ДЕРЖАВНА ВЕТЕРИНАРНА ТА ФІТОСАНІТАРНА СЛУЖБА УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-КОНТРОЛЬНИЙ ІНСТИТУТ

БІОТЕХНОЛОГІЇ І ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ

**БЕЛЕНДИК ІННА ВАЛЕНТИНІВНА**

УДК 619:616.98:578.833.3-076

**ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА АБОРТІВ У КОБИЛ,**

**ВИКЛИКАНИХ ВІРУСОМ EHV–1**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія,

епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія

**АВТОРЕФЕРАТ**   
дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата ветеринарних наук

Київ – 2014

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України

|  |  |
| --- | --- |
| **Науковий керівник** | доктор ветеринарних наук,  старший науковий співробітник  **Синицин Віталій Анатолійович,**  Державна наукова установа «Державний центр інноваційних біотехнологій»,  директор |
| **Офіційні опоненти:** | доктор ветеринарних наук, професор  **Галатюк Олександр Євстафійович,**  Національний науковий центр  «Інститут бджільництва ім. П. І. Прокоповича»,  директор |
|  | кандидат ветеринарних наук,  старший науковий співробітник  **Бабкін Михайло Валерійович,**  Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів,  завідувач відділу біотехнології і контролю якості вірусних препаратів |

Захист відбудеться «21» березня 2014 р. о 1000 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 26.890.01 в Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів за адресою: 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30, 1-й поверх, конференц-зала.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів за адресою: 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30.

Автореферат розісланий «20» лютого 2014 р.

Учений секретар

спеціалізованої вченої ради Н. Г. Пінчук

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**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. Зниження кількості голів відбувається в результаті недоотримання лошат, унаслідок абортів та смертності 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 тощо.

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 установлюють за клінічними ознаками та 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 не діагностованими, що дає змогу поширюватися збуднику як на території господарства, так і за його межами. Ветеринарні лікарі рідко проводять лабораторну діагностику абортів, через 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.

Виділення та вивчення біологічних властивостей ізолятів вірусу, розробка схеми та нових засобів діагностики абортів, викликаних герпесвірусом 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 досліджень.** *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 EHV–1 з колекції лабораторії вірусології ІВМ НААН;
* дослідити патолого-анатомічні зміни, спричинені герпесвірусом коней 1 типу, в абортованих плодів кобил;
* провести виділення польових ізолятів герпесвірусу коней 1 типу із біоматеріалу;
* визначити параметри ампліфікації та оптимізувати протокол напівгніздової ланцюгової реакції для індикації генетичного матеріалу герпесвірусу коней 1 типу;
* розробити тест-систему для діагностики герпесвірусу 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, патолого-анатомічні 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)**,** патолого-анатомічні (розтин трупів абортованих лошат, відбір патолого-анатомічного матеріалу), мікроскопічні (контроль стану культур клітин та дії на них вірусів), патоморфологічні дослідження, вірусологічні (виділення і культивування вірусів у культурах клітин, титрування вірусів), серологічні (мікро-РН з 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 всіх шарів пупкових судин, зумовлених EHV–1. Виділено ізоляти збудника EHV–1. Вперше в Україні за результатами науково-експериментальних досліджень розроблено високочутливу та специфічну тест-систему «EHV1–ПЛР–ТЕСТ» для виявлення ДНК герпесвірусу 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 у «Концепцію використання методів діагностики вірусних респіраторних хвороб коней (грип, 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 у 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 (2006–2013р.) 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 з наступних розділів: 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 та вміщує 13 таблиць і 28 рисунків. Список літератури включає 210 джерел, 160 із яких – латиномовні.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Дослідження проводились впродовж 2006 – 2014 рр. у лабораторії вірусології та лабораторії молекулярної біології Інституту ветеринарної медицини НААН України. Біологічний матеріал (сироватки крові та абортовані плоди кобил) отримано нами з державних і приватних конегосподарств України, а також від приватних тварин Вінницької, Волинської, Донецької, Дніпропетровської, Запорізської, Київської, Кіровоградської, Луганської, Миколаївської, Одеської, Полтавської, Рівненської, Сумської, Харківської, Хмельницької областей України.

Міжлабораторні комісійні та міжвідомчі випробування проводили на базі лабораторії вірусології та лабораторії молекулярної біології Інституту ветеринарної медицини НААН, а також референс-лабораторії з вивчення герпесвірусної інфекції та грипу коней Інституту вірусології (м. Берлін, Німеччина) під керівництвом доктора ветеринарних наук Армандо Даміані згідно із затвердженими методиками.

Дослідження сироваток крові в реакції нейтралізації у мікромодифікації за Грубічем П. Ю. (2009) проводили на 96-лункових планшетах для культур клітин (фірма Sarstedt, США). Використовували робоче розведення вірусу 100 ЦПД50/см3. Титри дослідних і контрольних сироваток розраховували за Рідом і Менчем, виражали в log2, діагностичний титр – 5,0 log2.

З метою пошуку чутливої системи виділення польових ізолятів EHV–1 із патологічного матеріалу використовували перещеплювану культуру клітин нирки свині (СНЕВ), перещеплювану культуру клітин тестикулів поросят (ПТП), диплоїдну культуру клітин нирки кроля (RK–13), перещеплювану культуру клітин нирки зеленої мавпи (Vero), що знаходяться в колекції культур клітин лабораторії вірусології ІВМ НААН України.

Для виконання поставлених завдань у згаданих культурах клітин культивували 4 референтні штами герпесвірусу коней 1 типу, які відносяться до родини *Herpesviridae*, підродини *Alfaherpesvirinae*, роду *Varicellovirus*, а саме: *Юл* (задепонований у ВІЕВ, м. Москва); штам *W* (задепонований в університеті штату Кентуккі, США); *EQ Herpes 040 EDW 9601* (задепонований в університеті штату Іллінойс, США), штам RacL11 (задепонований у Варшавському аграрному університеті, Польща). Титр інфекційної активності референтних штамів визначали за методом Ріда й Менча та позначали в lg ТЦД50/см3.

Відбір патологічного матеріалу проводили з місць потенційної локалізації збудника. Гістологічні дослідження патологічного матеріалу проводили на базі кафедри патологічної анатомії НУБіП (м. Київ) під керівництвом завідуючого, доктора ветеринарних наук, професора Борисевича Бориса Володимировича.

Із патологічного матеріалу з виявленими герпетичними ураженнями (проби від абортованих плодів кобил) та біологічного матеріалу тварин (кров, носові та статеві змиви) готували гомогенати, із яких у чутливих культурах клітин згідно із «Методическими рекомендациями по культивированию перевиваемых линий культур клеток СПЭВ – М, ПСП, КЩС, КТП» проводили виділення польових ізолятів вірусу. Пасажі у культурах клітин виконували з використанням підтримуючого середовища МЕМ, 10 % фетальної сироватки крові телят та суміші антибіотиків (гентаміцин, стрептоміцин – 1:1) у кількості 200 мкг/см3. Титр ізоляту за інфекційною активністю у культуру клітин розраховували за методом Ріда і Менча, виражали в lg ЦПД50/см3.

