БелендикІннаВалентинівнаЛабораторнадіагностикаабортівукобилвикликанихвірусомЕНДискандветнаукДержветтафітосанслужбаУкраїниДержнаукконтролінтбіотехнологіїіштамівмікроорганізмівКс

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ**

**І****НСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ**

*На правах рукопису*

**БЕЛЕНДИК ІННА ВАЛЕНТИНІВНА**

**УДК 619:616.98:578.833.3-076**

**ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА АБОРТІВ У КОБИЛ,**

**ВИКЛИКАНИХ EHV – 1**

16.00.03 *– Ветеринарна мікробіологія,
епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія*

**Дисертація на здобуття наукового ступеня**

**кандидата ветеринарних наук**

Науковий керівник:

**Синицин Віталій Анатолійович,**

доктор ветеринарних наук,

старший науковий співробітник

Київ–2014

* **ЗМІСТ**

[**ЗМІСТ** 2](#_Toc385193981)

[***ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ*** 5](#_Toc385193982)

[ВСТУП 6](#_Toc385193983)

[РОЗДІЛ 1 11](#_Toc385193984)

[ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 11](#_Toc385193985)

[1.1. Герпесвірусні інфекції та їх місце в патології тварин 11](#_Toc385193986)

[1.2. Герпесвірусна інфекція коней 1 типу 16](#_Toc385193987)

[1.2.1. Особливості будови вірусу герпесу коней 1 типу 16](#_Toc385193988)

[1.2.2. Епізоотологія герпесвірусної інфекції коней 1 типу 17](#_Toc385193989)

[1.2.3. Клінічні ознаки геперсвірусної хвороби коней 1 типу 19](#_Toc385193990)

[1.2.4. Патологоанатомічні зміни під час герпесвірусній інфекції коней 1 типу 19](#_Toc385193991)

[1.3. Діагностика абортів у кобил, викликаних збудником герпесвірусної інфекції коней 1типу 20](#_Toc385193992)

[1.3.1. Серологічні методи діагностики герпесвірусної інфекції коней 1 типу 21](#_Toc385193993)

[1.3.2. Молекулярно-біологічні методи діагностики герпесвірусної інфекції коней 1 типу 23](#_Toc385193994)

[1.3.3. Диференційна діагностика герпесвірусної інфекції коней 1 типу порівняно з іншими хворобами коней 25](#_Toc385193995)

[1.4. Вибір напрямків досліджень 27](#_Toc385193996)

[РОЗДІЛ 2 30](#_Toc385193997)

[МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ 30](#_Toc385193998)

[2.1. Культури клітин 31](#_Toc385193999)

[2.2. Культивування і зберігання культур клітин 32](#_Toc385194000)

[2.3. Референтні штами вірусів, їх пасажування та зберігання 33](#_Toc385194001)

[2.4. Патологоанатомічні дослідження абортованих плодів 34](#_Toc385194002)

[2.5. Виділення польових штамів із патологічного матеріалу на культурах клітин 35](#_Toc385194003)

[2.5.1. Матеріали та обладнання 35](#_Toc385194004)

[2.5.2. Відбір і транспортування патологічного матеріалу та зразків крові 35](#_Toc385194005)

[2.5.3. Приготування вірусувмісної суспензії 36](#_Toc385194006)

[2.5.4. Виділення і культивування вірусів (пасажування) на культурах клітин 37](#_Toc385194007)

[2.5.5. Визначення інфекційного титру вірусу 37](#_Toc385194008)

[2.5.6. Проведення тесту на чутливість вірусу до хлороформу 38](#_Toc385194009)

[2.6. Реакція нейтралізації ( мікрометод) 38](#_Toc385194010)

[2.6.1. Матеріали та обладнання 38](#_Toc385194011)

[2.6.2. Відбір, транспортування, зберігання і підготовка до дослідження зразків крові коней 39](#_Toc385194012)

[2.6.3. Виготовлення суспензії культур клітин для постановки РН 40](#_Toc385194013)

[2.6.4. Постановка реакції 41](#_Toc385194014)

[2.6.5. Облік результатів реакції нейтралізації 41](#_Toc385194015)

[2.7. Постановка напівгніздової полімеразної ланцюгової реакції 42](#_Toc385194016)

[2.7.1. Обладнання 42](#_Toc385194017)

[2.7.2. Реактиви 44](#_Toc385194018)

[2.7.2. Відбір зразків патологічного матеріалу 46](#_Toc385194019)

[2.7.3. Транспортування та зберігання відібраних зразків для досліджень 47](#_Toc385194020)

