

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ
УКРАЇНИ**

РАДЗИХОВСЬКИЙ МИКОЛА ЛЕОНІДОВИЧ

УДК:619:616.98:636.1

**ГЕРПЕСВІРУСНІ ІНФЕКЦІЇ КОНЕЙ ПЕРШОГО ТА ДРУГОГО ТИПІВ
(УДОСКОНАЛЕННЯ ДІАГНОСТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ)**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія,
інфекційні хвороби та імунологія

АВТОРЕФЕРАТ

на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук

Київ 2009

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Житомирському національному агроекологічному університеті Міністерства аграрної політики України

Науковий керівник - доктор ветеринарних наук, професор

Галатюк Олександр Євстафійович,

Житомирський національний агроекологічний університет, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та епізоотології

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, професор

Скибіцький Володимир Гурійович,

Національний університет біоресурсів і природокористування України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології

доктор ветеринарних наук, професор

Ткаченко Олексій Андрійович,

Дніпропетровський державний аграрний університет, завідувач кафедри епізоотології та інфекційних хвороб

Захист дисертації відбудеться “21” жовтня 2009 р. о “12” годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: м. Київ – 41, вул. Героїв Оборони 15, навчальний корпус 3, кім. 65

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ – 41, вул. Героїв Оборони 13, навчальний корпус 4, кім. 28

Автореферат розісланий “16 вересня” 2009 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради _____ С.В. Міськевич

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Герпесвірусні інфекції коней – це інфекційні хвороби, які клінічно характеризуються різнотипним проявом від локального везикулярного висипу на епітеліальних покриттях до системного ураження тканин і органів, від легкого перебігу до гострого спалаху із масовими абортами (Юров К.П., 2000, Потоцький М.К., 2003).

Герпесвірусна інфекція поширена серед людей та тварин. До родини герпесвірусів належать віруси, які вражають центральну нервову систему (енцефаліт, мієліт, енцефаломієліт), органи зору (кератит, кератокон'юнктивіт), слизові оболонки ротової порожнини (стоматит) і шкіряний покрив (екзема, везикулярний дерматит). За сучасною класифікацією родина *Herpesviridae* поділяється на підродини β , γ та δ *herpesvirinae*. Підродина *Alphaherpesvirinae*, зокрема, герпесвіруси 1, 4 типу викликають ринопневмонію коней, а підродина *Gammaherpesvirinae* зумовлює герпесвірусні інфекції коней 2,5 та 7 типів (Сергеев В.А., 1983).

Герпесвіруси коней (ГВК) 2-го та 3-го типів в антигенному відношенні виявились між собою більш спорідненими, ніж ринопневмонія коней, яка викликається 1-м типом (Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьєв Б.В., 1998). ГВК-2 – слабопатогенний збудник, розмножується повільно. Цей вірус виділяється і від здорових коней (Robinson E., 2007).

ГВК-1 та ГВК-2 можуть викликати приховані інфекції при мінімальних клінічних симптомах, які характеризуються тимчасовим підвищенням температури, лейкопенією або сероконверсією. Частіше за все інфекція спостерігається у лошат, віком до 1 року, особливо, коли їх транспортують або змішують з іншими групами тварин. У цих лошат спостерігається респіраторне захворювання у формі нежиті (Старчеус А.П., 1999, Юров К.П., 2000).

На сьогоднішній день для діагностики герпесвірусної інфекції коней використовуються такі реакції – реакція нейтралізації (РН), реакція імунофлуоресценції (РІФ), реакція затримки гемаглютинації (РЗГА), полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), реакція зв'язування комплексу (РЗК), реакція дифузної преципітації (РДП), імуноферментний аналіз (ELISA-метод) (Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В., 1991). Для діагностики герпесвірусу другого типу (ГВК-2) в Європі використовується ПЛР (A. Nordengrahn, 2002).

В Україні лабораторна діагностика ГВК-2 не розроблена і не проводиться. Не вивчено епізоотологічні особливості герпесвірусної інфекції першого та другого типів, відсутні лікувально-профілактичні заходи. У зв'язку із викладеним, розробка лабораторних методів діагностики герпесвірусної інфекції у коней, зокрема обумовленої ГВК-1 чи ГВК-2 (або одночасно ураженням обома типами), а також розробка лікувально-профілактичних заходів є надзвичайно актуальним питанням ветеринарної науки і практики.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт кафедри мікробіології, вірусології та епізоотології Житомирського національного агроекологічного університету “Розповсюдження, діагностика і профілактика інфекційних хвороб коней”, номер державної реєстрації 0106U002998. Робота є фрагментом досліджень галузевої науково-технічної програми на 2006–2010 роки “Здоров’я тварин, якість та безпека тваринницької продукції в Україні” – “Удосконалити існуючі та розробити нові способи та засоби діагностики, профілактики, лікування хвороб коней”.

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи було проведення епізоотологічного моніторингу сумісного перебігу герпесвірусної інфекції 1-го та 2-го типів для удосконалення існуючих методів діагностики та профілактики. Для досягнення цієї мети необхідно було вирішити такі завдання:

- розробити лабораторні методи діагностики герпесвірусної інфекції коней, зумовленої герпесвірусом 1-го та 2-го типів;
- вивчити епізоотичну ситуацію в кінних господарствах різних регіонів України щодо герпесвірусної інфекції, обумовленої герпесвірусом 1-го та 2-го типів;
- охарактеризувати імунобіологічну реактивність організму при моноінфекції та сумісному інфікуванні герпесвірусами 1 та 2 типів;
- удосконалити існуючі методи профілактики герпесвірусної інфекції коней 1-го та 2-го типів.

Об’єкт дослідження: удосконалення способів діагностики та лікування герпесвірусних інфекцій першого та другого типів у коней.

Предмет дослідження: коні з неблагополучних і благополучних господарств щодо герпесвірусної інфекції першого та другого типів.

