



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения** К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

(21) 1300779

(22) 14.03.2013

(46) Бюл. 166, 2020

(71)(73) Шарипов М.А. (TJ)

(72) Шарипов М.А. (TJ); Мирзоев Д.М. (TJ); Салимов Т.М. (TJ)

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ШТАММА
ИНФЕКЦИОННОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА
ПЕРЕПЕЛОК**

(56) 1. Бакулев И. А. Рекомендации по методике эпизоотологического исследования». Покров, 1975, 67с.

2. Adamstone F.B. The effects of vitamin E deficiency on the testis of the male fowl (Gallus domesticus) / F.B. Adamstone, L.E. Card. // J. Morphol. – 1934. – Vol. 56. – P. 339 – 359.

3. «Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц», под ред. Б.У.Кэльнека и др., пер. сангл. 10.с. изд. М. Аквариум, 2003, стр. 621-635.

4. Miyamae T. Invasion of avian encephalomyelitis virus from the gastrointestinal tract to the central nervous

system in young chickens / T. Miyamae // Am. J. Vet. Res. – 1983. – Vol. 44. – P. 508 – 510.

5. Дмитриева М.Е. «Рекомендации по диагностике и профилактике инфекционного энцефаломиелита птиц (ИЭП). (Дмитриева М.Е., Джавадов Э.Д., Соколова Л.Н., СПб., 2005, 36с.

6. Коровин Р.Н. Справочник ветеринарного врача птицеводческого предприятия, под ред. Р.Н.Коровин.-СПб., 1995, Т1-160с.

(57) Изобретение относится к области ветеринарной медицины, а именно к вирусологии.

Сущность изобретение заключается в изучении и разработки наиболее эффективных методов диагностики и профилактики, изучения клинических и патоморфологических признаков (описание развития и последствия заболевания), а также серологического и гистологического исследования патологического материала, для исследования формирования у перепелок иммунитета к остро-протекающему вирусному заболеванию, сдерживающему рост и развитие перепелок, снижающему их продуктивность и имеющему отрицательные экономические последствия.

Изобретение относится к области ветеринарной медицины, а именно к вирусологии. Получения штаммов энцефаломиелита перепёлок имеет важное значение для изучения наиболее эффективных методов диагностики и профилактики остропротекающего вирусного заболевания-энцефаломиелита, сдерживающего рост и развитие птицы, снижающего ее продуктивность, имеющего отрицательные экономические последствия.

Аналоги не выявлены.

Целью изобретения является получения, т.е. выделения штамма инфекционного энцефаломиелита от головного и спинного мозга больных перепелят.

Цель достигается тем, что от исходного материала-головной и спинной мозг больных перепелят путём многократного пассажа было выделено штамм инфекционного энцефаломиелита перепёлок.

Важность изобретения - изучение структуры соответствующих штаммов для получения вакцины, которая должна войти в схему вакцинопрофилактики вирусной инфекции перепёлок. Также можно в дальнейшем более подробно изучить физико-химические свойства и антигенную структуру вируса энцефаломиелита перепёлок, а также изучить все стороны этиологии, патогенеза, диагностики, профилактики и других параметров болезни.

Эпизоотологию энцефаломиелита были изучены согласно эпизоотологических рекомендации Бакулева И.А [1].

Научная техническая новизна предлагаемого изобретения состоит в том, что впервые в РТ (на одной из перепеловодческих ферм, 2007-2008 гг) диагностирован инфекционный энцефаломиелит перепёлок, выявлена вариабельность проявления клинических признаков инфекционного энцефаломиелита перепёлок, а также зависимость между клиническими симптомами и патологоанатомическими изменениями.

При получении штамма использованием гистологическое исследование патологического материала, реакция гемагглютинации (РГА), серологический анализ, иммуноферментный анализ (ИФА) с наборами «BioChek», с обработкой результатов с помощью компьютерной программы «BioChek» в соответствии с исследования и «Временным наставлением по применению набора для обнаружения в ИФА антител к инфекционному энцефаломиелиту птиц», разработанному фирмой «BioChek» совместно с (ФГУ ВГНКИ) Федеральное государственное учреждение, Всероссийский научно-исследовательский контрольный институт.

Обнаружения возбудителя(вируса) и его идентификация является главным и наиболее надёжным методом диагностики инфекционного энцефаломиелита перепёлок и вообще птиц. Надёжным источником для выделения вируса является головной мозг [2]. Для выделения вируса чаще используют кусочки различных отделов головного и спинного мозга[3]. Поджелудочная железа и двенадцатиперстная кишка помимо мозга, являются, как обнаружил Мьямена надёжным источником вируса[4]. Вирус можно выделить и из

помёта больных птиц, но ввиду преобладания других микроорганизмов и других обстоятельств, выделение из помёта имеет меньшее диагностическое значение[5].

Для проведения гистологического исследования, из 3-х вынужденно убитых 13-дневных перепелят с клиническими признаками энцефаломиелита-поражение центральной нервной системы (ЦНС), были изъяты патологические материалы (головной мозг, поджелудочная железа, сердце, ткань из железистого и мышечного желудка) в конце инкубационного периода, т.е. начало момента парализации. Здесь важно помнить, что вирус в максимальных концентрациях содержится в тканях центральной нервной системы, именно в этот период[6].