[2.7.4. Постановка реакції 48](#_Toc385194021)

[2.7.4.1. Виділення ДНК із патологічних зразків 48](#_Toc385194022)

[2.7.4.2. Підготовка реакційної суміші 49](#_Toc385194023)

[2.7.4.3. Режим ампліфікації 50](#_Toc385194024)

[2.7.4.4. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР та реєстрація результатів 51](#_Toc385194025)

[РОЗДІЛ 3 53](#_Toc385194026)

[РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ 53](#_Toc385194027)

[3.1. Проведення епізоотологічного обстеження поголів’я коней на території України ..54](#_Toc385194028)

[3.2. Результати пошуку чутливої системи для виділення польових ізолятів EHV–1 на моделі референтних штамів EHV–1 з колекції лабораторії вірусології ІВМ НААН 61](#_Toc385194029)

[3.3. Результати патологоанатомічних і гістологічних досліджень тканин та органів абортованих плодів кобил 66](#_Toc385194030)

[3.4. Виділення герпесвірусної інфекції коней 1 типу із біологічного матеріалу за культивування на чутливій культурі клітин різних видів 75](#_Toc385194031)

[3.5. Результати досліджень патологічного матеріалу за постановки реакції мікронейтралізації 82](#_Toc385194032)

[3.6. Розробка тест-системи для індикації ДНК збудника EHV–1 за допомогою напівгніздової полімеразної ланцюгової реакції 86](#_Toc385194033)

[3.6.1. Підбір праймерів для постановки напівгніздової ПЛР 86](#_Toc385194034)

[3.6.2. Результати підбору оптимальних температур для відпалу праймерів 87](#_Toc385194035)

[3.6.3. Результати підбору концентрації специфічних праймерів для постановки напівгніздової ПЛР 89](#_Toc385194036)

[3.6.4. Результати досліджень щодо підбору оптимальної концентрації іонів магнію 90](#_Toc385194037)

[3.6.5. Підбір кількості досліджуваного зразка для проведення досліджень 91](#_Toc385194038)

[3.6.6. Результати досліджень чутливості та специфічності підібраних параметрів для постановки напівгніздової ПЛР до EHV–1 92](#_Toc385194039)

[3.7. Результати досліджень патологічного матеріалу коней за постановки напівгніздової полімеразної реакції 94](#_Toc385194040)

[3.8. Інтерпретація отриманих результатів досліджень за постановки напівгніздової ПЛР 96](#_Toc385194041)

[3.9. Розробка схеми діагностики герпесвірусної інфекції коней 1 типу 97](#_Toc385194042)

[РОЗДІЛ 4 101](#_Toc385194043)

[АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ 101](#_Toc385194044)

[ВИСНОВКИ 109](#_Toc385194045)

[ПРОПОЗИЦІЇ ДЛЯ ПРАКТИКИ 112](#_Toc385194046)

[СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ 113](#_Toc385194047)

[ДОДАТКИ 137](#_Toc385194048)

* ***ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ***

EHV–герпесвірусна інфекція коней

EHV–1– збудникгерпесвірусної інфекції коней першого типу

EHV–4–збудник герпесвірусної інфекції коней четвертого типу

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ВРЗ – відкрита рамка зчитування

РІФ – реакція імунодифузії

РЗГА – реакція затримки гемаглютинації

РДП – реакція дифузної преципітації

РН – реакція нейтралізації

мРН – реакція мікронейтралізації

РЗК – реакція зв’язування комплементу

ГВК–1 – герпетична вірусна інфекція коней першого типу

ГІК–1 – герпесвірусна інфекція коней першого типу

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ВАК – вірусний артеріїт коней

ІНАН – інфекційна анемія коней

ШОЄ – швидкість осідання еритроцитів

ДМСО – диметилсульфоксид

ЦПД – цитопатична дія

КК – культура клітин

**ВСТУП**

**Актуальність теми.** На сьогодні в конярстві набувають актуальності кінні змагання, туризм, племінне розведення, іпотерапія. За даними Департаменту тваринництва Мінагрополітики та продовольства України загальна чисельність конепоголів’я характеризується динамікою зниження, так у 2004 році поголів’я зменшилось порівняно з 2011 роком із 684,3 тисячі до 443,4 тисячі голів. Кількість племінних тварин зменшилась у 2012 році у 2 рази порівняно з 2004 роком. Зниження кількості голів відбувається в результаті недоотримання лошат, переважно через аборти й смертність їх у перші дні життя, що зумовлюється герпесвірусною інфекцією коней 1 типу.