Адаптування протоколу напівгніздової полімеразної реакції проводилось на базі лабораторії молекулярної біології Інституту ветеринарної медицини НААН України під керівництвом її завідуючого Дерябіна Олега Миколайовича за допомогою комерційних наборів «АмпліСенс ДНК–сорб–В–50» виробництва «АмпліСенс» ФДУН «Центральний науково-дослідний інститут епідеміології Росспоживнагляду» (м. Москва, Росія) та з використанням розробленої нами тест-системи для виявлення ДНК збудника ГІК–1.

За допомогою програми «Vector NTI Advanced 10» (Invitrogen, США) провели конструювання олігонуклеотидних праймерів, доступних у GenBank герпесвірусу коней 1 типу, та обрали комбінації праймерів, які є специфічними до гена нуклеопротеїду (Н), що були закладені в розроблену нами діагностичну тест-систему.

ПЛР-протоколи оптимізували шляхом визначення відповідних температурних, часових параметрів ампліфікації та компонентів реакційних сумішей.

Аналіз продуктів ампліфікації проводили шляхом розділення фрагментів ДНК в 1,5 % гелі агарози в електрофорезній камері, яка підключається до постійного струму, використовували маркер «100bp Plus hadder» (виробник «Fermentas»).

Електрофорез проводили в градієнті напруги 10 В/см (30–40 хвилин), наприкінці переносили гель на скло трансілюмінатора та переглядали за ультрафіолетового освітлення із довжиною хвилі 310 нм. Фрагменти аналізованої ДНК представлені світлими жовтогарячими смугами. Електрофореграму фотографували цифровою фотокамерою на фотоплівку «Мікрат–300» за допомогою відео-системи «Біотест» з жовтогарячим світлофільтром в обминаючому ультрафіолеті.

Відтворюваність, чутливість і специфічність розробленої тест-системи проводили з позитивними (виділені ізоляти, референтні штами вірусу EHV–1) та негативними пробами (зразки референтних штамів: вірусного артеріїту коней – *Bucyrus*, ГІК–4 штам – Т252 та хвороби Марека, 3-денна культура клітин СНЕВ, дистильована вода).

Статистичну обробку даних проводили за загальноприйнятими методиками. Результати обчислювали за допомогою персонального комп’ютера методами варіаційного аналізу в програмі Microsoft Excel for Windows ХР.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ**

* 1. **Проведення епізоотологічного обстеження поголів’я коней на території України.** Нами в період 2007–2012 років було досліджено 809 сироваток крові із 15 областей України, що були відібрані від коней різної статі, вікових груп і форм господарювання, вакцинованих та не вакцинованих проти герпесвірусної інфекції коней 1 типу.

Для проведення диференційного аналізу причин спонтанних абортів, які реєструвались у господарствах, у другій половині вагітності було досліджено 182 сироватки крові. Для диференційної діагностики ГІК–1 від вірусного артеріїту коней (ВАК) нами були застосовані «Набір діагностиків ринопневмонії коней для реакції нейтралізації» та «Набір діагностиків вірусного артеріїту коней для реакції нейтралізації», що розроблені та впроваджені в лабораторії вірусології ІВМ НААН.

Аналіз результатів дослідів показав, що в досліджених сироватках крові специфічні титри антитіл до вірусного артеріїту коней не виявлено, але до ГІК–1 титри вищі за 5,0 log2  виявлено в 13,7 % від загальної кількості дослідженого матеріалу.

Отже, за аналізом отриманих результатів нами встановлено, що в досліджуваних господарствах причиною спонтанних абортів у кобил у другій половині вагітності був герпесвірус коней 1типу.

Нами було проведено епізоотологічне обстеження щодо персистенції збудника у поголів’ї коней на території України. Серед тварин, у яких було відібрано та досліджено сироватки крові у 2011 році, було не вакцинованих 67%, щеплених, але без точної дати вакцинації, – 17 %, вакцинованих – 16 %; у 2012 році було не вакцинованих – 59 %, щеплених, але без точної дати вакцинації, – 39 %, вакцинованих – 2 %.

Сироватки були дослідженні в реакції нейтралізації, яка рекомендована Міжнародним епізоотичним бюро, використовувалась культура клітин нирок кроля (RK–13) та референтний штам вірусу ГІК–1 – RacL11.

Аналіз результатів досліджень титрів специфічних антитіл серед невакцинованого поголів’я коней показав, що найбільша кількість тварин мали титри антитіл в межах від 2,0 log2 (або нижчі) до 4,0 log2 i склала 54,2 %, що засвідчує факт контакту організму тварин з вірусом, проте його кількість була замала, щоб викликати гостре захворювання, але достатньою для сероконверсії.

Кількість тварин, які мали титр специфічних антитіл в межах від 5,0 log2  до 6,0 log2 була 23,6 %. Їх значно менше, проте це засвідчує можливе вірусоносійство чи персистенцію герпесвірусу коней 1 типу в організмі й потребує додаткових досліджень через два тижні з метою виявлення зростання чи спадання величини титрів антитіл для того, щоб уточнити розвиток чи затухання герпесвірусної інфекції. Тварини, у яких виявлено титри антитіл в межах від 7,0 log2 до 8,0 log2 й вище – 8,7 %, проявляють сероконверсію, що свідчить про ослаблення організму й розвиток інфекційного процесу в нещеплених коней. За несприятливого впливу факторів зовнішнього середовища та через стресові стани в таких тварин буде ослаблений імунний захист, що сприятиме розвитку захворювання (рис. 1).

**Рис. 1. Динаміка зміни титрів специфічних антитіл до герпесвірусу коней 1 типу в невакцинованих тварин за постановки РН у 2011 та 2012 році**

За отриманими нами результатами, що відображені на рисунку 1, встановлено персистенцію збудника EHV–1 на території України. Епізоотологічним обстеженням доведено, що кількість невакцинованих тварин збільшується і такий стан підвищує ймовірність виникнення спалаху ГІК–1 та розповсюдженню збудника на території України, тому для контролю ситуації потрібно щорічно проводити серологічний моніторинг присутності специфічних антитіл до герпесвірусу коней 1 типу.

**Результати пошуку чутливої системи для виділення польових ізолятів EHV**–**1 на моделі референтних штамів EHV**–**1 з колекції лабораторії вірусології ІВМ НААН.** Нами проведено дослідження з пошуку чутливих систем для культивування збудника герпесвірусу коней 1 типу із використанням перещеплюваних культур клітин, таких як СНЕВ, ПТП, РК–13 та Vero. Для цього використовували референтні штами герпесвірусу коней 1 типу – Юл, EHV (W) та EQ Herpes 040 EDV 9601, які зберігались у замороженому стані за температури мінус 8 0С, мінус 20 0С та мінус 196 0С. Нами вивчено їх адаптивні властивості до вищезгаданих перещеплюваних культур клітин під час їх зберігання за вказаних низьких температур протягом одного ріку.