Методи дослідження: епізоотологічні (вивчення епізоотичної ситуації, епізоотологічний аналіз), гематологічні (визначення кількості еритроцитів, лейкоцитів, вмісту гематокриту, гемоглобіну та наявності фібрину), вірусологічні (ізоляція, ідентифікація та вивчення культуральних властивостей збудника, РГА), молекулярно-біологічні (ідентифікація та молекулярно-генетична оцінка вірусу в ПЛР), серологічні (РДП та РЗГА), біохімічні (визначення вмісту білка та імуноглобулінів), статистичні (визначення $M \pm m$, p).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше встановлена можливість використання культури клітин трахеї теляти для культивування ГВК-2. Розроблено реакцію дифузної преципітації для прижиттєвої діагностики ГВК-2 та ПЛР – для діагностики ГВК-1.

Вперше в Україні встановлено масове розповсюдження ГВК-2 типу серед племінних коней, охарактеризовано ураженість різновікових і статевих груп, встановлено одночасне ураження

тварин двома типами герпесвірусу. Ураженість ГВК-1 в окремих племінних господарствах сягла 55 %, а ураженість ГВК-2 – 37,5 %. Виявлено, що інтенсивність ураження тварин герпесвірусною інфекцією першого типу пропорційно зростає залежно від віку, і у коней старше 10 років становить 83 %. Герпесвірусна інфекція другого типу значно поширена у коней вікових груп від 4 до 6 та від 10 до 19 років – інтенсивність ураження становила 76 %. Порівняльна оцінка діагностичної ефективності РЗГА, РДП та ПЛР показала доцільність використання даних реакцій для діагностики герпесвірусної інфекції першого типу. Проведена практична апробація та встановлена доцільність використання з лікувальною метою ізамбену при ураженості тварин герпесвірусними інфекціями 1-го та 2-го типів. Вивчено вплив ізамбену на біохімічні та серологічні показники хворих тварин.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблена РДП, як простий, доступний метод лабораторної діагностики герпесвірусної інфекції другого типу. Вперше розроблена методика визначення інтерферону в сироватці крові коней та встановлено його вміст у здорових тварин та інфікованих герпесвірусами першого та другого типів. Встановлена дія ізамбену на коней, уражених ГВК-1 та ГВК-2, рекомендовано його застосування в комплексі лікувально-профілактичних заходів. Розроблена методика постановки ПЛР для діагностики ГВК-1. Розроблені методичні рекомендації "Діагностика герпесвірусної інфекції першого та другого типу у коней".

Результати досліджень використовуються під час проведення занять із студентами та на курсах підвищення кваліфікації при вивченні герпесвірусної інфекції коней на кафедрі мікробіології, вірусології та епізоотології Житомирського НАЕУ, кафедрі епізоотології та інфекційних хвороб тварин Білоцерівського НАУ, кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології НУБіП України. Препарат ізамбен впроваджений в комплекс лікувально-профілактичних заходів на кінній частині ЗАТ НВП "Райз-Агро" – Ягільницький кінний завод.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто здійснені інформаційний пошук та оцінка літературних даних, експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та їх узагальнення, оформлення роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації доповідались і обговорювались на:

1. Щорічних засіданнях вченої ради факультету ветеринарної медицини Житомирського національного агроекологічного університету зі звітами аспірантів (2004–2007 рр.).
2. Щорічних конференціях науково - педагогічного складу факультету ветеринарної медицини Житомирського національного агроекологічного університету (2007–2009 рр.).

3. Міжнародній науково-виробничій конференції “Проблеми екології ветеринарної медицини Житомирщини”, м. Житомир, 2005.
4. Міжнародній науково-практичній конференції “Наукові та практичні аспекти ветеринарної медицини в Україні”, присвяченій 75-річчю заснування ветеринарного факультету, м. Біла Церква, 2006.
5. II Міжнародній науковій конференції “Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування”, м. Львів, 2007.
6. Сьомій науково - практичній конференції морфологів України “Актуальні проблеми сучасної морфології”, м. Житомир, 2008.
7. Міжнародній науково-практичній конференції “Конярство України: стан, проблеми і перспективи”, м. Харків, 2008.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 9 друкованих праць, з них 6 статей опубліковані у фахових виданнях, згідно з переліком ВАК України.

Структура та обсяг дисертації Дисертаційна робота викладена на 162 сторінках комп'ютерного друку й складається з таких розділів: вступ, огляд літератури, вибір напрямків досліджень, матеріали та методи досліджень, результати власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки, пропозиції виробництву, додатки, список використаної літератури. Робота ілюстрована 24 таблицями, 28 рисунками. Список використаної літератури включає 158 найменувань, у тому числі 89 іноземних.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Вибір напрямків досліджень, матеріали та методи виконання роботи

Робота виконана в лабораторії кафедри мікробіології, вірусології та епізоотології факультету ветеринарної медицини Житомирського національного агроекологічного університету та на базі Нагірянської філії ЗАТ НВП “Райз-Агро” (Ягільницький кінний завод), Чортківського району Тернопільської області. Розробку полімеразної ланцюгової реакції щодо діагностики ГВК-1 проводили сумісно з Д.Л. Мартиненком, В.Г. Спиридоновим та С.Д. Мельничуком в Українській лабораторії якості і безпеки продукції АПК, НУБіП України, м. Київ. Поширення герпесвірусної інфекції першого і другого типів у світі вивчали за даними Міжнародного Епізоотичного Бюро (МЕБ) і на інтернет-сайті ІОЕ.

Нами було досліджено 622 проби стабілізованої крові та сироваток крові коней з різних господарств. При цьому проведені гематологічні та біохімічні дослідження у 500 коней. Серологічні ж дослідження проведені у 622 коней.

