеки, що обладнаний HEPA-фільтром (H-13), термостатом з твердотільним термоблоком "циклотемп-303" місткістю 32 на місця, мікроцентрифугою-шейкером "ЦиклоТемп-901", мікроцентрифугою "MiniSprin" фірми «Eppendorf», набором мікродозаторів з перемінним об'ємом та штативом для них, пристроєм для виявлення специфічної послідовності нуклеїнових кислот "CFX 96 BioRad", універсальним автоматичним спектрофотометром «BioTek ELx800», автоматичною мийкою для мікропланшета «BioTek ELx50», приладом для автоматичної екстракції нуклеїнових кислот «BioExtract_KF_Duo», гомогенізатором біологічного матеріалу для молекулярних досліджень «FastPrep-24» термошейкером для мікропланшета Thermo-Shaker PST-60HL-4, фірми BioSan.

Відділ морфологічних досліджень

У цьому відділі відбувається прийом, реєстрація, розбір і первинна обробка матеріалу, проведення попередньої пробопідготовки, зберігання і первинна інактивація залишків біологічного матеріалу дезінфекційними засобами. Тут же проводять прийом і обробку проб для дослідження іншими методами (бактеріологічним, імунологічним, імунохімічними, імуногістохімічними тощо).

До основних напрямків роботи відділу відноситься: встановлення патологоанатомічного діагнозу, визначення причини загибелі тварин (основне захворювання, супутнє, конкуруюче, фонове та ін.), співставлення клінічного і патологоанатомічного діагнозу для призначення адекватного лікування або його корекції.

Також встановлюють патоморфологічні зміни в окремих органах тварин. Проводять патоморфологічний моніторинг стану органів і систем продуктивних тварин за промислових технологій вирощування.

Встановлюють патолого-гістологічний діагноз новоутворення. Відділ оснащений лабораторією паразитологічних досліджень. Лабораторія проводить виявлення інвазійних елементів, встановлює види збудників, які є причиною ряду функціональних порушень органів чи систем організму або й загибелі тварин.

Відділ оснащений наступним устаткуванням: столи для резекції трупів тварин та пробопідготовки матеріалу, мікроскоп Olympus CX-41, дозатори, інструменти для патоморфологічного розтину 2 комплекта, центрифуги MICROmed CM-3.01 (для підготовки проб паразитологічних та біохімічних досліджень).

Всі перелічені вище прилади технічно справні, мають технічний паспорт і робочу інструкцію з експлуатації.

Стіни та підлога кожного відділу вкриті кахлем, що забезпечує потрібні умови для проведення ретельної дезінфекції приміщень. Таким чином, лабораторії НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК ДДАЕУ оснащені згідно сучасних вимог, мають необхідне обладнання та сертифіковані на проведення відповідних досліджень.

2.3 Результати власних досліджень та їх аналіз

2.3.1. Оцінка патоморфологічних змін 12- палої кишки за епідемічної діареї свиней

Для оцінки структурних змін 12- палої кишки проводились патогістологічні дослідження. Зразки, залиті в парафін, нарізали на мікротомі та фарбували гематоксиліном-еозином, для подальшої візуалізації за допомогою цифрової світлової мікроскопії.

Досліджуючи гістопрепарати 12- палої кишки поросят контрольної групи на 5 добу після інокуляції встановлено, що слизова оболонка кишки поросят має характерні ознаки атрофії та руйнування макроворсинок (Рис. 11 А). На гістопрепаратах 12- палої кишки поросят дослідної групи спостерігали набряклість слизової оболонки та інфільтрацію її лейкоцитами (Рис. 11 В).

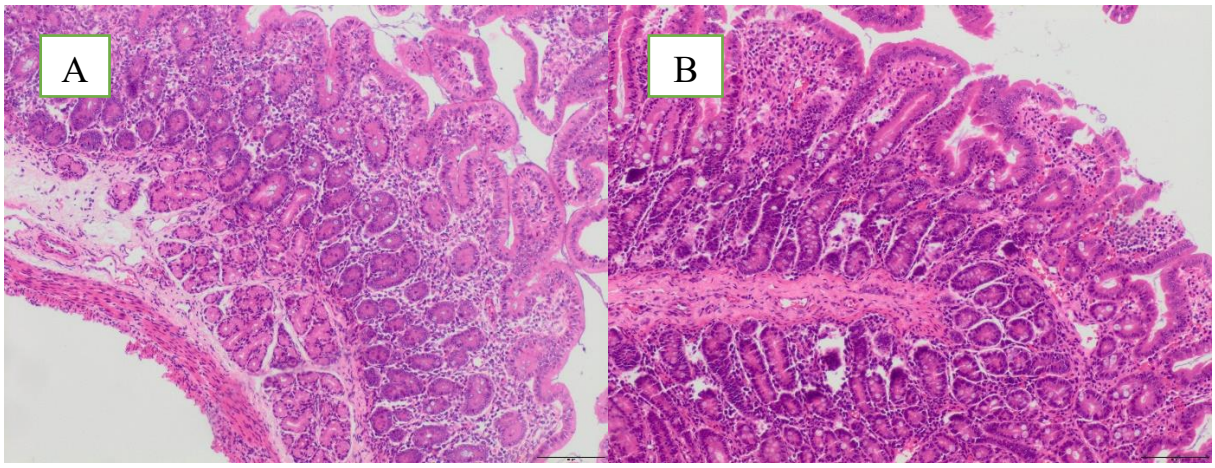


Рис. 11 Гістологічний препарат 12- палої кишки порося на 5 добу після інокуляції з ознаками атрофії у контрольній групі (А), та набряклістю слизової оболонки в дослідній групі (В). Гематоксилін та еозин, × 100 (А, В).

Аналізуючи гістопрепарат 12- палої кишки поросят на 14 добу після інокуляції у контрольній групі виявлено, що поверхневий та залозистий епітелій був у стані дистрофії та некрозу, внаслідок активної репродукції вірусу (Рис. 12 В). У поросят з дослідної групи на гістопрепаратах спостерігали руйнування кишкових епітеліоцитів (Рис. 12 А).

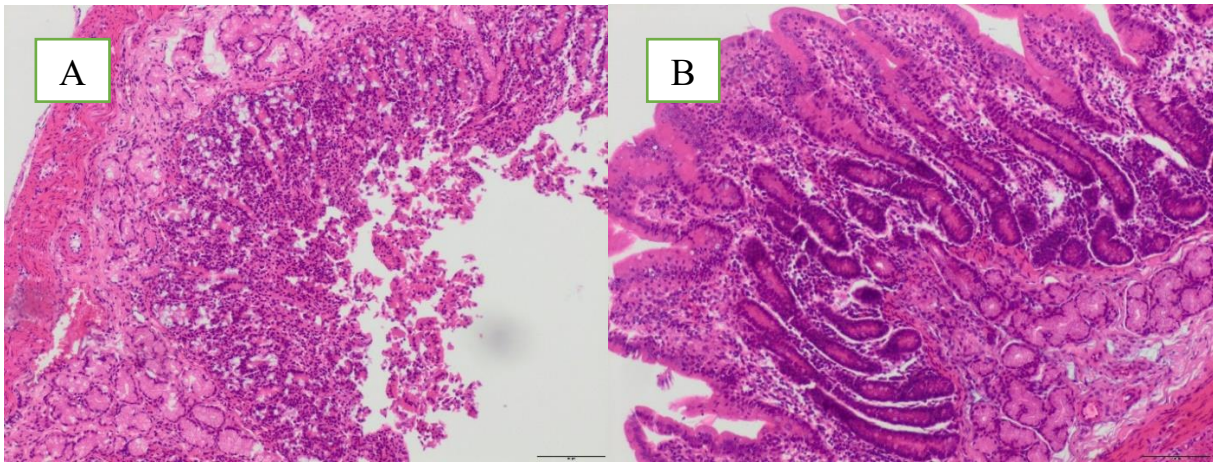


Рис. 12 Гістологічний препарат 12- палої кишки порося на 14 добу після інокуляції зі зруйнованими епітеліоцитами в контрольній групі (А), та з ознаками дистрофії та некрозу в гістопрепаратах поросят дослідної групи (В). Гематоксилін та еозин. × 100 (А, В).

Досліджуючи гістопрепарати з 21 доби після інокуляції в поросят контрольної групи встановлено набрякання підслизової основи. Також виявлено фрагментацію, руйнування та вакуолізацію клітин м'язової оболонки (Рис. 13 А). В гістопрепаратах поросят дослідної групи спостерігають масове руйнування клітин слизової оболонки, зморщування та руйнування ядер ентероцитів. Крім цього, було виявлено інфільтрацію підслизового шару лімфоцитами і макрофагами (Рис. 13 В).