Аналіз одержаних нами результатів показав, що зміни після другого пасажу, які відбувалися у культурі клітин порівняно з контролем, були у всіх трьох групах за 48 годин, а саме були помітні початкові зміни клітин, проте моношар зберігався. На 72 годину відмічали прогресування змін у клітинах (округлення) і часткове порушення цілісності моношару клітин, на 96 годину – повне знищування та лізис культури клітин. Також відмічали округлі ділянки клітин, які залишалися на склі й мали округлу форму. Після проведення п’ятого пасажу визначали титр інфекційної активності кожного референтного штаму герпесвірусу коней 1 типу на кожній культурі клітин (табл. 1).

*Таблиця 1*

**Зміни титрів інфекційної активності референтних штамів герпесвірусу коней 1 типу, культивованих у культурах клітин за ІІ-го та V-го пасажів, (М**+**m, n=5)**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Культура  клітин | Пасаж | * + - * 1. Титр інфекційної активності у культурі клітин, lg ТЦД50\см3 | | | | | | | | |
| * + - * 1. EHV (W) | | | EQ Herpes 040 EDV | | | * + - * 1. Юл | | |
| -80С | - 200С | - 1960С | -80С | - 200С | - 1960С | -80С | - 200С | - 1960С |
| СНЕВ | 2 | 5,00±0,15 | 4,50±0,13 | 4,00±0,12 | 3,88±0,11 | 3,50±0,10 | 3,50±0,10 | 3,50±0,10 | 3,50±0,10 | 3,50±0,10 |
| 5 | 6.50±0,19 | 6,23±0,18 | 6,23±0,18 | 5,50±0,16 | 5,23±0,15 | 5,00±0,15 | 5,50±0,16 | 5,23±0,15 | 4,85±0,14 |
| ПТП | 2 | 5,00±0,15 | 4,23±0,12 | 4,23±0,12 | 3,50±0,10 | 3,00±0,09 | 3,00±0,09 | 3,50±0,10 | 3,50±0,10 | * 3,50±0,10 |
| 5 | 6,00±0,18 | 5,50±0,16 | 5,50±0,16 | 5,23±0,15 | 5,00±0,15 | 5,00±0,15 | 5,23±0,15 | 5,00±0,15 | 5,00±0,15 |
| РК-13 | 2 | 4,50±0,13 | 4,23±0,12 | 4,23±0,12 | 3,50±0,10 | 3,23±0,10 | 3,00±0,09 | 3,50±0,10 | 3,50±0,10 | 3,23±0,10 |
| 5 | 5,50±0,16 | 5,66±0,17 | 5,50±0,16 | 5,23±0,15 | 5,50±0,16 | 5,00±0,15 | 5,00±0,15 | 5,00±0,15 | 4,83±0,14 |
| Vero | 2 | 4,50±0,13 | 4,23±0,12 | 4,23±0,12 | 3,50±0,10 | 3,23±0,10 | 3,23±0,10 | 3,50±0,10 | 3,50±0,10 | 3,50±0,10 |
| 5 | 6,50±0,19 | 6,00±0,18 | 6,00±0,18 | 5,50±0,16 | 5,50±0,16 | 5,23±0,15 | 5,50±0,16 | 5,50±0,16 | 5,23±0,15 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**Примітка**: р < 0,05

Таким чином, за аналізом одержаних результатів встановлено, що титри інфекційної активності штамів вірусів після заморожування упродовж одного року за температури мінус 8 0С, мінус 20 0С і мінус 196 0С знижуються на 2–3 логарифми, проте вони не втрачають адаптивні властивості під час культивування у вищезгаданих культурах клітин і відновлюють інфекційну активність до початкової. Найбільш чутливою системою для культивування референтних штамів вірусів EHV–1 із колекції лабораторії вірусології виявилась перещеплювана культура клітин СНЕВ, яку було використано в наступних дослідах.

**Результати патолого-анатомічних та гістологічних досліджень тканин і органів від абортованих плодів кобил.** За 2007–2012 роки нами було досліджено 9 абортованих лошат на різних термінах жеребності з різних племінних господарств. Під час первинного огляду абортованого плоду на навколоплідній оболонці відмічали збільшені, гіперемовані й потовщені судини. У деяких плодів були численні крововиливи на зовнішніх покривах тіла та жовтушність рогової частини копит.

Особливу увагу приділяли огляду навколоплідної оболонки. Вона не мала ознак розкладу, була міцною, але спостерігали гіперемію та на поверхні виявляли прозорі пухирці наповнені прозорою або жовтуватого кольору рідиною, їх розмір коливався від 0,3–1,0 мм (рис. 2, 3). Саме такий матеріал використовували для виділення збудника. Під час огляду пуповини нами було відмічено потовщені й кровонаповненні судини, пухирці, як і на поверхні навколоплідної оболонки (рис. 3).

|  |  |
| --- | --- |
| **Рис. 2. Герпетичні ураження навколоплідної оболонки абортованого плоду** | **Рис. 3. Пуповина абортованого плоду на 7 місяці з герпетичними пухирцями на поверхні** |

У серозних порожнинах плоду нами було відмічено підвищену кількість рідини бурштинового кольору, загальну набряклість усіх органів та судин. На епікарді й ендокарді відмічали точкові або стрічкові крововиливи, у легенях – набряки, геморагії, на слизовій оболонці трахеї – крововиливи.

Печінка темного кольору, набрякла, із ділянками ішемії; селезінка не мала змін, але в деяких плодів була набрякла з помітними крововиливами; в інших органах (стравохід, шлунок, слизова кишечника й сечового міхура) спостерігали гіперемію і крововиливи, потовщені й кровонаповнені кровоносні судини.

Мозкові оболонки набряклі, запалені, судини потовщені. У головному мозку спостерігали артеріальну гіперемію.

Було проведено гістологічне дослідження пуповини абортованого плоду на 8 місяці вагітності з ознаками герпетичного ураження. Приготування гістологічних препаратів проводили за загальноприйнятими методиками. Під час вивчення препаратів гістологічних зрізів пупкового канатику виявили патологічні зміни в клітинах усіх шарів судини. У пупковому канатику просвіт артерії був помітно розширений. Стінка артерії мала вигини всередину просвіту судини у вигляді горбко- та платоподібних підвищень різних розмірів, унаслідок чого її просвіт мав неправильну форму.

Більшість ендотеліальних клітин перебувала в стані зернистої чи гідропічної дистрофії. У частині дистрофічно змінених ендотеліальних клітин відмічали набряк ядра з маргіналією хроматину, що є передвісником загибелі клітин.

Нами було виявлено в шарах артерії гідропічну дистрофію. Між зафарбованими еозином клітинами виявляли ядра клітин, які знаходились у стані пікнозу. Цитоплазма в таких клітинах не диференціювалась.

Адвентиція була виразно набряклою, значно потовщеною і в 2–4 рази перевищувала товщину середньої оболонки. Зміни пупкової вени були аналогічні до пупкової артерії. Виявлені в сполучнотканинній стромі пуповини зміни свідчать про частковий лізис структурних компонентів пучків колагенових волокон, що зумовлено тканинним набряком.