За останні роки в Україні зросла кількість випадків виявлення цієї інфекції (Галатюк О. Є., Бегас В. Л., 2010). У країнах ближнього зарубіжжя, зокрема в Росії у 2005–2007 роках, запроваджували карантинні заходи на іподромах через виявлення хворих тварин на герпесвірусну інфекцію коней 1 типу (ГІК–1). Таку ж ситуацію спостерігали в Польщі, Німеччині, Франції, США, Канаді.

***Герпесвірусна інфекція коней 1 типу*** – вірусна хвороба однокопитних, яка, виникаючи в господарстві, набуває статусу стаціонарної інфекції. Недостатнє вивчення біології EHV–1, відсутність сучасних методів діагностики, а також масові змагання та імпорт призводять до розповсюдження захворювання серед коней (Юров К. П., 2004, Галатюк О. Є., 2009, Синицин В. А., 2011, Гнап Л. К., 2012).

На сьогодні схема лабораторної діагностики герпесвірусних абортів у кобил недостатньо розроблена. Діагноз встановлюють за клінічними ознаками й виявленням титрів специфічних антитіл методами ретроспективної діагностики (Юров К. П., 1991, Старчеус А. П., 1999, Галатюк О. Є., 2008, Синицин В. А., 2011, Damiani A., 2012), тому більшість випадків абортів у кобил залишаються недіагностованими, що дає змогу поширюватися збуднику як на території господарства, так і за його межами. Ветеринарні лікарі рідко проводять лабораторну діагностику абортів, зважаючи на обмежену кількість спеціалізованих лабораторій.

Рекомендована МЕБ реакція нейтралізації для діагностики ГІК–1 має певні недоліки – тривалий термін отримання результатів реакції, а також необхідність проведення повторних досліджень через 2 тижні. Таким чином, виділення та вивчення біологічних властивостей ізолятів вірусу, розробка схеми й нових засобів діагностики абортів, викликаних вірусом герпесу коней 1 типу, є актуальним завданням ветеринарної медицини.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є складовою частиною досліджень, передбачених тематичними планами Інституту ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук, із таких завдань: 37.05-001(37-01/021) «Вивчити закономірності перебігу респіраторних хвороб коней та розробити науково-теоретичні підходи для їх діагностики на основі сучасних біологічних методів» (номер державної реєстрації 0106U000498, 2006–2010 рр.); 32.01.02.02 «Вивчити імунобіологічні властивості і екологію збудників вірусних респіраторних хвороб коней, розробити сучасні засоби їх діагностики і профілактики» (номер державної реєстрації 0111U000468, 2011–2015 рр.).

**Мета та задачі дослідження.** *Мета роботи* – розробити тест-систему для діагностики ГІК–1 за допомогою індикації генетичного матеріалу збудника, провести епізоотологічне обстеження поголів’я коней на території України щодо поширення герпесвірусної інфекції коней 1 типу.

*Для досягнення мети були поставлені такі задачі:*

* провести епізоотологічне обстеження поголів’я коней на території України щодо поширення герпесвірусної інфекції коней 1 типу;
* провести пошук чутливої системи для виділення польових ізолятів вірусу EHV–1 на моделі референтних штамів ГІК-1 з колекції лабораторії вірусології ІВМ НААН;
* вивчити культуральні властивості референтних штамів ГІК–1 з використанням різних культур клітин після зберігання за низьких температур протягом 1 року;
* дослідити патологоанатомічні зміни, спричинені вірусом герпесу коней 1 типу, в абортованих плодів кобил;
* виділити польові ізоляти вірусу герпесу коней 1 типу із біоматеріалу;
* визначити параметри ампліфікації та оптимізувати протокол напівгніздової ланцюгової реакції для індикації генетичного матеріалу вірусу герпесу коней 1 типу;
* розробити тест-систему для діагностики герпесвірусної інфекції коней 1 типу за допомогою напівгніздової полімеразної ланцюгової реакції, провести її випробування на чутливість і специфічність;
* розробити схему діагностики герпесвірусної інфекції коней 1 типу.

*Об’єкт дослідження* –герпесвірусна інфекція коней 1 типу.

*Предмет дослідження* – результати серологічного методу діагностики, патологоанатомічні зміни в абортованих плодів кобил, культивування вірусу, вивчення геному, пошук специфічних нуклеотидних послідовностей вірусу, розробка тест-системи для детекції вірусу методом напівгніздової ПЛР.