У дослідах були використані такі штами вірусів: герпесвіруси коней другого типу – підтипи LR-10 та LR-43, яких культивували на перещеплювальній культурі фібробластів шкіри коня. В результаті їх культивування отримали клон, який був адаптований до перещеплювальної культури клітин трахеї теляти (ТТ). Культура фібробластів шкіри коня та підтипи LR-10 та LR-43 були надані професором Марчиним Бамбурою, завідувачем відділом вірусології та імунології Варшавського аграрного університету. Використовували також герпесвірус коней першого типу (штами “СВ-69” та “Буковина”), який був адаптований до перещеплювальної культури трахеї теляти к.вет.н. В.Л. Бегасом Штам “СВ-69” отриманий з культуральної аутенуйованої вакцини, а штам “Буковина” виділив професор О.Є. Галатюк в лабораторії Інституту епізоотології Української академії аграрних наук. Ентеровірус свиней та культура епітелію тестікулів поросяти були надані завідуючим лабораторією вірусології Інституту ветеринарної медицини УААН, д. вет. н. В.А. Сініциним. Віруси зберігали у замороженому стані при температурі -70°C .

Для проведення експериментів нами були використані такі перещеплювальні культури клітин: культура фібробластів шкіри коня, культура епітелію трахеї теляти та культура епітелію тестікулів поросяти.

Гематологічні та біохімічні дослідження проводили згідно з методичними рекомендаціями І.П. Кондрахіна (1985) та В.І. Левченко (2002).

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою редактора електронних таблиць Excel 2003, за загально прийнятими методиками.

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Адаптація підтипів LR-10 та LR-43 герпесвірусу другого типу до перещеплювальної культури епітелію трахеї теляти

Для культивування підтипів LR-10 та LR-43 герпесвірусу другого типу спочатку використовували культуру фібробластів шкіри коня. На культурі фібробластів шкіри коня під дією LR-10 та LR-43 ЦПД проявлялась на 6-7 добу. Після внесення даних підтипів на перещеплювальну культуру епітелію трахеї теляти ознаки ЦПД з'являлись на 10 – 12 добу. Наявність вірусних антигенів контролювали в реакції гемаглютинації (РГА) після концентрації культуральної рідини в 10 разів. Після проведення 10-ти пасажів нами було встановлено підвищення концентрації гемаглютининів підтипів (LR-10 та LR-43) герпесвірусу другого типу у культуральній рідині, отриманій при зараженні моношару епітелію трахеї теляти. Герпесвіруси двох підтипів другого типу після проведення шістнадцяти пасажів почали проявляти цитопатогенну дію на 7 – 9 добу, а аглютинацію клітин на 2 – 3 добу. Дані досліджень наведені в таблиці 1, з якої видно, що підтипи

другого типу герпесвірусу коней можна культивувати на перещеплювальній культурі епітелію трахеї теляти.

Таблиця 1

Наявність гемаглютининів та прояв ЦПД в перещеплювальній культурі епітелію трахеї теляти під дією герпесвірусів LR-10 та LR-43

№ пасажів	Штам вірусу	Початок прояву ЦПД /доба/ після зараження	Титр вірусу в РГА
1-3	LR-10	12	-*
	LR-43	13	
4-7	LR-10	10	-
	LR-43	12	
8-12	LR-10	9	1:2
	LR-43	11	нативн.
13-16	LR-10	8	1:4
	LR-43	10	1:2

Примітка: * - титр вірусу відсутній

Отримання клону герпесвірусу другого типу коней на перещеплювальній культурі епітелію трахеї теляти

Для отримання клону герпесвірусу другого типу коней використовували підтип LR-10, який тривалий час культивували на перещеплювальній культурі епітелію трахеї теляти. Для індикації клону вірусу в культурі клітин застосовували метод бляшок. У результаті проведеної роботи вдалось отримати клон герпесвірусу коней другого типу на культурі трахеї теляти (ГВК-2 ТТ), який зумовлював цитопатогенну дію перещеплювальної культури клітин епітелію трахеї теляти на 5 – 7 добу.

Отримання гіперімунної сироватки до ГВК-2

Специфічну гіперімунну сироватку для постановки РДП отримували на кролях, яким проводили імунізацію шляхом внутрішньовенного введення вірусу "ГВК-2 ТТ".

Імунізацію кролів проводили 5 разів, з інтервалом 4 доби, вводячи внутрішньовенно по 1,5 см³ вірусного матеріалу. Концентрація вірусу становила $1 \cdot 10^5$ ТЦД₅₀. Через 7 діб після останнього введення здійснювали забір крові для отримання сироватки. До отриманих сироваток

додавали мертиолят 1:10000, визначали титр у РДП і зберігали до використання в замороженому стані.

Динаміку вмісту антитіл у гіперімунній сироватці наведено на рис. 1, з якого видно, що на 24-ту та 30-ту добу після проведення гіперімунізації титр антитіл, специфічних до ГВК-2, становив 1:8 або $3\log_2$. Такий титр достатній для постановки РДП.

Рис. 1. Динаміка вмісту антитіл у сироватці крові кролів (РДП).

Отримання антигену з клону ГВК-2 ТТ та можливість його використання в реакції дифузної преципітації

У зв'язку з низькою концентрацією гемаглютининів вірусу у вірусомісному матеріалі використовували методики концентрування. Активність антигену у вірусомісному матеріалі оцінювали в реакції гемаглютинації (РГА). Антиген отримували за допомогою зворотного діалізу. При цьому вірусомісну культуральну рідину заливали в діалізний мішок, засипали ПЕГ-6000 і витримували 12 годин. На наступному етапі визначали робочу концентрацію антигену як компонента РДП. Результати наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Результати визначення робочої дози (концентрації) антигену для постановки РДП

Концентрування ГВК-2	Результат обліку реакції, год.			
	24	48	72	96
1:100	±	±	±	-
1:80	±	±	±	-
1:60	+	+	+	±
1:30	+	+	+	+
1:20	±	+	+	±
1:10	-	-	±	-

З даних табл. 2 видно, що придатним до постановки РДП є антиген, концентрований від 1:20 до 1:60.