Таким чином, за аналізом результатів патолого-анатомічних та гістологічних досліджень абортованих плодів було з’ясовано, що виявленні макро-патологічні зміни відповідають характерним для ГІК–1. Зміни виявлені нами в клітинах пупкових судин є результатом запального процесу. Отримані дані дають нам підстави вважати, що саме вони призвели до порушення нормального функціонування пупкових судин і спричинили загибель плоду. Такі зміни в епітеліальних клітинах характерні під час розмноження в них герпесвірусу, що підтверджується виявленими герпетичними пухирцями на їх поверхні, тому такий патологічний матеріал було нами використано для виділення польових ізолятів збудника.

**Виділення польових ізолятів герпесвірусу 1 типу із біологічного матеріалу під час культивування у культурі клітин СНЕВ.** Нами проведено дослідження щодо виділення ізолятів вірусу з біологічного матеріалу, отриманого з господарств, де спостерігали спонтанні аборти. При цьому було використано 24 носові та 11 статевих змивів, шматочки органів від 9 абортованих плодів, шматочки пуповини й навколоплідної оболонки від 6 абортованих плодів, а також від двох абортованих плодів навколоплідні води.

Під час пасажування патологічного матеріалу на предмет виділення польових ізолятів вірусу спостерігали, за його наявності в матеріалі, після другого пасажу округлення клітин на 3–4-й день і порушення цілісності моношару клітин. Навколо таких місць клітини були також округлі, мали певні ознаки ЦПД. На п’ятий день такі зміни відмічали на 50 % площини культури. Пасажування повторювали до 7 разів.

Отримані нами результати досліджень щодо виявлення герпесвірусу коней 1 типу в дослідному матеріалі показали, що виділення вірусу можливе лише за гострої форми перебігу хвороби та при відбору проб від абортованих плодів з ознаками герпесвірусної інфекції коней 1 типу (табл. 2).

*Таблиця 2*

**Результати досліджень щодо виділення ізолятів герпесвірусу коней 1 типу з дослідних зразків біоматеріалу у культурі клітин СНЕВ**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Досліджуваний матеріал | Всього проб | позитивні | негативні |
| 1 | Плід (печінка, легені, трахея, головний мозок, навколоплідні оболонки, навколоплідні води, пуповина) | 55 | 43 | 12 |
| 2 | Кобили після аборту:  2.1 Носові змиви | 9 | - | 9 |
| 2.2 Піхвові змиви | 9 | 1 | 8 |
| 3 | Носові змиви від коней | 15 | 1 | 14 |
| 4 | Статеві змиви від коней | 2 | - | 2 |
|  | Усього | 90 | 45 | 45 |

У подальшому для виділення ізолятів з патологічного матеріалу відбирали навколоплідну оболонку, навколоплідну рідину та пуповину з герпетичними ураженнями, через те, що під час дослідів встановили найбільш ймовірне виділення вірусу (прояв ЦПД) з вище перерахованого патологічного матеріалу у культурі клітин. Отримані ізоляти, які проявляли стійку ЦПД після 7 пасажу, підлягали тестуванню на чутливість до хлороформу. Усі 3 отримані ізоляти проявили чутливість до його впливу, що підтвердило присутність у їх будові ліпідної оболонки, яка характерна для герпесвірусу коней 1 типу. Польові ізоляти кріоконсервували для подальшого дослідження і вивчення їх біологічних властивостей.

**Розробка тест-системи для індикації ДНК збудника EHV**–**1 за допомогою напівгніздової полімеразної ланцюгової реакції**. Для проведення молекулярної діагностики герпесвірусної інфекції коней 1 типу нами розроблена тест-система для виявлення та ідентифікації ДНК вірусу герпесу 1 типу методом напівгніздової полімеразної реакції. Для цього нами були розраховані «вироджені» специфічні олігонуклеотидні праймери, проведено адаптацію протоколу напівгніздової ПЛР та вирішені питання, які пов’язані з термодинамікою реакції, кінетикою ампліфікації.

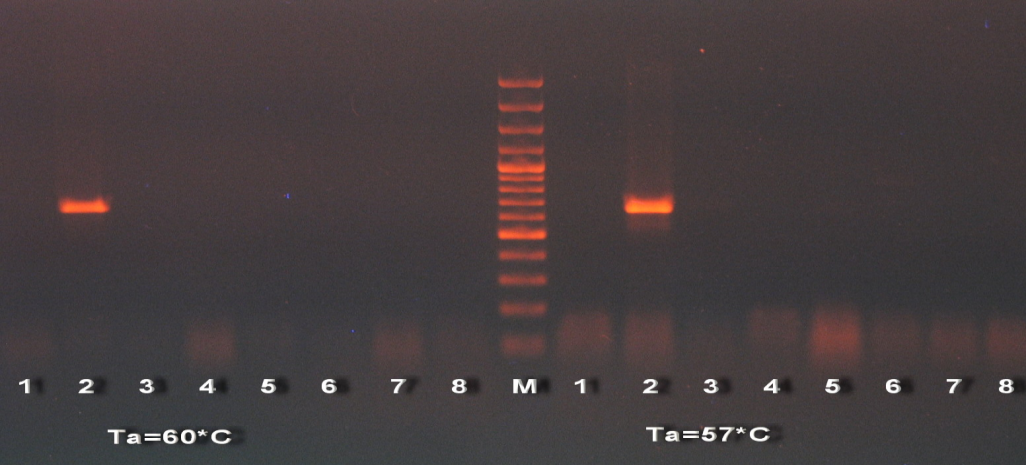
**Підбір праймерів для постановки напівгніздової ПЛР.** Використовуючи програму «Vector NTI Advanced 10» (Invitrogen, США) провели конструювання олігонуклеотидних праймерів, доступних у GenBank для герпесвірусу коней 1 типу, та обрали три комбінації, які є специфічними до гена нуклеопротеїду (Н).

Нами було підібрано найбільш оптимальні три праймери, специфічні до глікопротеїну Н (gH), із яких було складено дві пари для виконання напівгніздової ПЛР. Обрані праймери на першому етапі продукують 636, на другому – 287 нуклеотидних пар, тому під час напівгніздової ПЛР за позитивного результату ми повинні отримати після першого раунду реакції яскраві смужки на рівні 636 н.п., а після другого раунду на рівні 287.

**Результати підбору оптимальних температур для відпалу праймерів.** Полімеразну ланцюгову реакцію проводили із праймерами в базовій концентрації за умови 35–40 ампліфікаційних циклів, використовуючи базовий набір реагентів «ДНК–сорб–В–50» (Ампли-Сенс) із вмістом 2,5 ммоль/мкл іонів магнію в залишковій суміші. Оптимальну температуру для відпалу праймерів визначали за таких температурних режимів: 500, 550, 570, 600, 630 та 65 0С.