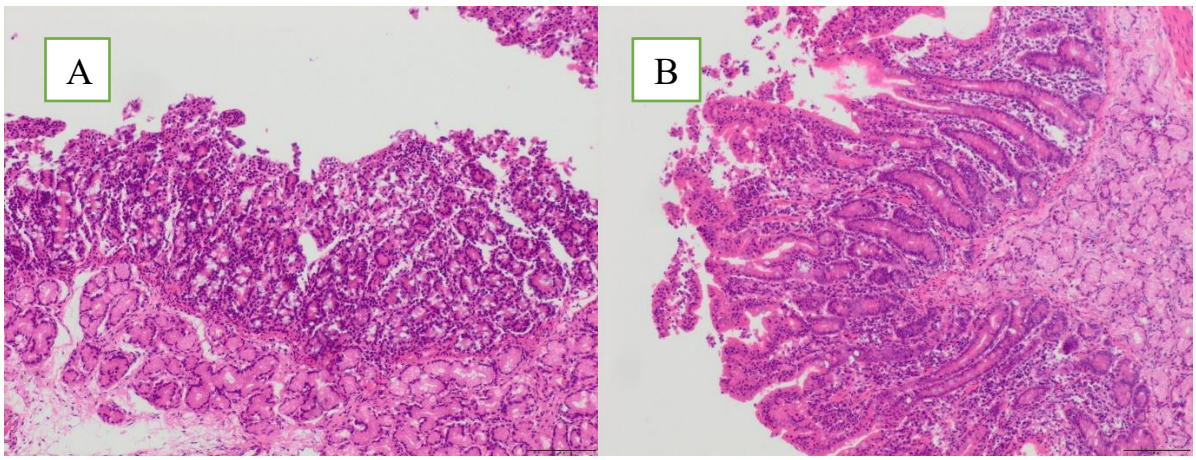


Рис 13. Гістологічний препарат 12- палої кишки порося на 21 добу після інокуляції з ознаками набрякання підслизового шару, руйнування клітин м'язової оболонки тонкої кишки в поросят контрольної групи (А), та з ознаками масового руйнування ентероцитів та інфільтрацію імунокомпетентними клітинами підслизового шару в поросят дослідної групи (В). Гематоксилін та еозин. × 100 (А, В).

На 31 добу після інокуляції в гістопрепаратах 12- палої кишки поросят контрольної групи спостерігали крапкові крововиливи в підслизовому шарі. (Рис 13 А). У поросят дослідної групи на гістопрепаратах виявлено дистрофічні зміни клітин слизової оболонки тонкої кишки (Рис 13 В).

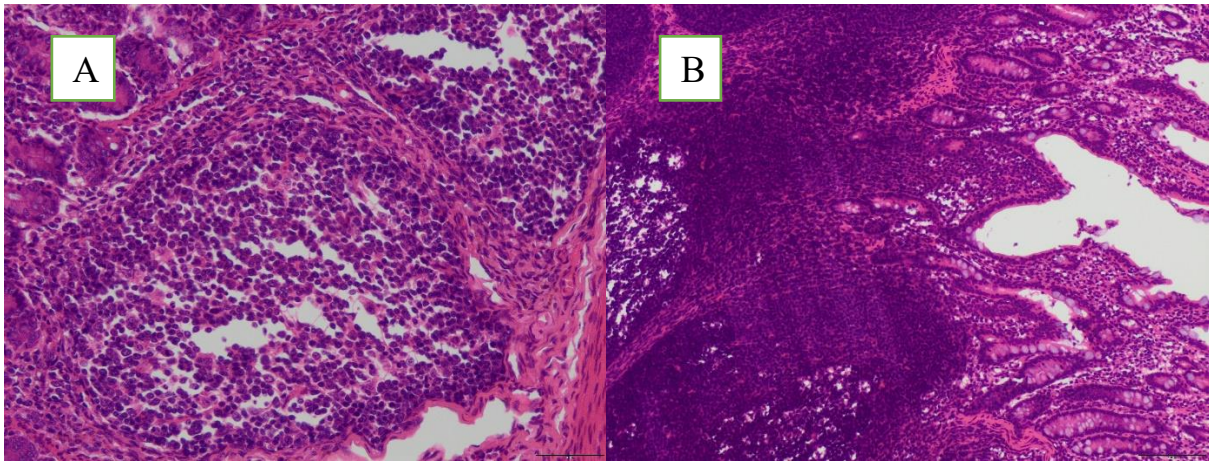


Рис 14. Гістологічний препарат 12- палої кишки порося на 31 добу після інокуляції з крапковими крововиливами у поросят контрольної групи (А), та

дистрофічними змінами в ентероцитах у поросят дослідної групи (В). Гематоксилін та еозин. × 100 (А, В).

Отже, основною патогномонічною ознакою за епідемічної діареї свиней є дегенеративні зміни в ентероцитах, перш за все 12- палої кишки, з розвитком атрофії та вкороченням ворсинок і мікроворсинок. Руйнування захисного фізіологічного бар'єру та ентероцитів на мікроворсинках призводить до зменшення абсорбтивної функції поверхні тонкого кишечника, що в сукупності з функціональними порушеннями і злущуванням значної кількості клітин епітелію призводить до пригнічення функції всмоктування з розвитком профузної водянистої діареї.

2.3.2. Інтенсивність ураження клітин тонкої кишки за епідемічної діареї свиней

Збудник епідемічної діареї свиней є РНК-вмісним високовірулентним вірусом, місцем репродукції якого є клітини слизової оболонки тонкої кишки. За повідомленням деяких науковців [8, 9, 14] кількість вірусу ЕДС, що виділяється у складі діарейних мас має пряму кореляцію за рівнем його реплікації у ентероцитах. З огляду на це, інтенсивність ураження клітин тонкої кишки оцінювали за кількістю геном-еквівалентів вірусу у ректальних мазках методом ПЛР у реальному часі. Результати ПЛР досліджень вказують на те, що середня кількість та час фекального виділення вірусу ЕДС мала певні особливості у піддослідних поросят (табл. 2).

Таблиця 2

Кількість генетичного матеріалу вірусу ЕДС у ректальних мазках поросят у ранній постнатальний період, (M±m, n=4)

Час після інокуляції, доба	Контрольна група	Дослідна група
	Кількість генетичного матеріалу, г.е.	Кількість генетичного матеріалу, г.е.
2	$1,32x10^6±3,58x10^5$	$1,58x10^6±8,20x10^5$
5	$5,74x10^5±1,94x10^{5*}$	$1,62x10^4±6,65x10^{3*}$
14	$2,94x10^3±8,33x10^2$	$3,34x10^4±3,19x10^3$
21	$4,94x10^2±2,51x10^2$	-
31	-	-

Примітка: різниця вірогідна за значення *– $p<0,05$, відносно показників контрольної групи.

Встановлено, що на 2 добу після інфікування у ректальних мазках поросят обох груп кількість вірусу була в середньому $1,45\ x10^6±5,89x10^5$ г.е. У подальшому, в контрольній групі відбувається зменшення кількості вірусу на 5-, 14- та 21- добу в 2,29, 448,9 та 2672,06 рази, відповідно. З 31-ї доби збудник ЕДС тваринами контрольної групи не виділяється.

Динаміка виділення збудника епідемічної діареї свиней в ректальних мазках поросят дослідної групи розпочалась більш швидким зниженням кількості вірусу у мазках на 5-, та 14- добу в 97,53 та 44,30 рази. З 21-ї доби збудник ЕДС в дослідній групі не виділяється.

Порівнюючи кількість вірусу ЕДС у ректальних мазках тварин дослідної та контрольної групи виявлено достовірну різницю на 5- добу після інокуляції вірусу. Кількість г.е. коронавірусу у поросят дослідної групи була менше в 35,43 рази ($p<0,05$), а на 14-у добу більше в 11,36 рази, порівнюючи із значеннями тварин контрольної групи.

Отже, динаміка екскреції вірусу ЕДС протягом раннього постнатального періоду знижується в обох групах. У поросят дослідної групи тривалість екскреції була менша на 7 діб у порівнянні з тваринами

контрольної групи. Кількість збудника ЕДС на 5- добу після інокуляції достовірно зменшувалась у 35,43 рази у поросят дослідної групи у порівнянні з контрольною. Такі зміни, ймовірно, пов'язані з дією ізотонічно-протеїнової суміші яка покращує метаболічний стан ентероцитів та, як слід ускладнює репродукцію коронавірусу в цитоплазмі кишкових клітин.

2.3.3. Динаміка рівня специфічних антитіл у сироватці крові поросят при епідемічній діареї свиней

Динаміку рівня специфічних антитіл до вірусу ЕДС у сироватці крові поросят у ранній постнатальний період досліджували непрямим твердофазним імуноферментним методом. Встановлено, що у піддослідних поросят відбувається сероконверсія після інокуляції вірусу. Відбулось достовірне підвищення S/P (S/P вище за 60 вважається позитивним) на 14-добу після інокуляції вірусу, що позначилось на кількості серопозитивних тварин у контрольній групі - 75%, у дослідній групі - 100% (табл. 3).

