МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Іващенко Ольга Андріївна

УДК: 575.86 + 578.832.1

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВІРУСУ РЕПРОДУКТИВНОГО ТА РЕСПІРАТОРНОГО СИНДРОМУ СВИНЕЙ В УКРАЇНІ НА ОСНОВІ ВИВЧЕННЯ ЙОГО МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ

03.00.06 – вірусологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка Міністерства освіти і науки України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Будзанівська Ірина Геннадіївна,
ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
професор кафедри вірусології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Матвієнко Наталя Миколаївна,
Інститут рибного господарства НААН,
завідувач відділу іхтіопатології

кандидат біологічних наук
Загородня Світлана Дмитрівна,
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України,
завідувач відділу репродукції вірусів

Захист дисертації відбудеться 14 березня 2017 р. о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.14 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 03127, м. Київ, проспект академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці імені М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 58.

Автореферат розісланий «10» лютого 2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради В.В. Джаган

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми дослідження. Вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (ВРРСС) на теперішній час поширений у більшості країнах-виробниках свинини та продовжує залишатись головною причиною репродуктивних втрат та респіраторних захворювань свиней (Van Breedam et al., 2011). Територіальна поширеність ВРРСС (Murtaugh et al., 2010), тяжкість його впливу на сприйнятливі популяції тварин (Shi et al., 2010), виникнення непередбачуваних надзвичайних епідемічних ситуацій – всі ці факти стали причиної внесення вірусу до списку особливо небезпечних захворювань МЕБ.

ВРРСС є представником роду *Arterevirus*, родини *Artereviridae*, порядку *Nidovirales*. Еволюційна мінливість ВРРСС фіксується, як найвища серед РНК вірусів тварин (Kedkovid et al.,2010) , що значно ускладнює постановку правильного діагнозу, вакцинацію та контроль за захворюванням (Stadejek et al., 2008).

Рівень розповсюдженості ВРРСС в Україні є недостатньо вивченим, а його шкодочинність для тваринництва вагома, відповідно нагальним завданням є зясування епідемічної ситуацій щодо даного патогена на території нашої країни шляхом проведення серологічного моніторингу.

Впровадження ефективних методів діагностики захворювання є одним з інструментів у боротьбі з розповсюдженням ВРРСС серед тварин у господарствах України. Одним із підходів до вирішення даної проблеми є створення тест-систем на основі полімеразної ланцюгової реакції, що є найперспективнішим методом діагностики ВРРСС як при хронічній та персистентній формі захворювання, так і у випадку гострого перебігу захворювання. Очевидним є те, що розробка тест-системи на основі ПЛР для швидкої диференційної діагностики ВРРСС є надзвичайно важливим завданням для широкого практичного використання. Крім того, лише за допомогою вказаного методичного підходу можливим є ідентифікація вірусоносійства, що необхідно для успішного контролю за розповсюдженням захворювання.

З огляду на значну різноманітність та високу варіабельність штамів ВРРСС (Rossow, 1998), з'ясування походження ізолятів вірусу є необхідним для визначення ступеню їх вірулентності, шляхів зараження тварин. Оскільки для захисту проти різних штамів необхідно використовувати специфічні вакцини, відповідно аналіз походження виявлених ізолятів є необхідним для адекватної вакцинації тварин. Однією з найваріабельніших ділянок геному вірусу є ORF 5 (Stadejek et al., 2008), данні про секвенс якої є найінформативнішим для визначення філогенетичної спорідненості ізоляту з раніше відомими та для встановлення ступеню гомології з вакцинними штамами при підборі оптимального підходу до вакцинопрофілактики в кожному окремому клінічному випадку. Одним із методів вирішення даної проблеми є розробка ПЛР тест-системи на основі консервативної ділянки гену ORF 7 для діагностики та на ORF 5 для подальшого секвенування вірусу, проте високий рівень варіабельності цієї ділянки геному ВРРСС значно ускладнює виконання цього завдання.

Враховуючи високу варіабельність nsp-2 регіону ВРРСС в цілому (Drolet et al., 2003), а також можливість циркуляції на території України вірусу з генетичним

профілем, характерним для східноєвропейського ВРРСС (Stadejek, 2007), постає необхідність аналізу чутливості серологічних тест-систем, які використовуються в Україні. Для аналізу епізоотичної ситуації в господарстві, термінів інфікування тварин, інтенсивності та тривалості інфекційного процесу, що необхідно для комплексної оцінки причетності ВРРСС в симптомокомплексі респіраторних проблем та подальшого підбору оптимальної схеми вакцинопрофілактики, найзручнішою є побудова серологічних профілів господарства (Brown et al., 2009).

