Дудар Людмила Валеріївна, завідувач лабораторії молекулярної діагностики ТОВ &laquo;Центр ветеринарної діа&shy;гностики&raquo;: &laquo;Молекулярно-біологічна характеристика ізо&shy;лятів цирковірусу свиней 2 типу, ідентифікованих в Укра&shy;їні&raquo; (03.00.06 - вірусологія). Спецрада Д 26.001.14 у Київ&shy;ському національному університеті імені Тараса Шевченка

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова

праця на правах рукопису

ДУДАР ЛЮДМИЛА ВАЛЕРІЇВНА

УДК: 575.86 + 578.832.1

ДИСЕРТАЦІЯ

МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА

ІЗОЛЯТІВ ЦИРКОВІРУСУ СВИНЕЙ 2 ТИПУ,

ІДЕНТИФІКОВАНИХ В УКРАЇНІ

03.00.06 – вірусологія

біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,

результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_Дудар Л.В.

Науковий керівник: Поліщук Валерій Петрович, доктор біологічних наук,

професор

Київ 2019

ЗМІСТ

Стор.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ………………………………………... 11

ВСТУП………………………………………………………………………... 12

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ……………………………………………. 19

1.1. Загальна характеристика цирковірусу свиней 2 типу……………… 19

1.1.1. Таксономічне положення та філогенетичні зв’язки цирковірусу

свиней 2 типу………………………………………………………… 20

1.1.2. Молекулярна організація та особливості функціонування геному

ЦВС2………………………………………………………………… 23

1.1.3. Будова ЦВС2 та функції окремих компонентів вірусу……………. 24

1.2. Характеристика та особливості цирковірус-асоційованих

синдромів свиней……………………………………………………. 26

1.2.1. Розповсюдження цирковірус-асоційованих синдромів свиней …... 27

1.2.2. Джерела та шляхи передачі цирковірусу свиней 2 типу…………... 28

1.3. Патогенез цирковірус-асоційованих синдромів свиней…………… 29

1.3.1. Вірус-залежні фактори розвитку ЦАСС……………………………. 31

1.3.2. Хазяїн-залежні фактори розвитку ЦАСС…………………………... 32

1.3.3. Вплив коінфекцій на розвиток окремих ЦАСС……………………. 33

1.3.4. Вплив імуномодуляції тварин на розвиток ЦАСС………………… 35

1.4. Клінічна картина цирковірус-асоційованих синдромів свиней…… 35

1.4.1. Цирковірус-асоційована системна інфекція свиней……………….. 36

1.4.2. Цирковірус-асоційований синдром дерматито-нефропатії свиней.. 38

1.4.3. Цирковірус-асоційовані респіраторні захворювання свиней……… 40

1.4.4. Цирковірус-асоційовані репродуктивні порушення та аборти……. 41

1.5. Особливості перебігу інфікування ЦВС2 в популяціях диких

кабанів………………………………………………………………... 43

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ………………………………………... 45

2.1. Об’єкт дослідження та його характеристика……………………….. 45

8

2.1.1. Загальна характеристика об’єкту дослідження…………………….. 45

2.1.2. Аналіз морфолого-потологічного стану уражених свиней та відбір

зразків для досліджень………………………………………………. 46

2.2. Реактиви, матеріали та обладнання, що були використані в роботі. 47

2.3. Молекулярно-біологічні методи дослідження……………………... 49

2.3.1. Конструювання і підбір праймерів та зондів для проведення ПЛР

та ПЛР в реальному часі……………………………………………. 49

2.3.2. Виділення РНК та ДНК з патологічного матеріалу свиней……….. 50

2.3.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції……………………… 51

2.3.4. Проведення ПЛР в режимі реального часу………………………… 52

2.3.5. Проведення електрофоретичного аналізу продуктів реакцій в

агарозному гелі………………………………………………………. 52

2.3.6. Очищення продуктів ПЛР з агарозного гелю……………………… 53

2.3.7. Аналіз і інтерпретація результатів отриманих при проведенні

ПЛР в реальному часі……………………………………………..… 53

2.3.8. Філогенетичний аналіз та побудова філогенетичних дерев………. 54

2.4. Гістологічні методи дослідження…………………………………… 54

2.4.1. Виготовлення гістологічних зразків………………………………... 54

2.4.2. Мікроскопіювання і аналіз………………………………………….. 56

2.5. Імуногістохімічний метод дослідження зразків тканин…………… 56

2.5.1. Підготовка тканин органів………………………………………….. 56

2.5.2. Проведення імуногістохімічної реакції……………………………. 57

2.6. Статистична обробка результатів…………………………………... 58

РОЗДІЛ 3 ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЦИРКОВІРУСУ СВИНЕЙ 2 ТИПУ В

УКРАЇНІ………………………………………………………………………. 59

3.1. Характеристика патолого-анатомічного стану тварин,

відібраних для досліджень в період 2007-2012 рр. ……………… 59

3.2. Молекулярно-генетичні дослідження патологічного матеріалу….. 62

3.2.1. Характеристика праймерів, підібраних для проведення ПЛР……. 62

3.2.2. Ідентифікація ЦВС2 у зразках, відібраних від свиней різних

9

вікових груп та різних областей України………………………….. 68

3.2.3. Виявлення ДНК цирковірусу свиней 2 типу у патологічному

матеріалі окремих органів, відібраних від хворих свиней………… 72

3.2.4. Ефективність виявлення ДНК ЦВС2 методом ПЛР…..………….. 75

3.2.5. Визначення специфічності експрес-методів виявлення ЦВС2,

розроблених на основі ПЛР ………………………………………… 76

РОЗДІЛ 4 ВИВЧЕННЯ ФІЛОГЕНЕТИЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ТА