Дослідження синтезу специфічних антитіл ЕДС в сироватці крові поросят контрольної групи вказують на те, що найменший показник S/P виявлено на другу добу після інокуляції вірусу. З 5- до 31- доби показник S/P збільшується майже у 18 разів.

Динаміка сероконверсії специфічних антитіл до вірусу ЕДС в сироватці крові поросят дослідної групи характеризується збільшенням індексу S/P з 5- до 31- доби після інокуляції вірусу в 15,71 рази.

Порівняльний аналіз синтезу специфічних антитіл до вірусу ЕДС в сироватці крові поросят у ранній постнатальний період онтогенезу між піддослідними групами показав, що їх сероконверсія в обох групах проходить на одному рівні. Достовірну різницю між рівнями показнику S/P виявлено на 21- та 31- добу після інокуляції вірусу. У цей період

концентрація специфічних антитіл в сироватці крові поросят дослідної групи є вищою на 47 % та 22% ($p<0,05$), відповідно до показників тварин контрольної групи.

Таблиця 3

Рівень специфічного IgG у сироватці крові поросят у ранній постнатальний період онтогенезу при епідемічній діареї свиней (M±m, n=4)

Час після інокуляції, діб	Контрольна група		Дослідна група	
	S/P, Од	Кількість серопозитивних тварин, %	S/P, Од	Кількість серопозитивних тварин, %
2	5,62±1,34	0	7,78±1,52	0
5	24,22±3,79	0	38,51±6,76	0
14	78,08±12,91	75	78,59±11,72	100
21	87,90±9,45	100	133,61±12,34*	100
31	99,92±7,80	100	122,30±10,76*	100

Примітка: різниця вірогідна за значення *–$p<0,05$ відносно показників контрольної групи

Такі зміни обумовлені часом перебігу імунних реакцій на тлі пероральної інокуляції вірусу. Слід відзначити, що на тлі застосування ізотонічно-протеїнової суміші поросятам дослідної групи виявлено збільшення кількості серопозитивних поросят на 14 добу після інфікування на 25% порівняно до тварин контрольної групи.

Отже, концентрація специфічних антитіл у сироватці крові поросят після інокуляції вірусу ЕДС з часом зростає в обох піддослідних групах. Порівнюючи показник концентрації IgG спостерігається збільшення індексу S/P у дослідній групі тварин з 21- доби після інокуляції в середньому в 1,37 рази, у порівнянні з тваринами контрольної групи. Застосування ізотонічної протеїнової суміші поросятам спряє більш інтенсивному синтезу

специфічних антитіл, що, ймовірно, обумовлено стабілізацією гомеостатичних показників тонкої кишки, та позитивно відображається на реактивності організму.

2.3.4. Адаптивна імунна відповідь у тонкій кишці поросят за епідемічної діареї свиней

З'ясування адаптивної імунної відповіді у слизовій оболонці тонкої кишки поросят проводили за наявності інтерферону-альфа. Це низькомолекулярний пептид, який є основним ефекторним цитокіном імунної відповіді організму проти вірусної та бактеріальної інфекції. Результатами імуноблотингу доведена наявність інтерферону-альфа (поліпептид з молекулярною масою 27 кДа) у тканинах тонкої кишки поросят протягом усього раннього постнатального періоду онтогенезу (Рис. 15).

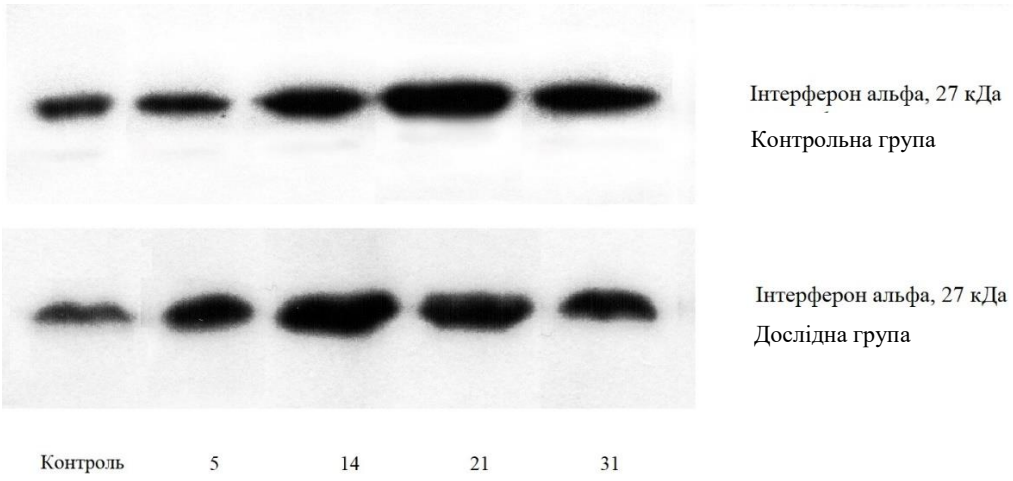


Рис. 15 Імуноблотинг інтерферону-альфа у тканинах тонкої кишки поросят у ранній постнатальний період онтогенезу

Відносний вміст інтерферону-альфа у тканинах тонкої кишки поросят на 5- добу після інокуляції вірусу був однаковий, як у контрольній, так і дослідній групі тварин (Рис. 16). У подальшому загальна динаміка його

вмісту була подібна у обох групах. Так, з 5- до 14-доби вміст інтерферону-альфа у поросят контрольної групи збільшувався в 1,82 рази та у 2,72 рази у дослідної групи. У подальшому, з 14- до 21- доби у контрольній групі тварин продовжує збільшуватися його вміст у 1,62 рази.

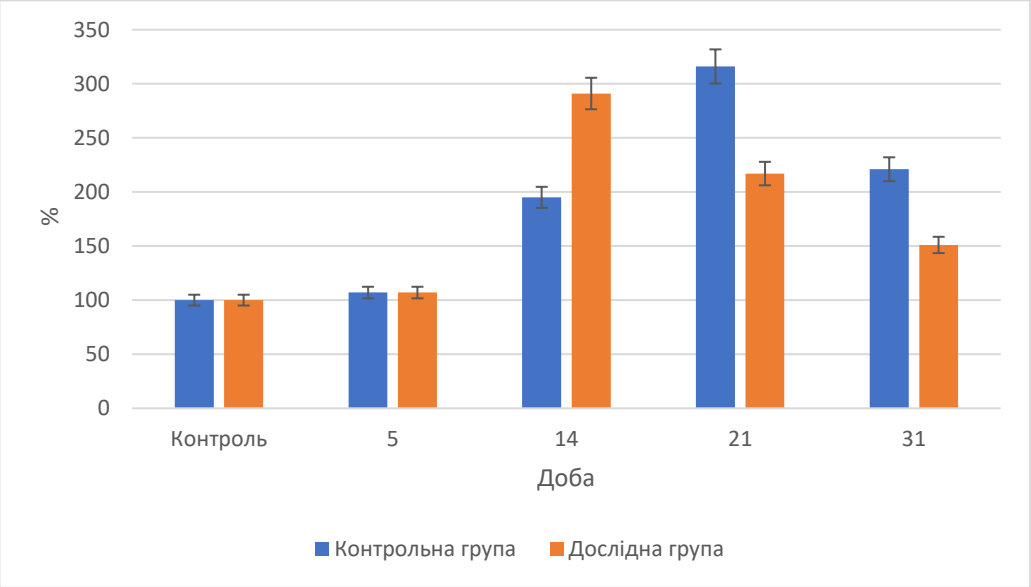


Рис. 16. Динаміка відносного вмісту інтерферону-альфа в тканинах тонкої кишки поросят у ранній постнатальний період онтогенезу, %; M±m, n=4

У дослідній групі за цей період спостерігається зворотна динаміка. Відбувається зниження вмісту інтерферону-альфа в 1,34 рази. З 21- до 31-доби у обох групах знижується вміст у 1,43 рази. Слід зазначити, що найвищий вміст інтерферону-альфа у тканинах тонкої кишки поросят контрольної групи на 21- добу (316±17,61 %), а у дослідній на 14- добу (291±15,72 %) після інокуляції вірусу. Такі зміни характеризують розвиток імунної противірусної відповіді.

Порівнюючи вміст інтерферону-альфа у слизовій оболонці тонкої кишки піддослідних поросят, встановлено, що на 5- добу після інокуляції вірусу він знаходиться на однаковому рівні, як у дослідній, так і контрольній групі тварин. З 14- до 21- добу у дослідній групі поросят цей

показник збільшується на 49,23 %. Натомість, з 21- та 31-добу вміст інтерферону-альфа у них знижується в середньому на 31,50 % ($p<0,05$), у порівнянні з тваринами контрольної групи. Принагідно підкреслимо, що така динаміка вмісту моделюючого цитокіна у дослідній групі поросят ймовірно пов'язана з більш високою реактивністю організму.