Нами проведено дослідження позитивних і негативних проб за різних температур відпалу. Позитивні проби представлені культуральними суспензіями герпесвірусу коней 1 типу трьох референтних штамів: EHV–1 штам W, EHV–1 штам EQ Herpes 040 EDV 9601, EHV–1 штам Юл; негативні проби – культуральними суспензіями неінфікованих герпесвірусом 1 типу клітин і культуральною суспензією, інфікованою збудником вірусного артеріїту коней штам Bucyrus.

За результатами досліджень нами визначено оптимальні температурні режими, за яких розроблені нами олігонуклеотидні праймери виявились комплементарними до ДНК використаних референтних штамів. Оптимальним температурним режимом виявилась температура 60 **0**С, а рекомендована температура відпалу для загальної модифікації ПЦР – 63 0С. Специфічність довжини визначали на електрофореграмі щодо смужок обраного маркера молекулярної ваги в ділянці 287 н. п. (рис. 4).



**Рис. 4. Електрофореграма результатів застосування різного температурного режиму для відпалу праймерів:** 1 – негативний контроль; 2 – референтний штам вірусу EHV–1; 3–8 – негативні проби з референтними штамами вірусів Марека, вірусного артеріїту коней, ГІК-4; М – маркер 100bp DNA Ladder (Fermentas)

**Результати підбору концентрації специфічних праймерів для постановки напівгніздової ПЛР.** Нами вивчено та оптимізовано показники концентрації праймерів в об’ємах 0,3, 0,25, 0,2, 0,1 та 0,05 мкл/пробу.

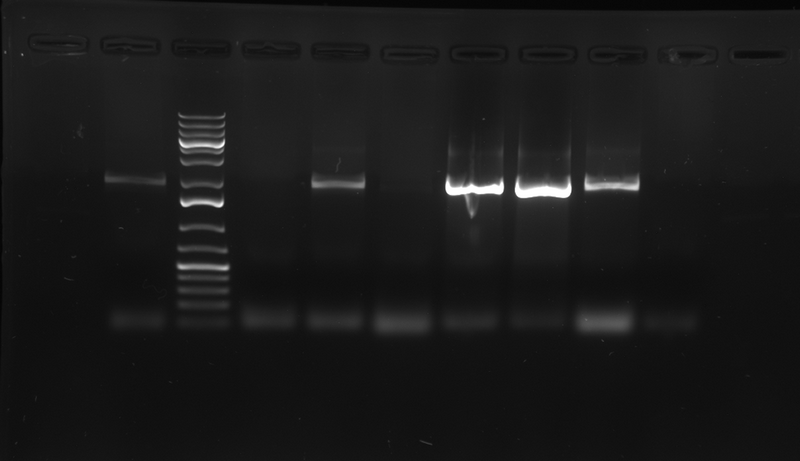
За одержаними результатами досліджень оптимальним об’ємом праймерів був той, за якого утворювалась чітка й максимально контрастна смуга амплікону, що виявилась 0,25 мкл на пробу прямого та зворотнього праймерів. Ці параметри й були обрані для напівгніздової ПЛР в подальших дослідженнях.

**Результати досліджень щодо підбору оптимальної концентрації іонів магнію.** Для визначення оптимальної кількості іонів магнію нами проведено дослідження кількісного вмісту іонів магнію від 0,5 до 4,5 мкл із кроком у 0,5 мкл на пробу й з робочою концентрацією 50 мМ. Для позитивного контролю використовували відомі позитивні проби ДНК EHV–1.

За аналізом одержаних результатів досліджень нами було встановлено, що максимально чітка контрасна смуга амплікону утворювалась під час концентрації 1,5 ммоль/пробу за потрібної довжини при відсутності неспецифічних димерів та смуг. Таким чином, оптимізованою кількістю іонів магнію для отримання задовільних результатів під час напівгніздової ПЛР була обрана 1,5 ммоль/пробу.

* + 1. **Підбір кількості досліджуваного зразка для проведення досліджень**. Результати досліджень щодо пошуку оптимальної кількості досліджуваних зразків проводили із об’ємами від 1 до 10 мкл. Під час ампліфікації зразки, які містили 1 мкл дослідного матеріалу, мали смужки не яскраві, з неспецифічними димерами. За дослідження зразків по 2 мкл дослідного матеріалу мали однакові результати із попереднім об’ємом. Коли додавали до досліджуваної проби 3 мкл зразка, утворювалась добре виражена яскрава смужка без димеру й знаходилась на потрібному рівні маркера. За використання об’ємів по 4, 5 і 10 мкл спостерігалося порушення яскравості смужки, інколи вони з’являлись на іншому рівні маркера й мали додаткові неспецифічні смужки і димери (рис. 5).

1. М 2 3 4 5 6 7 8

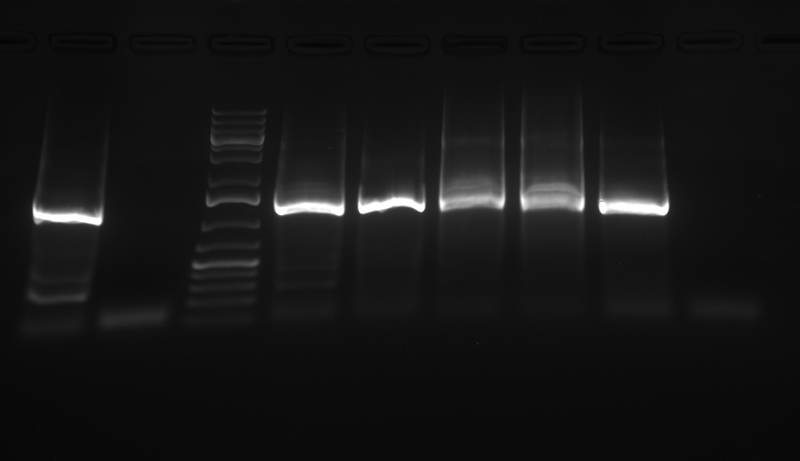


**Рис. 5. Результати досліджень оптимізації об’ємів дослідних зразків матеріалу після першого раунду напівгніздвої ПЛР:** 1 – проба 1 мкл,   
М – маркер, 2 – проба 2 мкл, 3 – проба 3 мкл, 4 – проба 4 мкл, 5 – проба 5 мкл,   
6 – проба 10 мкл, 7 – позитивний контроль, 8 – негативний контроль

Також під час повторних реакцій із 1 мкл досліджуваного матеріалу інколи в першому раунді смужок взагалі не виявляли, а в другому раунді був позитивний результат. Такі результати не задовольняли наші вимоги до проведення реакції.

Таким чином, у подальших дослідах оптимальним об’ємом дослідного зразка було обрано матеріал у кількості 3 мкл, за якого було отримано найкращу контрастну смугу порівняно з контрольним зразком специфічної довжини за відсутності димерів та неспецифічних, хибних смуг під час електрофоретичного аналізу в 1,5 % гелі агарози (рис. 6).