Розробка та використання реакції дифузної преципітації для діагностики герпесвірусної інфекції другого типу у коней

У процесі розробки РДП при герпесвірусних інфекціях використовували загальноприйняті методики. Як антиген використали сконцентровану у 20 та 30 разів вірусну суспензію, як контрольну позитивну сироватку – гіперімунну сироватку кролів. Облік реакції проводили за допомогою лупи (x9) та направленою проміння світла. Наявність чітких ліній преципітації відмічали через 48 годин. Облік реакції проводили через 24, 48 годин після постановки. Розроблена реакція дозволила нам виявити коней, інфікованих ГВК-2, відібрати сироватку реконвалесцентів і також використовувати її для постановки РДП. Наявність антигену та сироваток дозволила провести моніторинг герпесвірусної інфекції другого типу в кінних господарствах.

Моніторингові дослідження щодо поширення герпесвірусної інфекції коней другого типу в деяких регіонах України

За період виконання роботи було досліджено в РДП до ГВК-2 проби сироваток крові коней з різних регіонів України. Результати наведено в табл. 3. З даних табл. 3 видно, що поширення герпесвірусної інфекції другого типу відмічається в кінних господарствах Тернопільської та Київської областей.

Таблиця 3

Моніторингове дослідження коней в деяких регіонах України на наявність антитіл до ГВК-2

Регіон	Кількість досліджених тварин	Позитивно реагуючих
Донецька обл.	9	0
Житомирська обл.	113	0
Тернопільська обл.	171	93
Київська обл.	77	13

У Тернопільській та Київській областях позитивно реагуючих у РДП до ГВК-2 виявлено 93 та 13 голів, відповідно. Такий результат, на нашу думку, полягає в тому, що у коней в кінних

заводах поширення хвороби відбувається під час парувальної кампанії та постійному контакті інфікованих тварин із здоровими при проведенні змагань та виставок. На ізольованих конфермах та в індивідуальних господарствах подібних результатів не виявляли.

Ураження коней різновікових та породних груп герпесвірусною інфекцією першого та другого типів

Для дослідження були використані сироватки крові коней різновікових і породних груп як кобил, так і жеребців. Сироватки досліджували в РДП. При проведенні серологічної діагностики було встановлено, що жеребці до року серонегативні до ГВК-1 та ГВК-2, у групі тварин від 1 до 4 років до ГВК-1 серопозитивні в РДП лише 5 %, а до ГВК-2 – 50 % жеребців. У групі від 4 до 10 років – відповідно, 54 % та 69 % серопозитивних тварин, а в групі старше 10 років до ГВК-1 позитивних виявили 36 %, а до ГВК – 2 – 82 % жеребців. До року кобили були серонегативними в РДП з антигенами ГВК-1 та ГВК-2. У 16 кобил віком від 1 до 4 років інфікованість ГВК-2 була вищою більш ніж у 3 рази порівняно з ураженням їх ГВК-1. У кобил віком від 4 до 10 років інфікованість ГВК-1 та ГВК-2 була приблизно однаковою. У кобил віком старше 10 років рівень ураження ГВК-1 був на 16 % нижчим, ніж ГВК-2. В цілому інфікованість ГВК-1 відмічали у 47 %, а ГВК-2 – у 58 % дослідних кобил.

Нами була проаналізована ураженість різних порід коней герпесвірусними інфекціями першого та другого типів. Результати цих досліджень наведено у табл. 4.

Таблиця 4

Інфікованість коней різних порід герпесвірусною інфекцією першого та другого типів

№	Порода	Кількість досліджених тварин	Позитивні до ГВК-1		Позитивні до ГВК-2		У тому числі інфіковані ГВК-1 та ГВК-2	
			голів	%	голів	%	голів	%
1.	Арабська	16	3	19	6	38	3	19
2.	Ваговози	33	11	33	20	60	10	30
3.	Українська верхова	127	53	42	71	56	58	46

З даних табл. 4 видно, що найвищий відсоток тварин, уражених ГВК-2, відмічається серед коней новоолександрівської ваговозної породи – 60 %, тоді як ГВК-1 вони були уражені на 33 %. Серед коней української верхової породи (УВП) ГВК-2 уражено 56 %, а серед арабської породи – 38 % тварин. Найвищий відсоток сумісного ураження ГВК-1 та ГВК-2 відмічаємо серед тварин УВП – 46 %, а найнижчий – серед арабської породи – 19 %.

Гематологічні та біохімічні показники крові у коней, уражених герпесвірусною інфекцією першого та другого типів

У коней, уражених ГВК-1, відмічається вірогідне ($p < 0,05$) зниження кількості лейкоцитів, еритроцитів, гематокриту та рівня гемоглобіну. У коней, уражених ГВК-2, встановлене вірогідне ($p < 0,05$) зниження кількості лейкоцитів, тоді як інші гематологічні та біохімічні показники практично не відрізняються від здорових тварин. У коней при сумісному перебігу ГВК-1 та ГВК-2 відмічається вірогідне ($p < 0,01$) зниження рівнів гематокриту, кількості еритроцитів, гемоглобіну, загального білка та достовірне зростання кількості лейкоцитів і рівня імуноглобулінів. Тобто при сумісному перебігу герпесвірусних інфекцій першого та другого типів відмічаються вірогідні зміни гематологічних та біохімічних показників. При цьому клінічні ознаки хвороби в більшості таких коней не реєструються, що свідчить про прихований (латентний) перебіг хвороби.

Сумісний перебіг ГВК-1 та ГВК-2 серед поголів'я кінного заводу

Дослідження сироватки крові тварин проводили на поголів'ї кінного заводу. Результати досліджень щодо інфікованості тварин ГВК-1 та ГВК-2 за останні три роки в РДП наведено в табл. 5.