Це позначається тим, що після інокуляції віруса на 14- добу організм швидко виробляє інтерферон-альфа, щоб протистояти вірусу та встановити противірусний стан в інфікованих клітинах та неінфікованих сусідніх клітинах. У подальшому, ця сигнальна молекула сприяє моделюванню імунної відповіді, що позначається зменшенням її вмісту у тканинах тонкої кишки, та, ймовірно, перешкоджає активації реакції запалення.

Отже, вміст інтерферону-альфа у тканинах тонкої кишки поросят протягом усього раннього постнатального періоду онтогенезу характеризується хвилеподібною динамікою у тварин обох груп. У поросят контрольної групи його вміст з 5- до 31-доби знижується в 2,06 рази, з найвищим збільшенням на 21- добу – в 2,95 рази. У поросят дослідної групи з 5- до 31-доби - в 1,41 рази, з найвищим збільшенням на 14- добу – в 2,72 рази. Порівнюючи вміст інтерферону-альфа у дослідній групі поросят, у порівнянні з тваринами контрольної групи, встановлено, що на 14- добу він був більше в 1,49 рази, а на 21- та 31-добу менше в 1,46 рази ($p<0,05$) відповідно. Принагідно підкреслимо, що ймовірно ізотонічно-протеїнова суміш більш інтенсивно сприяє синтезу інтерферону-альфа в інфікованих клітинах, який активує антивірусні гени, гальмує проліферацію інфікованих клітин і сприяє наступному руйнуванню вірусної РНК.

2.3.5. Цілісність епітеліального бар'єру тонкої кишки свиней за епідемічної діареї свиней

Визначення цілісності епітеліального бар'єру тонкої кишки оцінювали за вмістом Е-кадгерину. Цей трансмембранний протеїн відіграє важливу

роль у підтриманні адгезивних контактів між клітинами. Результати імуноблотингу довели присутність Е-кадгерину (поліпептид з молекулярною масою 115 кДа) у епітеліальних клітинах тонкої кишки поросят протягом усього раннього постнатального періоду онтогенезу (Рис 17).

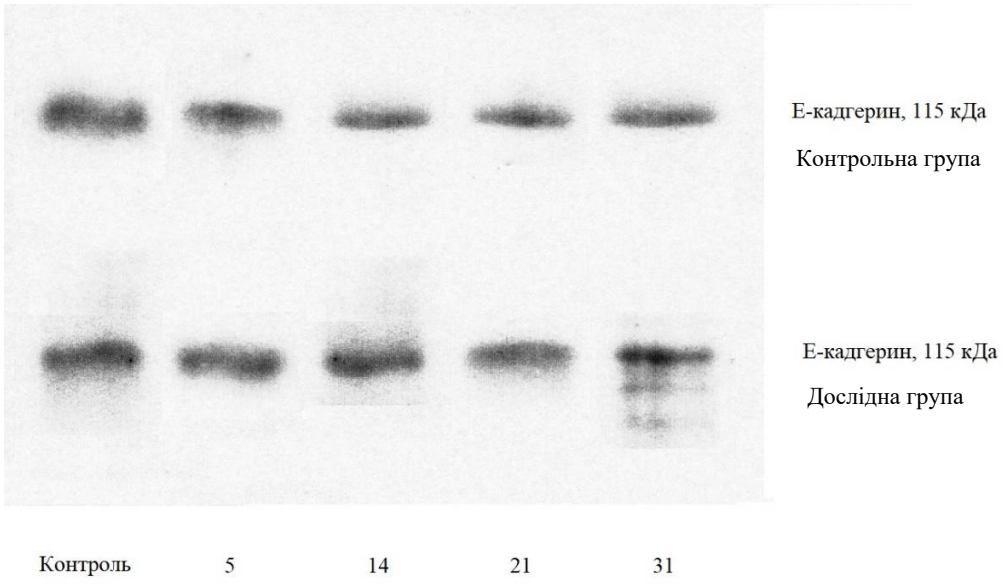
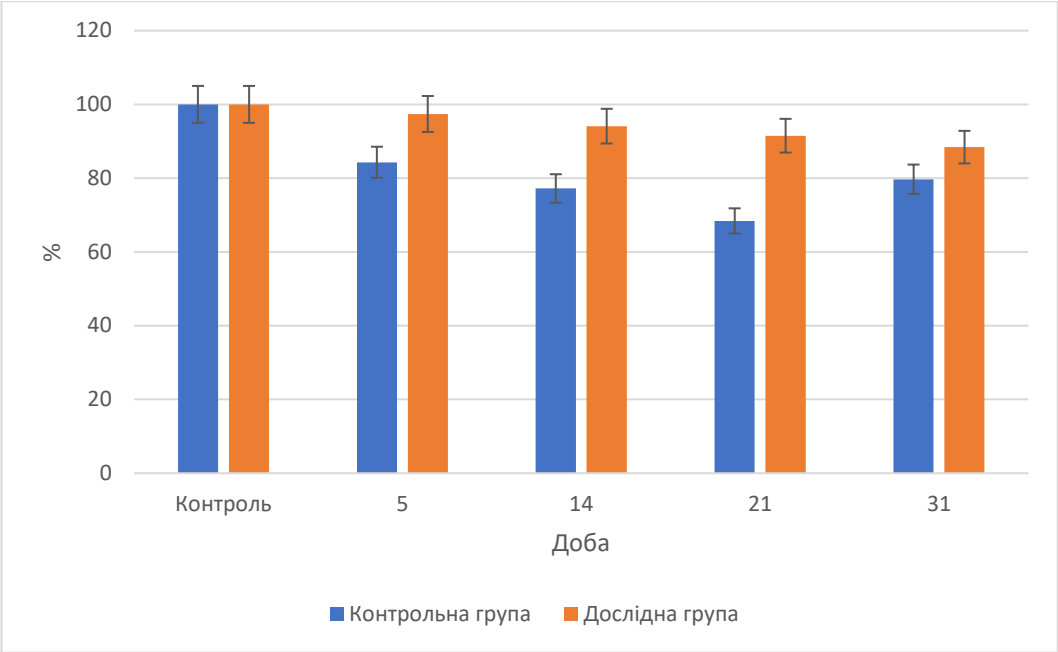


Рис. 17 Імуноблотинг Е-кадгерину епітеліальних клітин тонкої кишки поросят у ранній постнатальний період онтогенезу

Аналізуючи динаміку вмісту Е-кадгерину у клітинах слизової оболонки тонкої кишки свиней у ранній постнатальний період онтогенезу (Рис 18) встановлено, що найвищий його вміст у поросят контрольної групи був на 5 добу після інокуляції вірусу і становив 84,3 ± 5,34 % У подальшому відбувається зниження його вмісту до 14- та 21- доби на 14,4% та 18,9 % ($p<0.05$), відповідно. З 21- до 31- доби вміст Е-кадгерину достовірно збільшується на 16,5 %.



* Різниця вірогідна за значення *– p<0.05 відносно показників контрольної групи

Рис. 18. Динаміка відносного вмісту Е-кадгерину в епітеліальних клітинах тонкої кишки поросят у ранній постнатальний період онтогенезу, %; M±m, n=4

Динаміка вмісту Е-кадгерина в епітеліальних клітинах тонкої кишки поросят дослідної групи менш варіабельна та відмічається поступовим зниженням з 5- до 31- доби після інокуляції вірусу на 9,24 % (p<0.05).

Порівняльний аналіз відносного вмісту Е-кадгерину у кишкових клітинах поросят у ранній постнатальний період онтогенезу між піддослідними групами свідчить про більш високий його вміст у епітеліальних клітинах дослідної групи з 5-, 14-, 21- та 31-доби в 1,16; 1,30; 1,34 та 1,11 рази (p<0.05) відповідно, у порівнянні з тваринами контрольної групи. Такі зміни, ймовірно, пов’язані з протективними властивостями ізотонічної білкової суміші, яка впливає на вміст Е-кадгерину при інфікуванні поросят вірусом ЕДС.

Отже, вміст Е-кадгерину у епітеліальних клітинах тонкої кишки поросят після інокуляції вірусу ЕДС знижується у обох піддослідних групах. У поросят контрольної групи з 5- до 31-доби – на 5,51 %, з

найнижчим показником у 21- добу – на 18,9 %. У поросят дослідної групи з 5- до 31-доби – на 9,24 %. Порівнюючи вміст Е-кадгерину між групами, встановлено, що у дослідній групі тварин цей показник був вищим протягом усього періоду дослідження у середньому в 1,23 рази, у порівнянні з тваринами контрольної групи. Такі зміни, пов’язати з дією ізотонічно-протеїнової суміші, яка стабілізує метаболічну функцію ентероцитів, і як наслідок, може локально впливати на цілісність адгезивного з’єднання, а саме на молекули клітинної адгезії - Е-кадгерину та відновлення ефективності інтестинального бар’єру.