1 2 М 3 4 5 6 7 8



**Рис. 6. Результати досліджень оптимізації об’ємів дослідних зразків матеріалу після другого раунду напігніздової ПЛР:** 1 – проба 1 мкл,   
2 – проба 2 мкл, М – маркер, 3 – проба 3 мкл, 4 – проба 4 мкл, 5 – проба 5 мкл,   
6 – проба 10 мкл, 7 – позитивний контроль, 8 – негативний контроль

**Результати досліджень чутливості та специфічності підібраних параметрів для постановки напівгніздової ПЛР до EHV–1.** З метою перевірки чутливості та специфічності оптимізованих параметрів напівгніздової ПЛР готували 9 проб із матеріалу, зокрема культуральні суспензії з відомими титрами референтних штамів вірусів W, 040 та Юл, а також 11 негативних проб, які не містили специфічні ДНК, а саме: культуральну суспензію не заражених клітин СНЕВ, штаму вірусу Bucyrus, штаму Т252 герпесвірусу коней 4 типу, вірус хвороби Мареката дистильовану воду (табл. 3).

*Таблиця 3*

**Результати досліджень чутливості та специфічності   
системи напівгніздової ПЛР до EHV**–**1**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Досліджуванi зразки | | | * + - * 1. Контрасна смуга амплікону | | |
| Чітко виражена | Малої ваги | Зникає через 2–5 хвилин |
| EHV–1 штам Юл | 101,0 ТЦД50/см3 | | + | - | - |
| 104,0 ТЦД50/см3 | | + | - | - |
| 108,0 ТЦД50/см3 | | - | + | - |
| EHV–1 штам 040 | 101,0 ТЦД50/см3 | | + | - | - |
| 104,0 ТЦД50/см3 | | + | - | - |
| 108,0 ТЦД50/см3 | | - | + | - |
| EHV–1 штам W | 101,0 ТЦД50/см3 | | + | - | - |
| 104,0 ТЦД50/см3 | | + | - | - |
| 108,0 ТЦД50/см3 | | - | + | - |
| EHV–4  штамТ252 | 101,0 ТЦД50/см3 | | - | - | - |
| 104,0 ТЦД50/см3 | | - | - | - |
| 108,0 ТЦД50/см3 | | - | - | - |
| Вірус хвороби Марека | 101,0 ТЦД50/см3 | | - | - | - |
| 104,0 ТЦД50/см3 | | - | - | - |
| 108,0 ТЦД50/см3 | | - | - | - |
| Культура клітин СНЕВ | | | - | - | - |
| EVA  штам Bucyrus | | 101,0 ТЦД50/см3 | - | - | - |
| 104,0 ТЦД50/см3 | - | - | - |
| 108,0 ТЦД50/см3 | - | - | - |
| Дистильована вода | | | - | - | - |

Результати таблиці 3 відповідають отриманим під час детекції збудника EHV–1 у культурах клітин і вказують на оптимально правильно підібрані умови проведення напівгніздової ПЛР для найкращого виявлення ДНК герпесвірусу коней 1 типу в досліджуваних матеріалах.

**Результати досліджень патологічного матеріалу коней за постановки напівгніздової полімеразної реакції.** Для перевірки відтворюваності, чутливості та специфічності розробленої напівгніздової ПЛР нами досліджено зразки матеріалу в 52 зразках, а саме: стабілізована кров (одна проба від коня під час гострого перебігу хвороби); стабілізована кров від кобил, які абортували; сироватки крові від коней без видимих клінічних ознак і в гострий період; навколоплідні води, відібрані аспіраційно від абортованих плодів; навколоплідні оболонки від абортованих плодів; шматочки пуповин; шматочки печінки й легень від абортованих плодів; носові змиви від різних коней; 6 суспензій культур клітин СНЕВ, у яких відбулося ЦПД герпесвірусу 1 типу (три зразки з референтними штамами вірусу EHV–1 та три зразки з польовими ізолятами) (табл. 4).

*Таблиця 4*

**Результати досліджень зразків патологічного матеріалу   
в напівгніздовій ПЛР**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Досліджуваний матеріал | Кількість проб | Результат | |
| позитивний | негативний |
| Стабілізована кров коней | 5 | 1 | 4 |
| Стабілізована кров кобил, які абортували | 8 | - | 8 |
| Сироватка крові | 2 | - | 2 |
| Патологічний матеріал від абортованих лошат:  Навколоплідні води  Навколоплідна оболонка  Пуповина  Печінка  Легені | 2  2  8  2  2 | 2  2  6  -  - | -  -  2  2  2 |
| Суспензія культури клітин із ЦПД вірусу ГІК–1:  3 референтні штами  польові ізоляти | 3  3 | 3  3 | -  - |
| Носові змиви | 15 | 1 | 14 |
| Усього: | 52 | 18 | 34 |

За результатами отриманих досліджень, як видно з таблиці 4, нами підтверджено відтворюваність напівгніздової ПЛР, її чутливість та специфічність до виявлення ДНК герпесвірусу коней 1 типу, а також підтверджено належність виділених польових ізолятів із патологічного матеріалу до EHV–1.

**Розробка схеми діагностики герпесвірусної інфекції коней 1 типу.** За результатами проведених досліджень і зібраною інформацією з літературних джерел, офіційних даних ветеринарного департаменту, рекомендацій МЕБ було складено й запропоновано схему діагностики герпесвірусної інфекції коней 1 типу. Під час складання цієї схеми були враховані всі існуючі й рекомендовані вірусологічні, серологічні, розроблені сучасні молекулярно-біологічні методи діагностики. Також нами визначено перелік проб біоматеріалу, який потрібно відбирати та потім надсилати до лабораторій для проведення аналізу. В розробленій схемі нами вказано за який саме проміжок часу можна отримати результати, при виконанні кожного методу діагностики.

**ВИСНОВКИ**

У дисертації теоретично обґрунтовано та експериментально вирішено наукове завдання щодо лабораторної діагностики ГІК–1, зокрема проведені патолого-анатомічні дослідження абортованих лошат і вивчені патоморфологічні зміни в пупкових судинах, викликані збудником EHV–1, визначені оптимальні пари праймерів та параметри протоколу постановки напівгніздової ПЛР. У результаті проведеної наукової роботи розроблено та зареєстровано тест-систему «EHV1–ПЛР–ТЕСТ» для виявлення ДНК герпесвірусу коней 1 типу методом напівгніздової полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та виділено польові ізоляти герпесвірусу коней 1 типу із 3 абортованих лошат, 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 у 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 серологічного дослідження в реакції мікронейтралізації 627 сироваток протягом 2011–2012 років встановлено, 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 патолого-анатомічних досліджень дев’яти абортованих плодів кобил із 3 областей України у шести з них було виявлено та вперше описано специфічні герпетичні пухирці на навколоплідній оболонці і пуповині розмір яких коливався від 0,3 до 1,0 мм.
5. Гістологічними дослідженнями виявлено запалення в усіх прошарках пупкових судин, які характерні під час розмноження в клітинах герпесвірусу, 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 патолого-анатомічних досліджень з ураженого матеріалу було виділено польові ізоляти герпесвірусу коней 1 типу від 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):

- Feg1 – 5’- AAGAGGAGCACGTGTTGGAT-3’, Req1 – 5’-TTGAAGGACGAATAGGACGC-3’,

- 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

раунду – на рівні 287 н.п..