Таблиця 5

Дослідження сироватки крові коней в РДП

Роки	Голів	Позитивні до ГВК-1 в РДП		Позитивні до ГВК-2 в РДП		У тому числі позитивні до ГВК-1 та ГВК-2	
		голів	%	голів	%	голів	%
2006	171	65	38	94	55	62	36
2007	164	75	46	70	43	66	40
2008	165	58	35	77	47	51	31

З даних табл. 5 видно, що від 35 % до 46 % коней щорічно є серопозитивними щодо ГВК-1 та від 43 % до 55 % мають антитіла до ГВК-2. Разом з тим, від 31 % до 40 % коней інфіковані одночасно двома вірусами. Тобто інфікованість поголів'я герпесвірусами першого та другого типів у даному господарстві підтримується приблизно на одному рівні. Це свідчить, що герпесвірусні інфекції перебігають у формі епізоотії і характеризуються стаціонарністю в даному господарстві.

Розробка полімеразно-ланцюгової реакції для діагностики герпесвірусу коней першого типу

Нуклеотидну послідовність праймерів та флуоресцентних зондів для виявлення вірусів герпесу коней 1-го та 2-го типів (ГВК-1, 2) підбрано із використанням програми Primer Express (Applied Biosystems). Нуклеотидні послідовності праймерів та мічених флуоресцентними барвниками зондів, ампліфікацію ДНК-мішені здійснювали на приладі ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems).

Ми підібрали оптимальні параметри проведення ПЛР-РЧ для визначення ВГК-1-го типу та провели ПЛР аналіз 10 зразків відмитих лімфоцитів. Результати аналізу наведено на рис. 2.

Рис. 2. Результати аналізу проб культуральної рідини на присутність ГВК-1-го та ГВК-2-го типів.

Як видно з рис. 2, в деяких досліджувальних пробах дуже високі значення граничного циклу для цих проб C_t 35,5–37,5, що вказує на позитивний результат у даному випадку до ГВК-1. У результаті проведених досліджень встановлено, що зразки ДНК вважаються позитивними при отриманні експоненціальних кривих ампліфікації ДНК-мішені (гену *gB*) та внутрішнього контролю (ген *RPR*), при значенні менше або дорівнює 38 ($C_t \leq 38$).

Удосконалення лікувально-профілактичних заходів при герпесвірусних інфекціях першого та другого типів

Вивчення впливу ізамбену на гематологічні та серологічні показники у коней, уражених герпесвірусною інфекцією першого та другого типів

Вивчення препарату проводилось на кобилах, інфікованих ГВК-1 та ГВК-2. Дослідним тваринам задавався імуностимулюючий препарат ізамбен. Препарат задавався протягом трьох діб з вівсом (з розрахунку 1 г на 100 кг маси тіла) одноразово. Через місяць у дослідних тварин була відібрана кров і піддана біохімічним та серологічним дослідженням. Зміни в гематологічних та біохімічних показниках наведено в табл. 6 та 7.

Таблиця 6

Результати гематологічних, біохімічних та серологічних досліджень проб крові кобил до застосування ізамбену

Показники	До застосування ізамбену					Контроль-на група n=4
	Клички кобил					
	Гава	Ігла	Хватка	Ластобо-ла	$M \pm m$	
Наявність фібрину	+	±	±	±	—	—
Лейкоцити, Г/л	5,6	6,25	5,25	6	5,82±0,23	7,82±0,22
Еритроцити, Т/л	5,4	6,1	6,2	6,7	6,13±0,33	7,83±0,52
Гемоглобін, г/л	78	73	74	97	80,51±5,62	122,00±7,73
Гематокрит, %	38	44	36	41	39,82±1,82	44,00±3,81
Загальний білок г/л	61,8	59,2	52,5	75,9	62,41±4,92	65,62±1,32
Досліджено в РДП на ГВК-1	++ ^x	+	+	++		-
Досліджено в РДП на ГВК-2	+	+	+	+		-

Примітки: ^x – позитивні результати в РДП;

^{xx} – негативний результат у РДП

Результати гематологічних, біохімічних та серологічних показників у пробах сироватки крові коней після застосування ізамбену наведено в табл. 7.

З наведених у таблицях 6 та 7 результатів видно, що у коней до застосування ізамбену були зниженими кількість лейкоцитів та еритроцитів, вміст гемоглобіну, гематокриту (у трьох тварин), та білка (у трьох тварин). Препарат застосовували з вівсом раз на день впродовж трьох діб. Через 30 діб після застосування препарату були проведені повторні дослідження. З отриманих даних видно, що кількість лейкоцитів та еритроцитів, вміст гемоглобіну, білка, показник гематокриту достовірно ($p < 0,05-0,001$) підвищились до рівнів фізіологічної норми і стали відповідати показникам здорових кобил.

Таблиця 7

Результати гематологічних, біохімічних та серологічних досліджень проб крові кобил після застосування ізамбену

Показники	Після застосування ізамбену					Контроль-на група, n=4
	Клички кобил					
	Гава	Ігла	Хватка	Ластобо-ла	$M \pm m$	
Наявність фібрину	+	+	±	±	—	—
Лейкоцити, Г/л	8,5	8	10	8,75	$8,81 \pm 0,42$ $p < 0,01$	$7,82 \pm 0,22$
Еритроцити, Т/л	7,9	9,4	10,6	7,7	$8,93 \pm 0,72$	$7,83 \pm 0,52$
Гемоглобін, г/л	109	161	144	122	$134,00 \pm 11,51$ $p < 0,001$	$122,00 \pm 7,73$
Гематокрит, %	44	51	49	47	$47,82 \pm 1,52$	$44,00 \pm 3,81$
Загальний білок, г/л	64,5	76,8	63,4	70,4	$68,81 \pm 3,02$ $p < 0,05$	$65,62 \pm 1,32$
Досліджено в РДП на ГВК-1	+ ^x	-	+	-		-
Досліджено в РДП на ГВК-2	+	- ^{xx}	-	-		-

Примітки: ^x – наявність позитивної реакції в РДП;

^{xx} – негативна реакція в РДП

Нами була удосконалена методика визначення вмісту інтерферону в сироватці крові коней. При цьому були використані перещеплювальна культура епітелію тестікулів поросяти та ентеровірус свиней, які дали можливість за допомогою реакції мікронейтралізації визначити вміст інтерферону в сироватці крові коней. Встановлено, що після застосування ізамбену рівень інтерферону зріс до $3 \log_2$, тоді як до застосування він становив \log_2 . Тобто застосування ізамбену сприяло вірогідному збільшенню, в три рази, рівня інтерферону в організмі коней, інфікованих герпесвірусними інфекціями.