Взаємодія між вірусом та імунною системою хазяїна достатньо складна. Вже достеменно відомо, що ВРРСС проявляє імуносупресивну дію, що ослаблює вроджений захист організму та значно знижує ефективність адаптивної імунної відповіді. Це в свою чергу призводить до розвитку ко-інфекцій, як вірусними так і бактеріальними патогенами (Drolet et al., 2003). В таких складних клінічних випадках необхідно не тільки виявити кожен з патогенів, який бере участь в розвитку патологічного процесу, проте й встановити роль в ньому кожного з них. З цією метою найдоцільнішим є використання гістологічного методу дослідження для аналізу характеру патогістологічних змін в тканинах органів та ступеню ураження для встановлення ролі ВРРСС та ко-інфектантів у інфекційному процесі.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в межах технічного завдання держбюджетної теми №11БФ 036-02 «Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження стратегій адаптації фіто-, зоо-, та віробіоти України з використанням біоінформаційних технологій» кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, № державної реєстрації 0111U004649.

Мета та завдання дослідження. Ідентифікувати ВРРС на території України, вивчити його молекулярно-біологічні особливості, дослідити поширеність та розробити підходи до диференційної діагностики даного патогену.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Провести ретроспективний аналіз захворюваності на ВРРСС серед поголів'я свиней України за період 2005-2014 рр.
2. Виділити генетичний матеріал українських ізолятів вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (ВРРСС) з патологічного матеріалу.
3. Підібрати праймери до ділянок геному ВРРСС (ORF 5, ORF 7) та оптимізувати умови проведення ПЛР.
4. Провести секвенування та філогенетичний аналіз українських ізолятів ВРРСС.
5. Провести порівняльний аналіз чутливості комерційних серологічних тест-систем до українських ізолятів ВРРСС.
6. Розробити принципи побудови серологічних профілів стада за ВРРСС.
7. Розробити диференційну діагностику ВРРСС в клінічно складних випадках ко-інфікування декількома патогенми.

Об'єкт дослідження: вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней та його діагностика.

Предмет дослідження: молекулярно-біологічна характеристика ізолятів вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней, що циркулюють в Україні, захворюваність на ВРРСС.

Методи досліджень. Для виявлення та ідентифікації вірусів застосовували клінічні, вірусологічні, серологічні, молекулярно-біологічні, гістологічні (паталого-формологічний аналіз та імуногістохімічне дослідження), філогенетичні, статистичні методи дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів. Проведено виділення в Україні ізолятів вірусу ВРРСС, біологічні властивості цих ізолятів, зроблений їх філогенетичний аналіз. Отримані результати дають можливість підібрати штами для виробництва діагностичних та вакцинних препаратів.

Проведений ретроспективний аналіз поширеності ВРРСС серед поголів'я свиней України і філогенетичний аналіз високоваріабельної ділянки гену геному ORF5 є науковим підґрунтям для вдосконалення впровадженої системи епідеміологічного та вірусологічного нагляду за ВРРСС в Україні.

Завдяки проведенню порівняльного аналізу комерційних серологічних тест-систем показано різну їх чутливість до українських ізолятів, що в свою чергу вказує на антигенну відмінність ВРРСС, що циркулює в Україні, у порівнянні з тими, що циркулюють в Західній Європі, Азії, Америці.

Показана різниця у патогенезі на рівні тканин ВРРСС українських штамів, у порівнянні з американськими та західноєвропейськими.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати молекулярно-біологічної характеристики ВРРСС, що циркулює в Україні, забезпечують необхідною інформацією для вдосконалення існуючих методів діагностики та впровадження комплексних підходів до профілактики захворювання.

Порівняльний аналіз чутливості комерційних серологічних тест-систем, що використовуються в Україні для діагностики ВРРСС, показано доцільність використання конкретних тест-систем виробництва США (тест-система 1) та Іспанії (тест-система 4) для проведення моніторингових досліджень епізоотичної ситуації в Україні. Це забезпечить необхідною інформацією управлінські структури та дозволить більш ефективно реагувати на появу нових штамів ВРРСС в Україні та контролювати динаміку його поширення.

Апробована тест-система для детекції консервативної ділянки геному ВРРСС методом ПЛР забезпечить необхідність в точній експрес діагностиці збудника, тоді як тест-система для детекції гену ORF 5 ВРРСС – інструментом, що дозволив ідентифікувати і оцінити положення виділених штамів на філогенетичному дереві на глобальному рівні. Важливість цього полягає не стільки в аналізі конкретних ізолятів, як в можливості використання цього методу в рутинній діагностиці ВРРСС для впровадження ефективніших засобів профілактики, та заходів біобезпеки для кращого контролю ситуації з ВРРСС.

Виявлені характерні зміни в тканинах органів тварин уражених ВРРСС на різних стадіях захворювання, що робить можливим використання гістологічного методу для диференційної діагностики ВРРСС у складних клінічних випадках ко-інфекції.