2.4. Розрахунок економічної ефективності ідентифікації молекулярних маркерів

Проводили дослідження для визначення адаптивної імунної відповіді за вмістом інтерферону альфа та показника цілісності епітеліального бар’єру за вмістом Е-кадгерину в тонкий кишці методом імуноблотингу згідно поставленої мети даної дипломної роботи. Тому, відповідно, було розраховано економічну ефективність від проведених заходів [3].

Формування тарифу на ветеринарні послуги (дослідження) у науково-дослідному центрі включає такі показники:

1. Питома вартість часу ветеринарного лікаря виходячи із середньомісячної заробітної плати.

2. Вартість електроенергії, витраченої для роботи приладів.

3. Вартість витратних матеріалів та амортизаційні відрахування від використання приладів;

4. Внески до центру зайнятості, медичного страхування та пенсійного фонду. Виходячи з вище перелічених пунктів, проведемо розрахунок затрат на проведення одного дослідження.

2.4.1 Ветеринарні витрати на заробітну платню:

Відповідальним працівником за проведення досліджень в лабораторії є молодший науковий співробітник, середньомісячна заробітна плата якого становить 6500 грн.

6500 : 21= 309,50 (1 людина\ день)

309,5 : 7 = 44,21 (1 людина\ година)

44,21 : 60 = 0,73 (1 людина\ хвилина)

2.4.2. Розрахунок економічної ефективності проведення імуноблотингу.

Враховуємо, що середня кількість робочих днів за календарний місяць – 21 день, кількість годин робочого дня – 7 годин, кількість годин, необхідних для проведення імуноблотингу – в середньому 4 години. Тож загалом для дослідження було витрачено 240 хвилин. Розраховуємо вартість одиниці часу для проведення імуноблотингу: 6500/21/7/60×240 = 176,87 грн. Вартість витраченої електроенергії на роботу шейкерів, магнітних центрифуг, приладів електрофорезу, та витрати на освітлення під час проведення одного імуноблотингу в середньому складають 20 грн.

Витрати на амортизацію приладів, необхідних для проведення імуноблотингу, розраховуються в залежності від їх загальної вартості, що складає 500000 грн, строку 3 роки, часу використання при проведенні досліджень (4 год.), та кількості зразків, що можуть одночасно досліджуватися одночасно (9 зразків). Амортизаційні витрати складають: 500000/3/12/21/7/60×240/9 = 41,99 грн.

Загальна вартість відрахувань для податкової становить 36,2% та складає: (6500×36,2/100)/21 = 112,04 грн.

Таблиця. 4

Перелік розхідних матеріалів, витрачених на проведення імуноблотингу

Найменування реактиву	**Ціна за упаковку, грн.**	**Витрата для аналізу**	**Ціна за аналіз, грн.**
1	2	3	4
Набір тестових молекулярних маркерів, на 100 проб.	13200	20 дослідних зразків 20 контрольних зразків + 10 еталонних зразків	8250
Акриалмід 1кг	500	0,5кг	250
Трис-HCL 1кг	1600	200мл	320
Наконечники на 200 мкл	142 1000 шт	120шт	17,04
Наконечники на 10 мкл	110 1000 шт	120шт	13,2
ТЕМЕД 100мл	2152	40мл	860
Персульфат амонія 1кг	240	200г	48
Трихлороцетова кислота 1кг	1740	120мл	208
Меркаптоетанол 100г	1620	20г	324
Гліцерин 1л	348	200мл	69,6
Нітроцелюлоза 500шт	268	40шт	24,44
Сироватка крові бика 100мл	600	400мл	2400
Перекис водню 33% 100мл	150	40мл	26,66
		Всього	12810,97

Як видно з даних, поданих у (табл. 4), бачимо, що ветеринарні витрати на проведення імуноблотингу становлять 12810,97 грн.

$Вв_{заг}$ = (176,87+20+41,99+112,04+12810,97)/40 = 329,04 грн.

За проведеними розрахунками, собівартість імуноблотингу одного зразка коштує 329,04 грн.

В лабораторії одне дослідження коштує 500 грн.

Згідно отриманих даних, чистий прибуток від виконаної роботи становить: 500– 329,04 = 170,96 грн.

Отже, згідно проведених розрахунків, чистий прибуток від проведення імуноблотингу становить 170,96 грн за дослідження однієї проби.

3. ОХОРОНА ПРАЦІ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ

3.1 Аналіз стану охорони праці в умовах Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю агропромислового комплексу ДДАЕУ

Дипломна робота виконана на базі Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів агропромислового комплексу Дніпровського державного аграрно-економічного університету (далі – НДЦ). Охорона праці в НДЦ забезпечується відповідно до наказу Держнаглядохоронпраці від 20.04.99 N 67, затвердженого та зареєстрованого Міністерством юстиції України 11 жовтня 1999 року за N 695/3988 [1]. Відповідно до цього наказу особи, які досягли 18 років, та попередньо пройшли медичний огляд з відповідною спеціальною підготовкою та досконало ознайомлені з правилами роботи з культурами бактерій, вірусів та інших мікроорганізмів, з інфікованими або підозрюваними матеріалами, а також пройшли навчання з експлуатації лабораторного обладнання допускаються до роботи у відділах НДЦ [6].

Керівником з охорони праці у науково-дослідному центрі біобезпеки та екологічному контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету є професор Масюк Дмитро Миколайович.

При прийомі на роботу та протягом трудового стажу всі працівники науково-дослідного центру мають медичну книжку, в якій фіксується плановий медичний огляд. Якщо заподіяно шкоду здоров'ю, то згідно наказу ДНАОП 0.05-1.02-93 лабораторія змушена відшкодувати гроші кошти.

Тривалість робочого часу працівників встановлюється відповідно до Кодексу законів про працю України (322-08) та переліку виробництв, робота в яких дає право на додаткову відпустку та скорочений робочий день.

Усі працівники лабораторії повинні пройти інструктаж та ознайомитися з чинним законодавством про охорону праці: Закон України «Про охорону праці» [1]. Закон України «Про загальнообов’язкове державне соціальне страхування від нещасних випадків на виробництві та страхування на випадок виробничої непрацездатності» вимагає перевірки знань правил, положень та інструкцій з охорони праці в порядку встановлених для окремих робіт. Навчання на робочому місці організовує відділ охорони праці закладу, щоб навчити працівників правильно та безпечно виконувати свої завдання. Відповідальність за організацію навчання та перевірку знань про безпеку праці в науково-дослідному центрі покладається на керівників відділів.

Початкове навчання на робочому місці дає змогу пояснити основні вимоги безпеки під час роботи та після неї. Факти проведення інструктивного навчання фіксуються в журналі обліку робочого місця [6].

Позаплановий інструктаж проводиться при зміні правил техніки безпеки або при порушенні працівниками інструкції з охорони праці.

Фінансування охорони праці здійснюється керівництвом Дніпровського державного аграрно-економічного університету, а саме:

1. Реалізація загальнодержавних, галузевих та регіональних програм покращення безпеки, гігієни та умов праці щодо запобігання нещасним випадкам та професійним захворюванням, а також фінансування профілактичних заходів з охорони праці.

2. Планування організаційно-технічних заходів у сфері охорони праці є однією з провідних функцій у відділі охорони праці. Для планування необхідно визначити фактичний стан безпеки праці та майбутні прогнози. Завдяки планам покращуються умови праці та оздоровчі заходи. Створюються найкращі умови для роботи на виробництві.

Відповідно до ст. 17 Закону України «Про охорону праці» [1] роботодавець забезпечує фінансування та організовує проведення попереднього і періодичних медичних оглядів працівників. Всі працівники НДЦ мають санітарні книжки та періодично проходять диспансеризацію.

3.2 Аналіз небезпечних та шкідливих виробничих факторів

Працівники мають безпосередній контакт з матеріалами та речовинами, а також приладами, небезпечними для здоров’я та життя людей, тому для нормальної роботи в науковому центрі враховується ряд наступних аспектів: стан виробничих умов; організаційно-технічні заходи; пожежна безпека; характеристики речовин та обладнання; їх вплив на навколишнє середовище [4].

Вимоги до приміщень відділів НДЦ:

1) Робочі приміщення повинні бути чистими.

2) Освітлення приміщення має бути рівномірним і відповідати санітарним нормам. У робочу зону приладів не повинні надходити яскраві джерела світла.

3) Забезпечення приміщень вентиляцією.

4) Місце підготовки проби повинно бути окремо від місця аналітичного інструментарію.

5) Підлога та стіни приміщень, а також робоча поверхня меблів повинні бути гладкими, легко митися.

За кожним працівником у відділах, де проводиться дослідження, закріплюється певна посада та робоче місце. Перед входом у відділ працівник повинен надіти спеціальний одяг - халат, медичну шапочку, нітрилові або латексні рукавички та спеціальне взуття на вході до бактеріологічного або молекулярно-генетичного відділів.