Проведені серологічні дослідження в РДП щодо наявності специфічних антитіл до ГВК-1 та ГВК-2 показали, що до застосування ізамбену до ГВК-1 та ГВК-2 були позитивними всі дослідні тварини (2 тварини мали в сироватці крові титри антитіл з двома лініями преципітації до поліпептидних та протеїдних антигенів ГВК-1). Після застосування препарату були проведені повторні дослідження, які засвідчили, що у дослідних коней до ГВК-2 не було виявлено специфічних антитіл, а до ГВК-1 виявили специфічні антитіла у 2 тварин.

Проведення виробничого експерименту із застосуванням ізамбену на конях, спонтанно інфікованих герпесвірусною інфекцією першого та другого типів, показало доцільність застосування даного препарату при вище вказаних інфекціях.

ВИСНОВКИ

1. У дисертації наведене теоретичне узагальнення та нове вирішення наукової проблеми, що полягає в розробленні методів діагностики герпесвірусної інфекції коней другого типу в РДП та герпесвірусної інфекції першого типу в ПЛР і проведенні комплексних досліджень, які дозволили встановити високий рівень інфікованості різновікових та порідних груп коней герпесвірусною інфекцією другого типу та сумісний її перебіг з герпесвірусною інфекцією першого типу. Вивчено імунний статус коней, уражених як герпесвірусом 2-го типу, так і при сумісному перебігу герпесвірусної інфекції, зумовленої першим та другим типами.
2. Шляхом довготривалого культивування підтипів LR-10 та LR-43 герпесвірусу коней другого типу на перещеплювальній культурі клітин фібробластів шкіри коня та епітелію трахеї теляти вдалось адаптувати їх до культури клітин трахеї теляти. Підтип LR-43 зумовлював ЦПД на 8 – 9 добу, а LR-10 – на 7 – 8 добу.
3. Отримано клон ГВК-2 ТТ, який використано для виготовлення антигену, придатного для постановки РДП.

4. Розроблено метод гіперімунізації кролів для отримання гіперімунної сироватки – компонента РДП для діагностики герпесвірусної інфекції другого типу.
5. Сумісний перебіг герпесвірусних інфекцій першого та другого типів найчастіше відмічався серед кобил та жеребців віком від 4 до 10 років. Інфікованість герпесвірусною інфекцією другого типу тварин української верхової породи становила 56 %, новоолександрівської вагзовної – 60 %, арабської породи – 38 %.
6. Вперше в Україні розроблена технологія підготовки проб та методика постановки полімеразної ланцюгової реакції для діагностики герпесвірусної інфекції першого типу.
7. У коней, уражених ГВК-1, відмічається вірогідне ($p < 0,05$) зниження кількості лейкоцитів, еритроцитів, вмісту гематокриту та рівня гемоглобіну, а при ураженні ГВК-2 встановлено вірогідне ($p < 0,05$) зниження лише кількості лейкоцитів. У коней при сумісному перебігу ГВК-1 та ГВК-2 відмічається вірогідне ($p < 0,01-0,001$) зниження кількості еритроцитів, рівнів гематокриту, гемоглобіну, загального білка та зростання кількості лейкоцитів і рівня імуноглобулінів.
8. Удосконалена методика визначення інтерферону в сироватці крові коней та встановлено, що ізамбен доцільно використовувати для лікування коней, інфікованих герпесвірусною інфекцією першого та другого типів.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. З метою комплексної діагностики герпесвірусної інфекції першого типу застосовувати полімеразну ланцюгову реакцію.
2. Отриманий клон ГВК-2 ТТ доцільно використовувати для удосконалення методів діагностики та профілактики ГВК-2.
3. Для проведення епізоотологічного моніторингу щодо герпесвірусної інфекції коней другого типу потрібно використовувати розроблену нами РДП.
4. Коням, ураженим ГВК-1 та ГВК-2, доцільно застосовувати ізамбен у дозі 1 г на 100 кг маси тіла, один раз на добу, впродовж 3-х діб у комплексі з симптоматичним лікуванням.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Радзиховський М.Л.** Використання РДП для діагностики у коней герпесвірусної інфекції другого типу / М.Л. Радзиховський // Наукові та практичні аспекти ветеринарної медицини в