Результати досліджень використані для розробки комплексного підходу до діагностики ВРРСС впроваджені в протокол роботи Центру ветеринарної діагностики (м. Київ), в якому проводиться діагностика вірусних та бактеріальних захворювань сільськогосподарських тварин та птиці з усієї України.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора. Розробка плану експерименту та її реалізація, отримання експериментальних даних, їх узагальнення, інтерпретація здійснена автором особисто під керівництвом проф. І.Г. Будзанівської.

Автором вивчено динаміку поширення ВРРСС на території України за період 2005-2014рр. разом з директором Центру ветеринарної діагностики Собко І.О.

Лабораторна диференційна діагностика ВРРСС методом ПЛР, гістологічне та імуногістохімічне дослідження були проведені у Центрі ветеринарної діагностики самостійно під керівництвом директора Центру ветеринарної діагностики Собко І.О.

Вибір праймерів для виявлення високоваріабельного гену ORF5 та філогенетичний аналіз вірусів, що циркулюють в Україні, проведений автором особисто на кафедрі вірусології ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка під керівництвом наукового керівника Будзанівської І.Г.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на засідання кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (що півроку); конференції присвяченій 50-річчю кафедри вірусології «Understanding and combating PRRS in Europe» (Будапешт 25-27 жовтня 2012, Угорщина); VII Міжнародній конференції «Біоресурси та віруси» (Київ, 10-13 вересня 2013); «Global Virus Networking»(4-6 червня, Estonia 2014); V-ий Європейський симпозіум здоров'я свиней (Сполучене королівство Великої Британії і Північної Ірландії, 2013); VIII Міжнародній конференції «Біоресурси та віруси» (Київ, 10-13 вересня 2016).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 6 наукових праць у фахових наукових виданнях (2 мають індекс цитування) та 13 тез наукових конференцій (7 – міжнародні).

Структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 148 сторінках комп'ютерного тексту і складається зі вступу, огляду літератури, 5 розділів власних досліджень та їх обговорення, узагальнень, висновків. Список літератури включає 156 джерел. Дисертація ілюстрована 20 рисунками та 20 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Огляд літератури складається з одного розділу, де наведено останні відомості про вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней, його геном та варіабельність, патогенез та розвиток імунної відповіді у тварин, клінічні прояви репродуктивного та респіраторного синдрому свиней та лабораторні методи діагностики ВРРСС. Огляд літератури обґрунтовує доцільність виконання роботи.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження були ізоляти ВРРСС, які виділені від свиней із господарств України. Робота проводилась на базі Центру ветеринарної діагностики

в лабораторії вірусології, гістології, патанатомії та на базі кафедри вірусології ННЦ «Інтистут біології» Київського Університету імені Тараса Шевченка.

Моніторинг ВРРСС проводили методом імуноферментного аналізу (ІФА). Матеріалом для дослідження були зразки сироваток крові свиней з промислових господарств України. Для детекції імуноглобулінів класу G методом ІФА використовували тест-систему «IDEXX HerdCheck PRRS 3XR ELISA», США.

Для порівняльної характеристики чутливості детекції антитіл до ВРРСС серологічних тест-систем, що використовуються в Україні, використовували тест-системи наступних виробників: «Ingezim PRRS Universal 11.PRU.K1», Іспанія; «BIONOTE», Корея; «CIVTESTsuisPRRS», HIPRA, Іспанія; «IDEXX HerdCheck PRRS 3XR ELISA», США. Аналіз проводили відповідно до інструкції виробника та аналізували на спектрофотометрі «Reader TCAN», при відповідних довжинах хвиль.

Для виявлення генетичного матеріалу ВРРСС у зразках уражених тварин, проводили підбір праймерів до консервативної ділянки N-гену та високоваріабельної ділянки вірусу ORF5 за допомогою програми Vector NTI Advanced 10 (Invitrogen, США). За допомогою вказаних комп'ютерних програм проводили аналіз та вирівнювання доступних у GenBank нуклеотидних послідовностей геномів ізолятів ВРРСС. Праймери підбирали до послідовності N-гену та ORF5, аналізуючи їх положення та рівень гомології до матриці, для проведення зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР).

Для відпрацювання умов проведення ПЛР використовували проби орофаренгіальних, вагінальніх змивів від свиноматок, сперму хряків, а також секційний матеріал (тканини легень, лімфатичних вузлів, селезінки) від свиней (Xiao., 2010). Секційний матеріал від загиблих тварин відбирали в паталого-анатомічній лабораторії Центру ветеринарної діагностики.