ПОШИРЕННЯ ЦИРКОВІРУСУ СВИНЕЙ 2 ТИПУ СЕРЕД

СВІЙСЬКИХ ТА ДИКИХ ТВАРИН НА ТЕРИТОРІЇ УКРАІНИ………... 78

4.1. Поширення цирковірусу свиней 2 типу в Україні в період 2007-

2012 рр.………………………………………………………………. 78

4.2. Філогенетичний аналіз ізолятів ЦВС-2, ідентифікованих в Україні 83

4.2.1. Встановлення еволюційних звязків виділенних ізолятів ЦВС2….. 84

4.2.2. Генетична характеристика цирковірусу свиней типу 2,

детектованого від диких кабанів з різних регіонів України……….. 88

РОЗДІЛ 5 РОЗРОБКА КОМПЛЕКСНОГО ПІДХОДУ ДО

ДІАГНОСТИКИ ЦВС-АСОЦІЙОВАНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ…………….. 94

5.1. Виявлення ЦВС2 в патологічному матеріалі свиней методом ПЛР

в реальному часі…………………………..……………….................. 95

5.1.1. Характеристика праймерів та зондів, що були використані для

проведення ПЛР в режимі реального часу…………………………. 95

5.1.2. Виявлення ДНК цирковірусу свиней 2 типу в ліофілізованих

сироватках крові від свиней………………………………………… 99

5.1.3. Ідентифікація ЦВС2 в зразках від свиней з респіраторною

патологією в 2014-2015 роках …………..…………..…………….. 101

5.2. Гістологічні дослідження патологічного матеріалу……………... 103

5.2.1. Гістологічний аналіз патологічних змін у тканинах уражених

тварин……………………………………………..………………… 103

5.3. Диференційне виявлення ЦВС2 в зразках абортованих плодів

від свиней методом ПЛР та імуногістохімії за одночасного

10

інфікування вірусом РРСС……………..……………………..…… 110

РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ………………... 115

ВИСНОВКИ…………………………………………………………………... 126

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ………………………………………………………. 128

ВИСНОВКИ

Вдисертаціїбулавирішенанауковопрактичнапроблема–досліджені

молекулярнобіологічнітафілогенетичніособливостітапоширенняізолятів

ЦВСвУкраїніРозробленокомплекснийпідхіддодіагностикицирковірусасоційованихсиндромівупатологічномуматеріалішляхоммолекулярнобіологічногогістологічноготаімуногістохімічногоаналізівщодозволить

швидкодіагностуватизбудникоцінюватиепізоотичнуситуаціюдля

впровадженняадекватноїсхемивакцинопрофілактикиоцінювати

ефективністьзастосованихпрофілактичнихзасобівтазаходівбіобезпекидля

попередженнярозповсюдженняЦВСтериторієюУкраїни

ВпершеідентифікованоЦВСуізобластейУкраїнитаАРКрим

Проведенаоцінкарозповсюдженнявірусудозволяєстверджуватищорівень

поширенняЦВСвУкраїнісягає

ЦВСєпоширенимвірусомвУкраїнинайбільшукількістьвипадків

захворюваннязафіксованоуДніпропетровськійДонецькійКиївській

ПолтавськійЧеркаськійтаЧернігівськійобластяхвякихчастотавиявлення

коливаласьвіддоВЖитомирськійІваноФранківській

ХмельницькійтаРівненськійобластях–ЦВСідентифікованонебуло

ФілогенетичнийаналізукраїнськихізолятівЦВСвідсвійськихтварин

засвідчивналежністьвірусівдогрупиЦВСідогрупиЦВС

Встановленіеволюційнізвязкиміжізолятамивиділенимивідсвійських

свинейтадикихкабанівзоднаковихрегіонівУкраїнивказуютьнатещо

більшістьзнихмаєрізнепоходженняіналежатьдорізнихпідгрупОднак

ізолятизХарківськоїобластієвисокогомологічнимищоможебути

спричиненобезпосередньоюпередачеюЦВСміжкабанамита

сільськогосподарськимитваринами

Розробленийнамиуніверсальниймолекулярнобіологічнийпідхідіз

використаннямпраймерівтадозволяєефективно

виявлятицирковіруссвинейтипуметодомПЛРуматеріалірізнихтканин



Вінєвисокоспецифічнимоскількизабезпечуєдиференційневиявленнясаме

цьоговірусунавітьвідтакихблизькоспорідненихвірусівякЦВСта

ДлядіагностикиЦВСнайбільшдоцільновідбиратизразки

лімфатичнихвузлівтакишковикаабожпроводитидіагностування

об’єднанихзразківвказанихорганів

ЕкспресметодвиявленнягенетичногоматеріалуЦВСнаоснові

кількісноїполімеразноїланцюговоїреакціївреальномучасізвикористанням

праймерівітаДНКзондівй

дозволяєвиявлятицирковіруссвинейтипууматеріалірізних

тканинвідтваринрізноговікубезхибнопозитивнихтахибнонегативних

результатівізабезпечуєвисокийрівеньефективності

ДлякомплексноїдіагностикивсіхЦВСасоційованихсиндромів

рекомендуємопідхідщопоєднуєрезультатиотриманінаосновіПЛРв

реальномучасізданимигістологічноготаімуногістохімічногоаналізу