1. Адаптовано протокол напівгніздової полімеразної ланцюгової реакції для індикації генетичного матеріалу герпесвірусу коней 1 типу за оптимальних режимів відпалу – +600С, 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 врахуванням сучасних методів діагностики, переліком потрібних проб біоматеріалу, вказаним проміжком часу за який можна отримати результати, при виконанні кожного методу діагностики.

**ПРОПОЗИЦІЇ ДЛЯ ПРАКТИКИ**

Для практики ветеринарної медицини запропоновано:

* + - 1. «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);
      2. НД на «Тест-система «EHV1–ПЛР–ТЕСТ» для виявлення ДНК герпесвірусу коней 1 типу методом напівгніздової полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)» (ТУ У 24.2 – 05510830 – 073:2006);
      3. Методичні рекомендації «Діагностика герпесвірусної інфекції коней 1 типу методом напівгніздової полімеразної ланцюгової реакції», затверджені науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України від 23 грудня 2010 року протокол № 1.
      4. Схему діагностики герпесвірусної інфекції коней 1 типу, яка входить у «Концепцію використання методів діагностики вірусних респіраторних хвороб коней (грип, вірусний артеріїт, ринопневмонія)», затверджену Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН (протокол № 12 від 14 грудня 2009 року).

**СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

*Статті в наукових фахових виданнях:*

* + - * 1. Діагностика респіраторних вірусних хвороб коней на основі сучасних біотехнологічних методів / М. В. Пекний, В. В. Куликова, **І. В. Белендик**, П. Ю. Грубич, Р. О. Капралюк // Вет. Медицина : міжвід. темат. науковий зб. – Х., 2007. – Вип. 88. – С. 171–174. (*Здобувач проаналізувала удосконалені сучасні біотехнологічні методи діагностики ринопневмонії коней*).
        2. Виявлення герпесвірусу 1 типу за допомогою напівгніздового методу полімеразної ланцюгової реакції / **І. В. Белендик,** М. О. Бєднов, О. М. Дерябін, В. А. Синицин, П. Ю. Грубич // Вет. біотехнологія : бюл. – К., 2008. – №12. – С. 18–21. (*Здобувач описала та провела адаптацію протоколу напівгніздового методу ПЛР для виявлення збудника ГІК*–*1*).
        3. **Белендик І. В.** Випадок герпесвірусної інфекції у коней приватної конюшні та діагностика її методом полімеразної ланцюгової реакції / І. В. Белендик, В. А. Синицин, О. М. Дерябін // Наук.-техн. бюлетень – Х., 2008. – №98. – С. 125–129. (*Здобувач описала аборт у кобил через ринопневмонію, провела збір патологічного матеріалу й дослідження на присутність у ньому збудника методом ПЛР*).
        4. **Белендик І. В.** Специфічні патологоанатомічні зміни у абортованих плодів лошат позитивних на герпесвірусну інфекцію коней 1 типу у напівгніздовій ПЛР / І. В. Белендик, В. А. Синицин // Вет. Медицина : міжвід. темат. науковий зб. – Х., 2010. – Вип. 93. – С. 30–32. *(Здобувач описала виявленні герпетичні ураження в абортованих лошат, спричинені збудником ГІК*–*1 і підтверджені позитивним результатом за допомогою напівгніздового методу ПЛР*).
        5. **Белендик І. В.** Діагностика абортів у кобил, зумовлених герпесвірусною інфекцією коней 1 типу / І. В. Белендик // Вет. Біотехнологія : бюл. – К., 2010. – №16. – С. 18–21. (*Здобувач проаналізувала сучасні данні з діагностики герпесвірусних абортів у кобил за кордоном і в Україні*).
        6. Концепція використання методів діагностики вірусних респіраторних хвороб коней (грип, вірусний артеріїт, ринопневмонія) / В. А. Синицин, В. І. Полюлях, А. Ю. Синцин, Т. О. Сокирко, М. В. Пекний, В. В. Куликова, О. М. Мельниченко, В. А. Євтушенко, С. Д. Синицина, Р. О. Капралюк, О. І. Ольшанська, **І. В. Белендик** // Вет. Біотехнологія : бюл. – К., 2011. – №18. – С. 232–236. (*Здобувач обґрунтувала концепцію використання методів діагностики ГІК*–*1*).
        7. Сучасна діагностика вірусних хвороб сільськогосподарських тварин / В. А. Синицин, М. П. Ситюк, В. В. Куликова, **І. В. Белендик,** С. Д. Синицина // Вет. Біотехнологія : бюл. – К., 2011. – №19. – С. 169–173. (*Здобувач проаналізувала удосконалені сучасні лабораторні методи діагностики вірусних хвороб коней*).

*ТУ У, патент, монографія та методичні рекомендації:*

* + - * 1. «Тест-система «EHV1–ПЛР–ТЕСТ» для виявлення ДНК герпесвіруса коней 1 типу методом напівгніздової полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)» (ТУ У 24.2 – 05510830 – 073:2006).
        2. Ветеринарна медицина. Метод лабораторної діагностики ринопневмонії коней : ДСТУ №79с/18. – К. : Держспоживстандарт України, 2008. – 60 с.
        3. Деклараційний патент України на корисну модель, МПК (2006) G01N 33/35 A61D 99/00. Спосіб виявлення ДНК вірусу ринопневмонії коней 1-го типу за допомогою ПЛР / **І. В. Белендик**, В. А. Синицин, О. М. Дерябін; власник ІВМ НААНУ. – №30959; опубліковано 25.03.2008, Бюл. №6. – 5 с.
        4. **Белендик** **І. В.** Діагностика герпесвірусної інфекції коней 1-го типу методом напівгніздової полімеразної ланцюгової реакції: методичні рекомендації / І. В. Белендик, В. А. Синицин, О. М. Дерябін. – К. : Карат-Лтд, 2011. – 20 с.
        5. Хвороби коней : монографія / А. Ф. Ображей, З. С.Клестова, **І. В. Белендик,** А. П. Старчеус. – К. : Альфа-стевія, 2013. – 200 с.

*Статті в інших виданнях:*

* + - * 1. **Белендик І. В**. Герпесвірусна інфекція коней 1 типу/ І. В. Белендик // Сучасна ветеринарна медицина. – Київ, 2012. – №3.– С. 54–57.
        2. **Белендик І. В.** Герпесвірусні аборти у кобил: діагностика та профілактика / І. В. Белендик // Сучасна ветеринарна медицина. – К., 2013. – №5 – С. 64–66.

*Матеріали наукових конференцій:*

* + - * 1. **Белендик І. В.** Діагностика герпесвірусної інфекції коней 1 та IV типів / І. В. Белендик, О. М. Дерябін // Тези доповідей ХІІ з’їзду товариства мікробіологів України. – Ужгород, 2009. – С. 422.

АНОТАЦІЯ

**Белендик І. В. Лабораторна діагностика абортів у кобил, викликаних EHV**–**1. –** На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія. – Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Київ, 2014.