Вскрытие перепелят проводили по общепринятой методике. Патологический материал поместили в раствор забуференный 50%-ный глицерин (рН 7,4). Также брали для гистологического исследования кусочки различных отделов головного и спинного мозга и тут же были погружены в 10%-ный забуференный формалин. Головной мозг извлекая целиком, помещали в глицерин (фиксирующую жидкость), выдерживали в 5%-ном растворе нейтрального формалина в течение 12 часов, затем помещали в 10%-ный раствор формалина (объём фиксирующей жидкости превышает объём материала в 10 раз).

Ход работы. Из кусочков ткань различных отделов головного и спинного мозга готовили 10%-ную суспензию (на фосфатно-буферном растворе), предварительно материал отмывали от глицерина, так как материал был консервирован глицерином. Суспензию дважды замораживали и оттаивали, затем центрифугировали при 5тыс об/мин. в течение 30 мин. Надосадочную жидкость обрабатывали пенициллином 1тыс ЕД+ синтомицина 500 мкг на 2мл, и выдерживали в течение 1ч. При комнатной температуре, проверяли на отсутствие бактериальной микрофлоры, затем использовали для заражения культуры клеток.

Выделение вируса в культуре клеток. Материал каждого испытуемого образца вносили по 0.1мл в 4 пробирки с культурой клеток после адсорбции (при t37* С 30 мин.) В каждую пробирку заливаем поддерживающую среду по 0.9 мл. Для контроля 4 пробирки с культурой клеток оставляли незараженными. При первых пассажах цитопатическое действие слабо выражены, поэтому присутствие деструкции заражённой культуры на 7-й день её замораживали и оттаивали, затем этим же материалом заражали свежее монослойные культуры (по 0,2мл). Материал каждого испытуемого образца пассировали 3-4 раза.

Цитопатические изменения, вызываемые в клетках культуры вируса (выражается) в скопление округлившись клеток с повышенной светопреломляемость (рефрактильность), которое становятся заметными на 3-5 день после заражения. Пораженные клетки отделяются от поверхности стекла: по мимо очагов дегенерации, появляются участки, лишённые клеток.

В результате гистологического исследования выявлена характерная для инфекционного энцефаломиелимита перепёлок микроскопическая патология обнаружено изменения, выражающихся в зернистости и ацидофилии протоплазмы, конденсации хроматина и эксцентричном положении ядра.

В ганглиозном слое мозжечка отмечено характерные поражения клеток Пуркинье, ядро которых увеличено и смещено к периферии клетки. Часть клеток Пуркинье подвергалась дегенерации и некрозу, а на месте распавшихся образовались гомогенные ацидофильные гранулы. В результате пролиферации и очагового скопления клеток нейроглии образовались глиальные узелки.

В продолговатом мозге отмечены различные поражения двигательных нейронов-центральный хроматоз, смещенное к периферии клетки ядра, некроз, нейрофагия. Контуров части ядер размыты, отдельные клетки подвергались полному распаду.

От поджелудочной железы, сердца, железистого и мышечного желудка было отобрано кусочки тканей размером 1см² и толщиной 0,2-0,5см, помещали в консервирующий раствор, приготовленный по методу Кальтера С.С. Срезы изготовлены на микротоме и были окрашены по Нисслю (гематоксилин+эозин).

Гистологические срезы исследовали методом темнопольной микроскопии. Для микроскопического исследования (темнопольная микроскопия) гистологических срезов применяли световой микроскоп.

В срезах поджелудочной железы в междольковой соединительной ткани и в области островков Лангерганса наблюдали лимфоидно-клеточный пролиферат в виде округлого, увеличенного, ограниченного от окружающей ткани лимфоцитарного фолликула. Муфты, состоящие из 3-4 слоев клеток свидетельствующие о периваскулярной клеточной инфильтрации вокруг сосудов, обусловленной скоплением лимфоцитов, лимфобластов, гистиоцитов и плазматических клеток, присутствуют в срезах мышечного желудка. Характерным для инфекционного энцефаломиелимита перепёлок является и скопление лимфоцитов в мышечной стенке железистого желудка.

Постановка РГА (реакция гемагглютинация) с аллантоисной жидкостью от инфицированных эмбрионов. Эритроциты для постановки РГА готовят из крови петуха и получают ее дефибрированием с использованием стеклянных шариков (бус). (РГА ставят на плексиглазовых титрационных планшетах. Общепринятым способом в лунках готовят двукратные разведения вирусосодержащего материала (аллантоисной жидкости), начиная с 1: 2 до 1: 2048. После раститровки планшет оставляют на 30 мин. при комнатной температуре. Через установленное время во всех лунках планшета наблюдают скопление осевших эритроцитов в центре лунок в виде «пуговки» с ровными краями, что указывает на отсутствие агглютинации. Сыворотка. Отбор проб крови брали из подкрыльцовой вены, в количестве 25 проб от каждой партии. Кровь собирали в пробирках. Пробирки с кровью прогревали в

термостате при t = + 37⁰С в течение 20 мин. Затем стеклянной палочкой отделяли сгусток от стенок пробирки. Пробирки отстаивали в холодильнике при t = + 8⁰С в течение 4 часов и отсасывали сыворотку.