Матеріали, що надходять для дослідження до відділів НДЦ, заходять через окремий для цього вхід. Приймається відповідальним працівником, який проходить інструктаж з охорони праці. У приміщені розбору матеріалу він готує, розподіляє та передає матеріал працівникам відповідних відділів, які будуть проводити його дослідження.

У кожному передбоксі та боксі відділів НДЦ розташовані бактерицидні лампи, які вмикаються за межами опромінюваної зони на 1-2 години за 30 хв. до початку роботи та після. Двері боксу та передбоксника повинні бути надійно закриті під час роботи. У цей час заборонено залишати бокс, та входити іншим співробітникам лабораторії.

Після закінчення роботи в боксі працівник прибирає робоче місце: проводить дезінфекцію робочої поверхні ламінарного та ПЛР боксу , столу, кювети та ін. приладів. Проводить вологе прибирання боксу, після чого обробляє підлогу, стіни й меблі дезрозчином. Приміщення прибирається раз на тиждень гарячою водою з милом, дезінфекційними засобами і витирається.

В кінці робочого дня забруднений матеріал кожен день поміщають в термостат або шафу, який потім герметично закривають.

Біологічні відходи знезаражують шляхом автоклавування. До експлуатації автоклавом допускаються працівники, які пройшли попередній медичний огляд, пройшли навчання за відповідною програмою, атестовані та мають посвідчення на право обслуговування автоклавів.

Гістологічне дослідження проводять з дотриманням заходів особистої профілактики. У розпорядженні спеціаліста повинен бути необхідний набір спецодягу, спецвзуття , предмети спецзахисту. Для дезінфекції рук, одягу, інструментів використовуються дезінфікуючі засоби, туалетне та господарське мило, паперові рушники. Необхідно мати аптечку з йодною настоянкою, бактерицидний пластир, клей БФ-2, перев'язувальні матеріали. У разі поранення рук негайно припинити роботу, видалити з рани якомога більше крові, продезінфікувати рану, заклеїти пластиром, при необхідності накласти пов'язку. Потім надягти інші рукавички і продовжити роботу.

Фартухи, нарукавники і рукавички після роботи миють щіткою з милом, обробляють дезрозчином і обполіскують чистою водою. Рукавички при багаторазовому використанні сушать рушником і присипають тальком. Халати і ковпаки міняють у міру забруднення, але не рідше 1 разу на тиждень. Прання проводять окремо від іншого спецодягу, обов'язково кип'ятять і прасують з парою. Спецвзуття очищають від бруду мильними розчинами, а потім протирають дезрозчином і споліскують чистою водою. Інструменти, спецодяг та взуття маркують і використовують тільки за призначенням, після закінчення терміну використання – утилізують спалюванням.

3.3. Пожежна безпека

Пожежна безпека в науково-дослідному центрі забезпечується шляхом проведення організаційних, технічних та інших заходів відповідно до «Правил пожежної безпеки в Україні» [2].

Для уникнення виникнення пожежі виконуються наступні правила протипожежної безпеки:

- регулярно перевіряють справність електроприладів та електроустаткування; ізоляцію електропроводів;
- забороняється паління у виробничих приміщеннях;
- не допускається перегрів приладів;
- проходи до щитків і виходу з центру не загороджуються.

У коридорі науково-дослідного центру встановлений щит з комплектом протипожежного обладнання: вогнегасниками, відрами з піском та пожежним краном. Вогнегасники розміщують також у приміщеннях, де проводяться роботи з легкозаймистими або вибухонебезпечними реагентами та вогненебезпечними нагрівальними приладами [5].

Відповідальність за пожежну безпеку покладена на директора науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету – Масюка Дмитра Миколайовича.

Метою його є підтримання рівня знань з техніки безпеки та проведення робіт.

ВИСНОВКИ

У дипломній роботі ідентифіковано молекулярні маркери інтестинальної системи та доведено їх прогностичне значення у формуванні цілісності епітеліального бар'єру та адаптивної імунної відповіді тканин тонкої кишки при епідемічній діареї свиней. Встановлено особливості патоморфологічних змін та інтенсивність ураження клітин тонкої кишки внаслідок реплікації вірусу. З'ясована динаміка сероконверсії специфічних антитіл до антигенів вірусу епідемічної діареї свиней, що підтверджується наступними висновками:

1. Особливістю патоморфологічних змін 12- палої кишки за ЕДС є розвиток атрофії та вкорочення макро- та мікроворсинок, що в сукупності з функціональними порушеннями і злущуванням значної кількості клітин епітелію призводить до пригнічення функції всмоктування і розвитку профузної водянистої діареї.

2. Динаміка екскреції вірусу ЕДС протягом раннього постнатального періоду знижується в обох групах. У поросят дослідної групи тривалість екскреції була менша на 7 діб у порівнянні з тваринами контрольної групи. Кількість збудника ЕДС на 5- добу після інокуляції достовірно зменшувалась у 35,43 рази у поросят дослідної групи у порівнянні з контрольною. Такі зміни, ймовірно, пов'язані з дією ізотонічно-протеїнової суміші яка покращує метаболічний стан ентероцитів та, як слід ускладнює репродукцію коронавірусу в цитоплазмі кишкових клітин.

3. Концентрація специфічних антитіл у сироватці крові поросят після інокуляції вірусу ЕДС з часом зростає в обох піддослідних групах. Порівнюючи показник концентрації IgG спостерігається збільшення індексу S/P у дослідній групі тварин з 21- доби після інокуляції в середньому в 1,37 рази, у порівнянні з тваринами контрольної групи. Застосування ізотонічної протеїнової суміші поросятам спряє більш інтенсивному синтезу специфічних антитіл, що, ймовірно, обумовлено стабілізацією

гомеостатичних показників тонкої кишки, та позитивно відображається на реактивності організму.

4. Встановлено, що відносний вміст інтерферону-альфа збільшується з часом протікання інфекції, в той час як відносний вміст Е-кадгерину спадає. Це, ймовірно, вказує на те що певна ступінь руйнування ентероцитів викликає відповідну імунну відповідь, що супроводжується модуляцією імунної відповіді та втратою адгезивної міцності. Разом, зміни вмісту цих маркерів клітинної відповіді можливо використовувати як прогностичний показник розвитку ЕДС.

5. За результатами досліджень відносний вміст Е-кадгерину, як показник цілісності захисної функції кишечника достатньо зменшується в поросят контрольної групи. Це, ймовірно, вказує на руйнування клітин слизової оболонки кишечника та зменшення синтезу адгезивних білків, що є показником погіршення бар'єрної функції кишечника за умов розвитку епідемічної діареї свиней.

6. Використання визначення змін вмісту біомаркерів міжклітинної адгезії та модуляції імунної відповіді інтестинальної системи свиней із застосуванням методу імуноблотингу приносить НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК ДДАЕУ чистого прибутку на суму 170,96 грн за дослідження однієї проби.

Пропозиції виробництву

Пропонуємо свинокомплексам, свинофермам та профільним лабораторіям застосовувати метод імуноблотингу для ідентифікації молекулярного маркера адгезії – Е-кадгерину, та молекулярного маркера адаптивної імунної відповіді – інтерферону-альфа, як прогностичних показників цілісності бар'єрної функції кишечнику під впливом вірусу епідемічної діареї свиней. Для якісної та кількісної діагностики збудника ЕДС рекомендуємо застосовувати полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі, та визначати наявність специфічних антитіл до віруса

епідемічної діареї свиней методом твердофазного імуноферментного аналізу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Закон України «Про охорону праці. : за станом на 1 січ. 2016 р. / Верховна Рада України. – Офіц. вид. – К.: Основа,. вид-во, 2017. – 52 с.

2. Закон України «Про пожежну безпеку».: за станом на 1 січ. 2006 р. / Верховна Рада України. – Офіц. вид. – К.: Основа,. вид-во, 2007. – 56 с.

3. Методичні рекомендації до виконання і захисту дипломних робіт освітньо-кваліфікаційних рівня «Магістр» ветеринарної медицини / Дніпровський державний аграрно-економічний університет. – 2018.– 58 с

4. Наказ Держнаглядохоронпраці «Про правила охорони праці в лабораторіях ветеринарної медицини» (офіційне видання) № 67 від 20.04.1999 р. // Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 11 жовтня 1999 р. за N 695/3988

5. Гааль Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Гааль Э., Медьеши Г., Верецкеи Л. // Пер. с англ. – М.: Мир, 1982. – 448 с.

6. Гандзюк М.П. Основи охорони праці: Підручник. 4-е вид. / Гандзюк М.П., Желібо Є.П., Халімовський М.О. // За ред. М.П. Гандзюка. – К.: Каравела, 2008. – С. 384

7. Еверт В.В. Епідемічна діарея свиней – нова загроза для нашого свинарства / В.В.Еверт, О.А.Шептуха // «Прибуткове свинарство». – №3. – 2014. – С.21.