- Україні: Вісник Білоцерківського державного аграрного університету. – 2006. – Вип. 39. – С.106 – 109.
2. **Радзиховський М.Л.** Сумісний перебіг герпесвірусної інфекції першого та другого типів серед коней в різних господарствах / М.Л. Радзиховський // Вісник державного агроекологічного університету. – 2006. – №2. – С. 232–236.
 3. Галатюк О.Є. Гематологічні та біохімічні показники крові у коней, уражених герпесвірусною інфекцією першого та другого типів / О.Є. Галатюк, **М.Л. Радзиховський** // Науково-технічний бюлетень інституту біології тварин і державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. – 2007. – Вип.8. – №3,4. – С.45–48 (здобувачем виконані експериментальні дослідження, аналіз та узагальнення результатів).
 4. Хмельницький Г.О. Вплив ізамбену на гематологічні, біохімічні та серологічні показники у коней, уражених герпесвірусною інфекцією першого та другого типів / Г.О. Хмельницький, О.Є. Галатюк, **М.Л. Радзиховський** // Науково-теоретичний збірник. Вісник державного агроекологічного університету. – 2008. – Том 1, №1 – С. 204 – 207 (здобувачем виконані експериментальні дослідження, аналіз та узагальнення результатів).
 5. Епізоотологічні особливості, лікування та профілактика ринопневмонії коней / О.Є. Галатюк, В.Л. Бегас, **М.Л. Радзиховський**, Ж.В. Рибачук // Ветеринарна медицина України. – 2008. – №10. – С.14–16 (здобувачем виконані експериментальні дослідження, аналіз та узагальнення результатів).
 6. Епізоотична ситуація в Україні та профілактика заразних хвороб коней / О.Є. Галатюк, В.Л. Бегас, А.І. Каньовський, Ж.В. Рибачук, **М.Л. Радзиховський**, О.М. Вержиховський, Л.К. Гнап / Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини: Збірник наукових праць./ Харківської державної зооветеринарної академії. – 2008. – Вип. 17 (42), ч.2. – С. 196–200 (здобувачем виконані експериментальні дослідження, аналіз та узагальнення результатів).
 7. **Радзиховський М.Л.** Культивування на культурах клітин підтипів LR-10 та LR-43 герпесвірусу коней другого типу / М.Л. Радзиховський // Проблеми екології ветеринарної медицини Житомирщини: Вісник Міжнародної науково-виробничої конференції. – Житомир, 2005.– С.167–169.
 8. **Радзиховський Н.Л.** Распространение герпесвирусной инфекции 1-го и 2-го типа, а также их совместное течение среди лошадей разного возраста / Н.Л. Радзиховский, А.Е. Галатюк // Материалы Научно-практической конференции, посвящённой 70-ти летию К.П. Юрова – М.: 2007. – С. 20.
 9. Ринопневмонія коней: епізоотологія, лікування та профілактика / О.Є. Галатюк, В.Л. Бегас, А.І. Каньовський, **М.Л. Радзиховський**, Ж.В. Рибачук // Здоров'я тварин і ліки. –

Київ, 2008. – №10 (83). – С.8–11 (здобувачем виконані експериментальні дослідження, аналіз та узагальнення результатів).

Радзиховський М.Л. Герпесвірусні інфекції коней першого та другого типів (удосконалення діагностики та лікування). – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія. – Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2009.

Дисертація присвячена удосконаленню методів діагностики та засобів профілактики герпесвірусної інфекції першого та другого типів у коней. Дослідження виконані на 622 конях.

Визначена поширеність герпесвірусної інфекції другого типу та сумісний перебіг інфекції з першим типом у деяких регіонах України. На основі серологічного моніторингу встановлено, що серопозитивність коней в РДП щодо ГВК-2 становить в племінних конегосподарствах 55 %, а сумісний перебіг ГВК-1 та ГВК-2 виявлено в 32 % коней.

Проведена адаптація штамів LR-10 та LR-43 герпесвірусу коней другого типу до перещеплювальної культури епітелію трахеї теляти. В результаті довготривалого культивування був отриманий клон ГВК-2 ТТ, який використано для отримання антигену, придатного для постановки РДП.

Розроблена схема отримання гіперімунної діагностичної сироватки на кролях, яка виявилась придатною для постановки реакції дифузної преципітації. Розроблена схема постановки полімеразної ланцюгової реакції для виявлення герпесвірусної інфекції першого типу. Встановлено високий коефіцієнт кореляції результатів реакції дифузної преципітації, реакції затримки гемаглютинації та полімеразної ланцюгової реакції щодо діагностики герпесвірусної інфекції першого типу. Результати досліджень вказують, що найбільш інфікованими ГВК-2 є тварини віком старше 10 років, а сумісний перебіг герпесвірусної інфекції, зумовленої ГВК-1 та ГВК-2, відмічаються у коней віком від 4 до 10 років. Також було встановлено, що коні аборигенних порід менш схильні до інфікування ГВК-2, ніж племінні. Встановлено, що серед коней ваговозної породи 60 % уражено ГВК-2-го типу, а сумісний перебіг хвороби виявлено у 46 % тварин української верхової породи. У коней, уражених ГВК-1-го типу, відмічається вірогідне ($p < 0,05$) зниження кількості лейкоцитів, еритроцитів, гематокриту та рівня гемоглобіну, а при ураженні ГВК-2-го типу – вірогідне ($p < 0,05$) зниження лише кількості лейкоцитів. У коней при сумісному перебігу ГВК-1 та ГВК-2 відмічається вірогідне ($p < 0,01$) зниження рівнів гематокриту, гемоглобіну, загального білка, кількості еритроцитів та зростання кількості лейкоцитів і рівня імуноглобулінів.

З метою вивчення лікувальних властивостей ізамбену при герпесвірусних інфекціях коней удосконалена методика постановки реакції мікронейтралізації з використанням перещеплювальної культури клітин епітелію тестікулів поросяти та ентеровірусу свиней і визначені рівні інтерферону в сироватці крові здорових коней та уражених ГВК-1 і ГВК-2.

Проведені дослідження дали можливість удосконалити методи профілактики та лікування герпесвірусної інфекції першого та другого типів шляхом застосування препарату ізамбен у дозі 1г на 100 кг маси тіла, один раз на добу з кормом впродовж 3-х діб.

Ключові слова: герпесвірусна інфекція коней першого типу, герпесвірусна інфекція коней другого типу, реакція дифузної преципітації, полімеразна ланцюгова реакція, гіперімунна сироватка, профілактика, епізоотологічний моніторинг.

Радзиховский Н.Л. Герпесвирусные инфекции лошадей первого и второго типов (усовершенствование диагностики и лечения). – Рукопись.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология, эпизоотология, инфекционные болезни, и иммунология. – Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2009.