Сыворотку в пробирках инактивировали на водяной бане при t = + 56⁰С в течение 30 мин.

Проведение серологического анализа - исследование (500 проб сывороток крови) проведено в лаборатории болезней птиц Института ветеринарии Таджикской академии сельскохозяйственных наук (ТАСХН) на оборудовании и наборах фирмы BioChek. Первое исследование этой партии перепелят проведено на 15 день после вспышки болезни (во время начала яйцекладки). Средний геометрический титр составляло 7146 (CV 60%, разброс титров 306-11689), что в соответствии с методикой интерпретации результатов свидетельствовало о недавнем действии вируса и подтверждало результаты гистологического исследования. Передача вируса от родительского стада была исключена отрицательными результатами ИФА(иммуноферментный анализ) еще во время вспышки болезни.

Результаты исследования крови перепелят на инфекционный энцефаломиелит методом ИФА.

Таблица 1

	Возраст, нед. 5 (начало яйцекладки)	Возраст, нед. 10 (пик яйценоскости)	40 (перед убоем)
Ср. геом. титр	7146	9356	14478
CV, %	60	41	23
Разброс титров	306 - 11689	405 - 13456	4025 - 19034

Результаты серологических исследований выражают в обратных значениях титров.

Патологоанатомическая картина. У павших перепелят наблюдали плотное скопление лимфоцитов в результате пролиферативных процессов в мускулатуре мышечного желудка, гиперимия поджелудочной железы. Определить точный диагноз болезни очень трудно, потому что многие характерные клинические симптомы, патологоанатомические изменения, которые наблюдаются при инфекционном энцефаломиелите присущи другим болезням и некоторым авитаминозам.

Поэтому важно дифференциация диагноза болезни - эпизоотологические, клинические данные и другие виды исследований в условиях лаборатории, так как патологоанатомические признаки выражены плохо, ясное выделение отсутствует.

ИЭП дифференцируют от кормовой энцефаломалиции, гипо и авитаминозов Е, В1, В2, Д3, перозиса, подагры, нефрита, болезнь Марека, ньюкаслской болезни, церебрального аспергиллёза, бактериальных инфекций, стрептококкоза, пастереллёза и других болезней, отравления мышьяковистыми препаратами/5,6/.

Таблица 2.

№ п/п	Болезни	Эпизоотология болезни
1.	Энцефаломиелит	Поражается центральная нервная система (ЦНС), гиперимия поджелудочной железы, интерстициальный панкреатит
2.	Болезнь Ньюкасла	Поражается периферическая нервная система
3.	Болезнь Марека	Поражается периферическая нервная система и лимфатических органов
4.	Энцефаломалиция	Развивается на 2-3 недели позже энцефаломиелимита
5.	Авитаминоз	Нарушение функции нервной системы

Преимущество. Исследование эпизоотического процесса, патогенеза, клинических симптомов, патологоанатомических изменений инфекционного энцефаломиелимита у перепёлов дало возможность описать клинические симптомы, этиологические факторы, серологические и патологоанатомические изменения инфекционного энцефаломиелимита у новорожденных птенцов в возрасте 7-21 дней и у взрослых перепёлок.

Преимуществом является также изучение эпизоотологии, течение, патологоанатомические изменения и др. особенности среди перепёлок в условиях лаборатории и производства, профилактика болезни, разработка инструкций и наставлений, руководство по профилактике и ликвидации болезни. Кроме того получение штамма энцефаломиелимита даёт возможность разработки соответствующей вакцины против этой болезни и тем самым можно предупредить снижение продуктивности- яйценоскости, качество скорлупы яиц, снижение выводимости племенных яиц, увеличение отхода птенцов 8-20 дневного возраста и т.п..

Формула изобретения

Способ получения штамма энцефаломиелимита перепёлок включает в себя выделения штамма энцефаломиелимита из кусочков ткани различных отделов головного и спинного мозга, и для этого изготавливают 10%-ную суспензию на фосфатно-буферном растворе (предварительно кусочки отмывают от глицерина этим же буферным раствором, так как материал консервируют глицерином) и дважды замораживают, затем растаивают и центрифугируют при 5 тыс. об/мин в течение 30 мин., далее надосадочную жидкость

обрабатывают пенициллин+синтомицин (1 тыс. ЕД+500 мкг на 2мл), выдерживают в течение 1 часа и проверяют на отсутствии бактериальной микрофлоры, используют в дальнейшем для заражения культуры клеток с последующим многократных пассажах культуры, затем повторно заражают и наблюдают за цитопатическое действие штамма и выявляют характерные для инфекционного энцефаломиелимита гистологических изменений под световым микроскопом методом тёмнопольной микроскопии.

Компьютерный набор: Ризоева С.Р.

Заказ	Тираж	Подписное
Национальный патентно-информационный центр РТ 734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а		