**Методи дослідження:** клінічні (збір анамнезу)**,** патологоанатомічні (розтин трупів абортованих лошат, відбір патологоанатомічного матеріалу), мікроскопічні (контроль стану культур клітин і дії на них вірусів), патоморфологічні дослідження, вірусологічні (виділення і культивування вірусів на культурах клітин, титрування вірусів), серологічні (мікро-РН із сироватками крові), молекулярно-генетичні (напівгніздова ПЛР), статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** За результатами проведених досліджень вперше виявлено, вивчено та описано характер специфічних герпетичних уражень в абортованих плодів кобил. Вивчено та описано гістологічні зміни в структурі клітин усіх шарів пупкових судин, зумовлених ГІК–1. Виділено ізоляти збудника ГІК–1.

Уперше в Україні за результатами науково-експериментальних досліджень розроблено високочутливу та специфічну тест-систему «EHV1 – ПЛР-ТЕСТ» для виявлення ДНК вірусу герпесу коней 1 типу методом напівгніздової полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Розроблено схему діагностики герпесвірусної інфекції коней 1 типу, яка включає сучасні підходи порівняно з існуючими рекомендаціями.

**Практичне значення одержаних результатів**.

Розроблено та впроваджено:

- «Спосіб виявлення ДНК вірусу ринопневмонії коней 1-го типу за допомогою ПЛР» (Патент України на корисну модель №30959. – МПК (2006) G01N 33/35 A61D 99/00 / власник ІВМ УААН. – опубліковано 25.03.2008, Бюл. № 6);

- НД на «Тест-систему «EHV1 – ПЛР-ТЕСТ» для виявлення ДНК герпесвірусу коней 1 типу методом напівгніздової полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)» (ТУ У 24.2 – 05510830 – 073:2006);

- Методичні рекомендації «Діагностика герпесвірусної інфекції коней 1 типу методом напівгніздової полімеразної ланцюгової реакції», що затверджені науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України (протокол № 1 від 23 грудня 2010 року);

- Схему діагностики герпесвірусної інфекції коней 1 типу, яка входить в «Концепцію використання методів діагностики вірусних респіраторних хвороб коней (грипп, вірусний артеріїт, ринопневмонія)», затверджену Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН (протокол № 12 від 14 грудня 2009 року). Розроблену схему рекомендовано включити до Державної «Інструкції про заходи оздоровлення та профілактики від ринопневмонії коней».

**Особистий внесок здобувача.** Здобувач проаналізувала зарубіжні й вітчизняні літературні джерела за темою дисертаційної роботи, визначила методичний підхід, розробила програму досліджень і схеми наукових експериментів, провела лабораторні досліди з виділення збудника з патологічного матеріалу в різних культурах клітин, виконала патентний пошук, адаптувала протокол напівгніздової ПЛР для діагностики ГІК–1, провела аналіз і статистичну обробку одержаних результатів, сформулювала висновки та пропозиції для практики.

**Апробація результатів досліджень**.Результати досліджень за темою дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на засіданнях Вченої ради Інституту ветеринарної медицини НAAH України (2006–2012 рр.) та на 4 наукових форумах – Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми молекулярної діагностики у ветеринарній медицині та біології» (м. Феодосія, 2007); Міжнародній науково-практичній конференції «Селекційні та еколого-економічні аспекти конярства» (м. Солочин, 2008); Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених «Діагностика, лікування та профілактика хвороб тварин: проблеми, досягнення, перспективи» (м. Харків, 2010); Міжнародній науково-практичній конференції «Конярство ХХІ сторіччя – стан, проблеми та перспективи розвитку» (м. Солочин, 2010).

**Публікації.** Основні положення дисертаційної роботи викладені в 15 наукових працях, зокрема в наукових виданнях, затверджених ДАК України – 7 робіт, із яких одна одноосібна; одному деклараційному патенті на корисну модель; методичних рекомендаціях, ДСТУ, ТУ У, монографії.

**Структура та обсяг дисертації**. Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, їх аналізу та узагальнення, висновків, пропозицій для практики, списку використаних джерел і додатків. Робота викладена на 169 сторінках комп’ютерного тексту, вміщує 13 таблиць і 28 рисунків. Список літератури включає 210 джерел, 160 із яких – латиномовні.