8. Кокарєв А.В. Загальні уявлення про коронавірусні ентерити у свиней та особливості їх лабораторної діагностики / Кокарєв А.В., Коляда С.Г., Мовкалова Г.С., Крайній А.В., Масюк Д.М. // Журнал Корми і Факти, кві. 2016, – №4(68), – С. 33–35

9. Кокарєв А. В. Застосування молекулярно-генетичного методу для діагностики епідемічної діареї свиней / А. В. Кокарєв, Д. М. Масюк, С. А.

Шаталов // Матеріали дванадцятого міжнародного конгресу спеціалістів ветеринарної медицини. – Київ, 9-10 жовтня 2014 р. – С. 48-49

10. Стародуб Н.Ф. Белковый иммуноблот и иммунодот в биохимических исследованиях / Стародуб Н.Ф., Артюх В.П., Назаренко В.И., Коломиец Л.И. // Укр. Биохим. Ж. – 1987. – Т. 59, № 3. – С. 108–117

11. Allaire J.M. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity Crowley / Allaire J.M., Law H.T., Chang S.Y., Ko H.J., Vallance B.A. // Trends Immunol. 2018, – №.39, – P. 677–696.

12. Bai Y. The Murine Reg3a Stimulated by Lactobacillus casei Promotes Intestinal Cell Proliferation and Inhibits the Multiplication of Porcine Diarrhea Causative Agent in vitro. / Yongfei Bai, Yanmei Huang, Ying Li, Bingbing Zhang // 2021 – №4(2): – P. 15-32

13. Bazzoni G. Endothelial cell-to-cell junctions: Molecular organization and role in vascular homeostasis / Bazzoni G., Dejana E. // Physiol. Rev. 2004, – №. 84, – P. 869–901

14. Bhat A.A. Tight junction proteins and signaling pathways in cancer and inflammation: A functional crosstalk. / Bhat A.A., Uppada S., Achkar I.W., Hashem S., Yadav S.K., Shanmugakonar M. S. // Front. Physiol. 2019, – №. 9, – P. 1942.

15. Bruno M.E. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor by the classical and alternative NF-κB pathways in intestinal epithelial cells. / Bruno M.E., Frantz A.L., Rogier E.W., Johansen F.E., Kaetzel C.S., // Mucosal Immunol. 2011, – №.4, – P. 468–478

16. Buckley A. Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease / Buckley A., Turner J.R. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2018,– № 10, –P. 67–90. a029314

17. Chelakkot C. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications / Chelakkot C., Ghim J., Ryu S.H. // Exp. Mol. Med. 2018, – №. 50, – P. 103

18. Chen J. Complete genome sequence of a Chinese virulent porcine epidemic diarrhea virus strain / J. Chen, C. Wang, H. Shi // J. Virol. – 2011. – № 85. – P. 1538–1539

19. Dürer U. TFF3 and EGF induce different migration patterns of intestinal epithelial cells in vitro and trigger increased internalization of E-cadherin. / Dürer U., Hartig R., Bang S., Thim L., Hoffmann W. // Cell. Physiol. Biochem. 2007, – №. 20, – P. 329–346.

20. Elphick D.A. Their role in innate immunity and inflammatory disease paneth cells. / Elphick D.A., Mahida Y.R., // Gut 2005 – №. 54 – P. 1802–1809.

21. Farin H.F. Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN-γ. / Farin, H.F., Karthaus W.R., Kujala P., Rakhshandehroo M., Schwank, G., Vries, R.G.J., Kalkhoven, E., Nieuwenhuis, E.E.S., Clevers, H. J. // Exp. Med. 2014 – №. 211, – P.1393–1405.

22. Gassler N. Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. World J. Gastrointest. Pathophysiol. 2017, – № 8, – P. 150–160.

23. Gavrylenko A.V. Epidemichna diareja svynej: pidhody do profilaktyky ta kontrolju. / Gavrylenko, A.V. Nedosjekov, V.V. // Veterynarna medycyna Ukrai'ny. 2015 – № 8, – P. 7–10

24. Gierýnska M. Integrity of the Intestinal Barrier: The In№vement of Epithelial Cells and Microbiota Szulc-D / Gierýnska M., Abrowska L., Struzik J., Mielcarska M.B., Gregorczyk-Zboroch K.P. // A Mutual Relationship. Animals 2022 – №. 12, – P.145

25. González J.M. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae / J.M. González, P. GomezPuertas, D. Cava nagh // Arch. Virol. – 2003. – № 148. – P. 2207–2235

26. Gregory W. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences / W. Gregory, Hoang Hai, J.K. Schwartz // Journal of Veterinary Diagnostic. – 2013. – № 20 (10). – P. 1177–1182

27. Grondin J.A. Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning From Clinical and Experimental Studies / Grondin J.A., Kwon Y.H., Far P.M., Haq S., Khan W.I., // Front. Immunol. 2020, – №. 11, – P. 2054.

28. Hermiston M.L. Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system / Hermiston M.L., Wong M.H., Gordon J.I. // Genes Dev. 1996, – №. 10, – P. 985–996

29. Hermiston M.L. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: Essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death / Hermiston M.L., Gordon J.I. // J. Cell Biol. 1995, – №. 129, – P. 489.

30. Karam S.M. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. Bioscience 1999, – №. 4, – P. 286–298.

31. Kobayashi N. The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases. / Kobayashi N., Takahashi D., Takano S., Kimura S., Hase K. // Front. Immunol. 2019, – №.10, P. 2345

32. Kuldeep S.C. Strategies for design and application of enteric viral vaccines / S.C. Kuldeep, A.R. James, J.S. Linda // Annual Review of Animal Biosciences. – 2015. – № 3. – P. 375–395

33. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – №. 227. – P. 680–685

34. Lee, S.H. Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. / Intest. Res. 2015, – №. 13. – P. 11.

35. Lin H. Development and application of an indirect ELISA for the detection of antibodies to porcine epidemic diarrhea virus based on a recombinant spike protein. / Lin H., Zhou H., Gao L., Li B., He K., Fan H. // BMC Vet. Res. 2018 – №14(1): P. 243

36. Masiuk D. M. Endemic course of epidemic diarrhea of pigs in the stabilized focus of infection. / Masiuk D. M Sosnitsky O. I., Nedzvetsky V. S., Kokarev A. V., Koliada S. G. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 2017, – №8(3), – P. 410-416. doi.org/10.15421/021763)

37. Masiuk D. M. Epidemiology, etiology and gene analysis of spike S protein of porcine epidemic diarrhea virus infection in Ukrain e during / Masiuk D. M, Sosnitsky O. I., Nedzvetsky V. S., Kokarev A. V., Koliada S. G // Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2016 – 2017, – №. №8(4) – P. 602 – 610

38. Masiuk D. M. Expression of plasmolemma proteins of the absorptive enterocytes of the cattle in the late fetal period // Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences. 2020, – № 3(1) – P. 52–57

39. Meng W. Molecular architecture and regulation. / Meng W, Takeichi M. // Adherens junction: Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2009, –№7(6) – P. 678–690

40. Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // Anal. Chem. 1959. – №. 31, № 5. – P. 964–966

41. Orljankin B.G. Protivovirusnyj immunitet i strategija specificheskoj profilaktiki virusnyh boleznej svinej. / Materialy Mezhdunar. nauch. konf.; Federal'nyj gos. in–t. Vladimir: VNIIZZh, 2008 – №3 – p. 129–145

42. Paarlberg P.L. Updated estimated economic welfare impacts of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) / P.L. Paarlberg // Dept. of Agricultural Economics. – 2014. – № 14. – P. 2038

43. Paradis T. Tight junctions as a key for pathogens invasion in intestinal epithelial cells. / Paradis T., Bègue H., Basmaciyan L., Dalle F., Bon F. // Int. J. Mol. Sci. 2021, – №. 22, – P. 2506

44. Park J.H. Promotion of intestinal epithelial cell turnover by commensal bacteria: Role of short-chain fatty acids / Park J.H., Kotani T., Konno T., Setiawan J., Kitamura Y., Imada S., Usui Y., Hatano N., Shinohara M. // PLoS ONE, 2016 – №3 – P. 56-76

45. Pelaseyed T. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system / Pelaseyed T., Bergström J.H., Gustafsson J.K., Ermund A., Birchenough, G.M., Schütte A. // Immunol. Rev. 2014, – №. 260, – P. 8–20

46. Pensaert M.B. Poucine Epidemic Diauuhea Virus Virus Infections of Poucines. Elsevier, 1989 – P. 167–176

47. Pospischil A. Light microscopy and ultrahistology of intestinal changes in pigs infected with EVD: Comparison with TGE virus and porcine rotavirus infections / Pospischil A., Hess R.G. // Zentralbl. Veterinarmed. B. - 1999. – №.28. – P.564-577

48. Pritchard G.C. Transmissible gastroenteritis in endemically infected breeding herds of pigs in East Anglia, 1981-85 / GC. Pritchard // The Vet. Rec. – 1987. – № 120. – P. 226–230