Диссертация посвящена усовершенствованию методов диагностики и профилактики герпесвирусных инфекций первого и второго типов у лошадей. Изучено распространение герпесвирусной инфекции второго типа и совместное инфицирование первым и вторым типом в некоторых регионах Украины. На основании серологического мониторинга было установлено, что инфицированность лошадей племенных хозяйств вторым типом вируса составляла 55 %, а совместное течение герпесвирусной инфекции, обусловленной первым и вторым типом вируса, выявлено у 32 % лошадей.

Проведена адаптация двух подтипов LR-10 и LR-43 герпесвируса лошадей второго типа к перевиваемой культуре клеток трахеи телёнка. В результате длительного культивирования получен клон ГВЛ-2 ТТ, который вызывает ЦПД в культуре клеток через 5–7 дней. Клон ГВЛ-2 ТТ использовался для получения антигена и гипериммунной сыворотки – компонентов, необходимых для постановки РДП.

Для получения контрольной положительной сыворотки разработана методика иммунизации кроликов клоном ГВЛ-2 ТТ. Данную гипериммунную сыворотку использовали для постановки реакции диффузной преципитации и выявления животных, инфицированных ГВЛ-2-го типа. Было установлено, что кроме гипериммунной сыворотки кроликов можно также использовать сыворотку лошадей реконвалесценто́в для диагностики ГВЛ-2 в РДП.

Разработана схема постановки полимеразной цепной реакции для обнаружения ГВЛ-1. Проведенные комплексные исследования дали возможность определить высокий коэффициент корреляции результатов в РДП, РТГА и ПЦР при диагностике герпесвирусной инфекции первого типа.

При исследовании разных пород лошадей конного завода было установлено, что 60 % животных тяжёловозной породы инфицированы ГВЛ-2-го типа. В этом же хозяйстве установлено совместное течение ГВЛ-1 и ГВЛ-2-го типов у 46 % лошадей украинской верховой породы и в 19 % лошадей арабской породы.

Проведённые исследования в РДП сывороток крови лошадей в товарных хозяйствах и у граждан индивидуальных хозяйств свидетельствуют, что лошади аборигенных пород не были инфицированы ГВЛ-2.

У лошадей, пораженных ГВЛ-1-го типа, установлено достоверное ($p < 0,05$) снижение количества лейкоцитов, эритроцитов, содержания гематокрита и гемоглобина, а при поражении ГВЛ-2-го типа установлено достоверное ($p < 0,05$) снижение только количества лейкоцитов. У лошадей при совместном поражении ГВЛ-1 и ГВЛ-2 типов установлено достоверное ($p < 0,01$) снижение количества эритроцитов, содержания гематокрита, гемоглобина, общего белка и увеличение количества лейкоцитов и иммуноглобулинов.

Впервые модифицирована постановка реакции микронейтрализации с использованием перевиваемой культуры клеток эпителия тестикулов поросят и энтеровируса свиней для выявления содержания интерферона в сыворотке крови лошадей. Изучено влияние препарата изамбен на уровни интерферона, гематологические, биохимические и серологические показатели у лошадей, инфицированных ГВЛ-1 и ГВЛ-2.

Установлено, что применение изамбена способствует повышению иммунобиологических показателей реактивности организма лошадей и проявляет лечебное действие. Использование данного препарата в дозах 1 г на 100 кг живой массы один раз в сутки в течение трёх суток с кормом оказывает лечебный эффект у лошадей при совместном течении герпесвирусной инфекции, обусловленной ГВЛ-1 и ГВЛ-2 типов.

Ключевые слова: герпесвирусная инфекция лошадей первого типа, герпесвирусная инфекция лошадей второго типа, реакция диффузной преципитации, полимеразная цепная реакция, гипериммунная сыворотка, профилактика, эпизоотологический мониторинг.

Radsikhovskii N. Herpesviridae infections of horses of the first and second types (improvement of diagnostics and treatment). – Manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of veterinary sciences on a speciality 16.00.03 - veterinary microbiology, epizootologia, infectious diseases and immunology. - National University of life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, 2009.

The dissertation is devoted to improvement of methods of diagnostics and preventive maintenance herpesviridae infections of the first and second type at horses. Distribution herpesviridae infections of the second type and joint infection by the first type in some regions of Ukraine is investigated. On a basis serological monitoring it has been marked infection by second type 55 %, and joint 32 % of researched horses.

Adaptation of two subtypes LR-10 and LR-43 herpesviridae horses of the second type on culture of cells of a trachea cow is lead. In result the virus which is received causes CPD in on culture of cells through 6 - 7 days. As a result of use of a method blashek clone EHV-2 TT which causes CPD on culture of cells through 5 - 7 days is received. Clone EHV-2 TC was used for reception of an antigene and hyperimmune whey of components for statement RDP.

The circuit of statement polimerazno chain reaction for detection EHV-1 is developed. The high factor of correlation of results RDP, RSGA and PCR, in diagnostics herpesviridae infections of the first type is determined.

At horses struck EHV-1 it is established authentic ($p < 0,05$) decrease in quantity of leukocytes, hemoglobin, and at defeat EHV-2 it is established authentic ($p < 0,05-0,01$) decrease only leukocytes. At horses at joint defeat EHV-1 and EHV-2 it is established authentic ($p < 0,01-0,001$) decrease in quantity gematocrit, hemoglobin, the general fiber and increase in quantity of leukocytes and antibodies.

For the first time influence of a preparation izamben on levels of interferon, hematological, biochemical and serological parameters at horses infected EHV-1 and EHV-2 is investigated.

Key words: herpesviridae an infection of the first type, herpesviridae an infection of the second type, reaction diffusion precipitation, polymerazion chain reaction, hyperimmune serum, preventive maintenance, epizootologikal monitoring.