**ВИСНОВКИ**

У дисертації теоретично обґрунтовано та експериментально вирішено наукове завдання щодо лабораторної діагностики ГІК–1, зокрема проведені патологоанатомічні дослідження абортованих плодів кобил і вивчені патоморфологічні зміни в пупкових судинах, викликані збудником, визначені оптимальні пари праймерів і параметри протоколу постановки напівгніздової ПЛР. У результаті проведеної наукової роботи розроблено та зареєстровано тест-систему «EHV1 – ПЛР-ТЕСТ» для виявлення ДНК герпесвірусної інфекції коней 1 типу методом напівгніздової полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), а також виділено польові ізоляти вірусу герпесу коней 1 типу із 3 абортованих плодів, розроблено схему проведення діагностики захворювання.

1. Протягом 2007–2010 років було досліджено 182 сироватки крові з господарств, де реєструвались спонтанні аборти, на присутність антитіл до ГІК–1 та вірусного артеріїту коней. За результатами досліджень встановлено серонегативність у тварин щодо вірусного артеріїту коней та серопозитивність до ГІК–1 в кількості 13,7 %, що відкидає причину спонтанних абортів через вірусний артеріїт.
2. Проведено серологічне обстеження 15 областей України на присутність у сироватках крові коней антитіл до герпесвірусної інфекції 1 типу. За результатами цього дослідження в реакції мікронейтралізації 627 сироваток протягом 2011–2012 років установлено, що в популяції невакцинованих коней виявлено 31,5 % серопозитивних тварин із титрами антитіл в межах 5,0 log2 – 9,0 log2. Отримані данні свідчать про персистенцію збудника серед поголів’я коней на території України, що потребує постійного щорічного обстеження та контролю цієї хвороби.
3. За результатами пошуку чутливої системи для виділення польових ізолятів EHV–1 із патологічного матеріалу було обрано перещеплювану культуру клітин СНЕВ, яку нами використано в наступних дослідах. Референтні штами під час культивування у вище згаданій культурі клітин відновлювали на п’ятому пасажі титр інфекційної активності від 3,88±0,11 до 6,00±0,18 lg ТЦД50/см3.
4. У результаті патологоанатомічних досліджень дев’яти абортованих плодів кобил із 3 областей України у шести було виявлено та вперше описано специфічні герпетичні пухирці на навколоплідній оболонці й пуповині, розмір яких коливався від 0,3 до 1,0 мм.
5. За допомогою гістологічних досліджень виявлено запалення в усіх прошарках пупкових судин, які характерні під час розмноження в клітинах вірусу герпесу, що підтверджується також виявленими герпетичними пухирцями на їх поверхні, тому саме такий патологічний матеріал було використано для виділення польових ізолятів збудника EHV–1.
6. За результатами патологоанатомічних досліджень з ураженого матеріалу було виділено польові ізоляти герпесвірусної інфекції коней 1 типу із 3 абортованих лошат із 3 областей України, належність яких до EHV–1 була підтверджена позитивними результатами в тесті на чутливість до хлороформу та в розробленій нами напівгніздовій ПЛР.
7. За результатами біоінформатичного аналізу створені такі дві пари праймерів, специфічних до глікопротеїну Н (gH):

перша пара – Feg1 – 5’- AAGAGGAGCACGTGTTGGAT-3’,

 Req1 – 5’-TTGAAGGACGAATAGGACGC-3’,

друга пара – Feg1 – 5’-AAGAGGAGCACGTGTTGGAT-3’,

 RN1 – 5’-AGTAGGTCAGGCCGATGCTT-3’.

Вони продукують на першому етапі 636, а на другому – 287 нуклеотидних пар із отриманням яскравих смужок після 1 раунду на рівні 636 н.п., після 2 – на рівні 287 н.п.

1. Адаптовано протокол напівгніздової полімеразної ланцюгової реакції для індикації генетичного матеріалу ГІК–1 за оптимальних режимів відпалу – +60 0С, оптимальним об’ємом праймерів – 0,25 мкл на кожну пробу, оптимізованою кількістю іонів магнію – 1,5 ммоль/пробу та об’ємом досліджуваного зразка матеріалу – 3 мкл.
2. Розроблена нами тест-система на основі напівгніздової ПЛР характеризується відтворюваністю, високою чутливістю та специфічністю. Чутливість тест-системи порівняно зі стандартним методом ПЛР збільшена від 10 нг/мкл до 3 нг/мкл, що дозволяє виявляти ДНК збудника за найменшої його кількості в досліджуваному матеріалі.

10. За результатами проведеної нами роботи розроблено схему діагностики герпесвірусної інфекції коней 1 типу, яка відрізняється від існуючих тим, що враховує сучасні методи діагностики, включає перелік потрібних проб біоматеріалу, у ній вказано проміжком часу, за який можна отримати результати, виконуючи кожний метод діагностики.