49. Rodríguez-Colman M. J. Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function / Rodríguez-Colman M.J. Schewe M., Meerlo M., Stigter E., Gerrits J., Pras-Raves M., Sacchetti A., //. Nature 2017, – №. 543, – P.424–427

50. Schneider M.R. A key role for E-cadherin in intestinal homeostasis and paneth cell maturation / Schneider M.R., Dahlhoff M., Horst D., Hirschi B., Trülzsch K., Müller-Höcker J., Vogelmann R. // PLoS ONE 2010, – № 5, – P. 47–67

51. Sidiq T. A critical regulator of ileal microbiota and Crohn’s disease. / Sidiq, T., Yoshihama, S. Downs, I., Kobayashi, K.S. // Nod2: Front. Immunol. 2016 – №. 7, – P. 367

52. Song D. Porcine epidemic diarrhea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines / D. Song, B. Park // Virus Genes. – 2012. – № 44 (2). – P. 167–175

53. Song D. Effects of disinfection on the molecular detection of porcine epidemic diarrhea virus / D. Song H. Moon, B. Kang //2015 – №. №179 (3-4), P. 213-218

54. Song D. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. / D. Song, H. Moon, B. Kang // Clin Exp Vaccine Res. – 2015, 4(2), – P. 166–176

55. Sun W.W. Nanoarchitecture and dynamics of the mouse enteric glycocalyx examined by freeze-etching electron tomography and intravital microscopy / Sun W.W., Krystofiak E.S., Leo-Macias A., Cui R., Sesso A., Weigert R., Ebrahim S., Kachar B. // Commun. Biol. 2020, – №4(5) – P.78–89.

56. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. Cell. Mol. Life Sci. 2013, – №. 70 – P. 631–659

57. Towbin H. Immunoblotting – an update / Biochem. Soc. Trans. – 1988. – №. 16, № 2. – P. 131

58. Turula H. The role of the polymeric immunoglobulin receptor and secretory immunoglobulins during mucosal infection and immunity / Turula H., Wobus C.E. // Viruses 2018, – №. 10, – P. 237

59. Van Itallie C.M. Claudins and epithelial paracellular transport. / Van Itallie C.M., Anderson J.M. // Annu. Rev. Physiol. 2006, – №. 68, – P. 403–429

60. Venegas D.P. Short chain fatty acids (SCFAs) mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases / Venegas D.P., Landskron G., González M.J., Quera R., Dijkstra G., Harmsen H.J., Faber K.N., Hermoso M.A. // Front. Immunol. 2019 – №.10, – P. 277

61. Zihni C. Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates. / Zihni C., Mills C., Matter K., Balda M.S. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2016, – №. 17, – P. 564–580

ДОДАТКИ

Додаток 1.

Px інгредієнти

- **Склад:**
  - Декстроза, натрію хлорид, калію хлорид, сироватковий білок, мононатрійфосфат, амінокислоти
- **Добавки:**
  - смакові сполуки, консервант, стабілізатор.
- **Поживні речовини:**
  - 16.6% сирого протеїну; 0.7% сирих олій та жирів; 19.1% сирої золи (мінеральні речовини); <0.1% сирої клітковини; sodium 5.2%.

Додаток 2.

EXOPOL
DIAGNOSTICS

EXOone PEDV BASIC

Quick Protocol **qPCR kit Ref. No. PEDV_BAS**

For faeces, rectal swabs and intestine, cultures and vaccines; from Swine

Reference	Description	Presentation
PEDV Basic qPCR tube	Tube contains lyophilized primers and probe for specific pathogen detection.	1 tube (100 rxns)
PDG2 POSITIVE CONTROL	Lyophilized specific synthetic DNA[a]	1 tube
Buffer A	Reconstitution Buffer / Negative control	1 tube (1 ml)

[a] See the Quality Control Certificate for copy number.
NOTE: For a best performance of the assay store reagents at -20°C after arrival.

Required material but not provided in the kit

- Nucleic acid sample
- Micropipettes and sterile tips with filter
- Real-time PCR thermocycler + software
- Powder-free vinyl gloves
- Microcentrifuge (optional)
- qPCR / RT-qPCR Master Mix

Reconstitution of lyophilized reagents

Reconstitute Basic qPCR tube and Positive control separately:

1. Spin briefly (15 sec) to ensure the material is in the bottom of the tube.
2. Reconstitute Basic qPCR tube (100 µl) and Positive Control (250 µl) with Buffer A. Keep the tube for 10 min. at room temperature.
3. Vortex gently before use.
4. Generate aliquots of suitable volumes and store them at -20°C.

Preparation of real-time PCR assay

The qPCR setup will depend of your reagents concentration, please use the following pippeting squeme as a model:

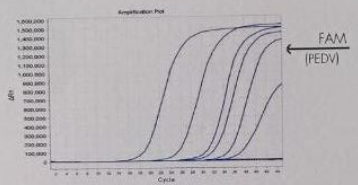
Stage	Component	Per sample
Preparation of qPCR mix	50X RT enzyme qPCR mix one-step	0.8 µl
	2X qPCR Master mix Buffer [c]	10 µl
	PEDV Basic qPCR tube mix (20X)	1 µl
	Nuclease-free water	up to 15 µl
	Total Volume of PCR mix	**15 µl**
Preparation of qPCR assay	qPCR Mix	15 µl
	Sample/Positive control/Negative control [d]	5 µl
	Final Volume	**20 µl**

[c] NOTE: use only a mastermix without passive reference dye (ROX, fluorescein, etc)
[d] Always include at less one negative control and a positive control in the PCR run.

Thermal Protocol

Cycles	Time	Temperature
1 cycle	15 min.	45ºC
1 cycle	5 min.	95ºC
42 cycles	15 sec.	95ºC
	60 sec.[e]	60ºC

[e] Data Collection
PEDV (FAM)
- In Applied Biosystem thermocyclers do not use ROX as passive reference

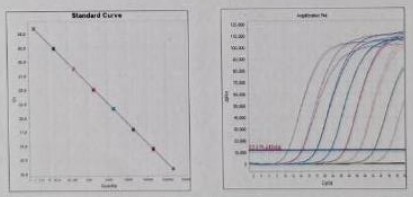


Interpretation of Results:

A sample is considered positive if Cq value is ≤ 38.
Positive control should result positive with a Cq value ranging those stablished in the QC sheet of this kit. No amplification should be observed for the Negative control. For a detailed interpretation of the results please refer to the User's manual of this kit.

Absolute quantification. Standard curve preparation.

- Reconstitute Positive Control with 250 µl of Buffer A.
- Make 5 ten-fold dilutions (10^{-1} to 10^{-5}) with Buffer A or nuclease-free grade water.
- Amplify 2-3 replicates in the same thermocycler run.



These figures should be considered only as an example of a Standard curve. Cq values might not match exactly with those obtained with this assay.

Pol Río Gállego D8 - 50840 San Mateo de Gállego - Zaragoza
Tl. 976 69 45 25 - www.exopol.com - info@exopol.com

ISO 9001

Додаток 3

HANDBOOK

BioExtract® SuperBall®

Cat. N° BES384 and BES384WO

ALL SPECIES

Extraction and Purification of Total Nucleic Acids by magnetic beads using devices equivalent to KingFisher™ Flex, 96, Duo, mL
For pathogens detection from animal samples or environment:
- **viral RNA/DNA**
- **bacterial DNA**
- **parasite DNA**
- **genomic RNA/DNA**

Veterinary use only

SIMPLIFIED PROTOCOL

	KingFisher™ Flex or 96	KingFisher™ Duo	KingFisher™ mL	Element to add
1 Plate or Strip Preparation	Deep-well Lysate	Row A	Position A	Lysate : 20 µl of Proteinase K; 100-200 µl of pretreated sample*; 500 µl LAB-SMB-carrier Lysis Solution + exogenous IPC
	Deep-well Wash 1	Row E	Position B	700 µl W1 Buffer
	Deep-well Wash 2	Row F	Position C	700 µl W2 Buffer
	Deep-well Wash 3	Row G	Position D	750 µl Ethanol (96-100%)
	Elution microplate	Elution strip	Position E	50-200 µl EL Buffer *
	Rod cover microplate	Row B (Rows C, D and H are empty)	Rod cover placed manually	Rod Cover
2 KingFisher™	• Switch on the KingFisher™ Flex, 96 Duo or mL. • Slide open the front door of the protective cover. • Select the corresponding BioExtract® SuperBall® program. • Press START and follow the messages to load the different slots of the worktable.			

*For sample volume and elution volume, please refer to the specific extraction handbook of each Bio-T kit® or contact BioSellal Technical Service (tech@biosellal.com).

To get the KingFisher ™ program corresponding to the KingFisher™ system you are using (Flex, 96, Duo or mL), please contact our technical support (tech@biosellal.com).

Додаток 4.