Дисертаційна робота присвячена вивченню епізоотичної ситуації щодо герпесвірусної інфекції коней 1 типу в конегосподарствах на території України та розробці напівгніздового методу ПЛР для виявлення ДНК збудника цього захворювання.

Було проведено серологічний моніторинг із використанням мікромодифікації РН щодо присутності антитіл до вірусу EHV–1 серед коней. За результатами досліджень встановлено персистенцію збудника ГІК–1 серед досліджених тварин, а також, що ситуація щороку змінюється і потребує постійного контролю.

Уперше в Україні за результатами проведених досліджень виявлено, вивчено та описано характер специфічних герпетичних уражень пупкових судин. За допомогою гістологічних досліджень описано патологічні зміни в клітинах усіх прошарків цих судин, які призвели до порушення нормального їх функціонування і загибелі плоду. Виділено з описаних уражених місць польові ізоляти герпесвірусу коней 1 типу.

Розроблено тест-систему на основі напівгніздової ПЛР, яка 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.

Побудовано схему діагностики герпесвірусної інфекції коней 1 типу, якавраховує сучасні методи діагностики, має перелік потрібних проб біоматеріалу для досліджень і вказаним проміжком часу за який можна отримати результати, при виконанні кожного методу діагностики.

**Ключові слова:** герпесвірусна інфекція коней 1 типу, напівгніздова полімеразна ланцюгова реакція, епізоотологічне обстеження, специфічні герпетичні патолого-анатомічні зміни, аборти у кобил.

АННОТАЦИЯ

**Белендык И. В. Лабораторная диагностика абортов у кобыл, вызванных вирусом EHV**–**1. –** На правах рукописи.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология, эпизоотология, инфекционные болезни и иммунология. – Государственный научно-контрольный институт биотехнологий и штаммов микроорганизмов, Киев, 2014.

Диссертационная работа посвящена изучению эпизоотической ситуации по распространению герпесвирусной инфекции лошадей 1 типа среди конепоголовья на территории Украины и разработке полугнездового метода ПЦР для детекции ДНК возбудителя этого заболевания.

По результатам проведенной дифференциальной диагностике причиной спонтанных абортов у кобыл во второй половине беременности был герпесвирус лошадей 1 типа, так как установлено серонегативность по отношению к вирусу артерииту лошадей и серопозитивность у 13,7 % по отношению к ГИЛ–1 в исследованных в реакции нейтрализации 182 сывороток крови. Также по результатам серологического исследования в реакции нейтрализации 627 сывороток крови установлено 31,5 % серопозитивных животных с титрами антител от 5,0 log2 до 9,0 log2, что свидетельствует о персистенции возбудителя на территории Украины.

Была выбрана по результатам культуральных исследований на модели референтных штаммов EHV–1 культура клеток СНЕВ, как наиболее чувствительная система для выделения полевых изолятов возбудителя ГИЛ–1 из патологического материала.

Впервые были обнаружены, описаны и исследованы специфические герпетические поражения на околоплодной оболочке и пуповине абортированных плодов кобыл в виде пузырьков, размер которых колебался от 0,3 до 1,0 мм. Гистологическими исследованиями также было подтверждено воспаление всех слоёв пуповинных сосудов, что вызвано размножением вируса в клетках. В дальнейшем из этих поражений было выделено от 3 плодов 3 полевые изоляты, которые были положительными в тестах с хлороформом и в полугнездовой ПЛР.

Используя программу «Vector NTI Advanced 10» (Invitrogen, США) были созданы такие 2 пары праймеров, специфичных к гликопротеину Н(gH): 1) Feg1 – 5’- AAGAGGAGCACGTGTTGGAT-3’, Req1 – 5’-TTGAAGGACGAATAGGACGC-3’, 2) Feg1 – 5’-AAGAGGAGCACGTGTTGGAT-3’, RN1 – 5’-AGTAGGTCAGGCCGATGCTT-3’, – которые на первом этапе производят 636, а на втором – 287 нуклеотидных пар с получением ярких полосок после 1 раунда на уровне 636 н.п., после 2 раунда на уровне 287 н.п..

Оптимизировано параметры протокола для постановки полугнездовой ПЦР при оптимальных режимах отпала – +600С, оптимальном объёме праймеров – 0,25 мкл на каждую пробу, оптимизированным количеством ионов магния – 1,5 ммоль/пробу и объёмом исследуемого образца материала – 3 мкл.

Разработана тест-система на основе полугнездовой ПЛР, которая характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью. Чувствительность разработанной тест-системы, по сравнению с стандартным методом ПЦР, увеличена с 10 нг/мкл до 3 нг/мкл, что позволяет обнаруживать ДНК возбудителя при наименьшем его количестве в исследуемом материале.

По результатам проведённой работы и обзором существующих рекомендаций была разработана схема диагностики герпесвирусной инфекции лошадей 1 типа. Данная схема отличается от существующих тем, что включает современные методы диагностики, описание нужного для каждого типа исследований материала и указанием сроков получения результатов при проведении каждого метода.

**Ключевые слова:** герпесвирусная инфекция лошадей 1 типа, полугнездовая полимеразная цепная реакция, эпизоотологическое обследование, специфические герпетические патолого-анатомические изменения, аборты у кобыл.

**ABSTRACT**

**Belendyk I.V. Laboratory diagnostics of abortions in mares caused by EHV-1. –** Manuscript.

The dissertation thesis for the scientific degree of the candidate of veterinary sciences specialty 16.00.03 - Veterinary Microbiology, Epizootology, Infectious Diseases and Immunology. – The State Scientific Control Institute of Biotechnology and strains, Kiev, 2014.

The thesis is devoted to the study of the epizootic situation with herpes virus type 1 infection in horses from Ukrainian horse’s farms and the development nested PCR to detect DNA of the pathogen of the disease.

Was conducted serological monitoring using of SNT on the presence of antibodies to the virus among horses EHV–1. The research found persistence of the pathogen EHV–1 among the studied animals, so situation is changing and requiring constant monitoring every year.

By the results of researches, the best sensitive system for the selection of field strains EHV–1 from pathological material was elected cell culture CHEB.

The first time in Ukraine by the results of the studies was founded, studied and described the specific character of herpetic lesions of the umbilical vessels. Using histological studies described pathological changes in the cells of all layers of the blood vessels, which led to the disruption of normal of their functioning and the death of the fetus. Wild strains Equine Herpesvirus type 1 was isolated from described amazed places. The test system based on nested PCR was developed and characterized reproducibility, high sensitivity and specificity. The sensitivity of the test system, in comparison with standard PCR, increased from 10 ng / ml to 3 ng / ml, which allows the detection of pathogen DNA at least its amount in the material.

Constructed scheme of diagnose herpesvirus type 1 infection of horses that includes epizootic data, clinical signs of disease manifestation, pathology and histological changes, laboratory studies for detected viruses by retrospective detection, culture methods for the isolation and identification of the causative agent of herpes virus type 1 horses using nested PCR option.

**Key words:** equine herpes virus type 1, nested polymerase chain reaction, epizootological survey, herpetic specific patho-anatomical changes, abortion in mares.