Для гістологічного дослідження відбирали секційний матеріал від уражених тварин (шматочки нирок, печінки, селезінки, легень, серця, мозку, трахеї, лімфатичних вузлів, тимусу). При відборі матеріалу для дослідження враховували мікроскопічну будову органів та тканин: нирки розрізали перпендикулярно до поверхні так, щоб в досліджуваному зразку була наявна кіркова та мозкова речовина; паренхіматозні органи (селезінку, печінку) відбирали з капсулою; стінки порожнистих органів відбирали поперечними зрізами (Lobo., 2011).

Фіксування досліджуваних зразків тканин органів здійснювали за модифікованою нами методикою Зубкової та колег (Зубкова, 1998). Секційний матеріал занурювали у 80 мл 10% розчину формаліну та витримуванням у мікрохвильовій печі впродовж 30 секунд за потужності 400 Вт з водним навантаженням 400 мл. Після фіксації проводили первинне зневоднення тканин шляхом занурення зразків у 80 мл 96 % етанолу та експозицією у мікрохвильовій печі протягом 10 хв за потужності 100 Вт. Гістологічні препарати готували за стандартною методикою (Горальский та ін.., 2005). Фарбували гістологічні зрізи гематоксиліном та еозином. Зміни виявляли, аналізуючи препарати під світловим мікроскопом.

Секвенування очищених ампліфікованих фрагментів проводили на Applied Biosystems 3730x1 DNA Analyzer з використанням Big Dye terminators, version 3.1 (Applied Biosystems, США). Пошук та вибірку необхідних послідовностей

проводили за допомогою BLAST (Basic Local Aligment Search Tool). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою алгоритму ClustalW.

Філогенетичні дерева будували у програмі MEGA 6.0. (Tamura, 2011). Еволюційні зміни досліджували методом аналізу дискретних ознак — Maximum Likelihood (ML).

Для статистичної оцінки значущості отриманих результатів застосовували метод бутстреп-аналізу (Bootstrap) з числом реплікацій 1000, за допомогою якого оцінювали достовірність розміщення кожного таксону (Felsenstein, 1985). Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали комп'ютерною програмою Microsoft Excel 2003 із врахуванням t-критерію Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Динаміка розповсюдження вірусу територією України в період з 2005 по 2009 р. В період 2005-2009 роки ми провели серологічне дослідження тварин зі 166 ферм усіх регіонів України (табл. 1). В 2005 році ми провели перше в Україні серологічне дослідження крові тварин з 18 областей України. Циркуляція ВРРСС виявили лише в Донецькій області та в Автономній республіці Крим. В Київській та Житомирській областях було виявлено по одній сорологічно-позитивній за ВРРСС пробі. Для уникнення хибно-позитивного результату та підтвердження наявності циркуляції ВРРСС в умовах господарства ми вважали за необхідне провести повторний відбір сироваток крові від тварин з цих господарств. В 2006 році за динамікою росту титрів антитіл, а також за кількістю серологічно позитивних зразків з вищезгаданих господарств, ми підтвердили циркуляцію ВРРСС в господарстві Київської області.

Таблиця 1.

Кількість зразків та регіонів, в яких проводились дослідження сироватки крові в період з 2005 по 2009 рік

	Рік				
	2005	2006	2007	2008	2009
Кількість областей, з яких відбирали сироватки крові	20	20	21	21	23
Кількість регіонів, в яких були виявлені позитивні зразки	1	10	15	16	19
Загальна кількість проаналізованих зразків	8350	8355	9200	6450	11000

Загалом в 2006 році ми виявили серологічно-позитивних за ВРРСС тварин у 7-ми областях України. Беручи до уваги результати інших досліджень та наші, станом на 2006 рік циркуляція ВРРСС була детектована в 10-ти та 15-ти областях України в 2006 та 2007 роках відповідно. Відтак, в 2006 році виявлено значну поширеність серологічно-позитивних за ВРРСС клінічних випадків в Івано-Франківській, Донецькій, Запорізькій, Київській, Хмельницькій, Одеській, Полтавській, Сумській, Черкаській областях та Автономній республіці Крим. Також

ми поєднали наші результати за 2007 рік з раніше опублікованими результатами Гаврасьєвої та її колег і встановили циркуляцію ВРРСС також у Волинській, Дніпропетровській, Луганській, Чернігівській та Миколаївській областях.

В 2008 остаточно нами було встановлено факт циркуляції ВРРСС також в Житомирській області, а в 2009 році результати нашого серологічного моніторингу підтвердили наявність ВРРСС в господарствах Рівненської, Харківської та Кіровоградської областей.

Всі вищевикладені результати свідчать про швидке поширення ВРРСС територією України. Відтак в 2005 році нами була показана циркуляція ВРРСС лише в двох областях України, а в 2009 – у 19-ти областях.

Аналіз ситуації за ВРРСС в Україні в період з 2010 по 2014 рр. З 2010 по 2014 рік включно ми дослідити сироватки крові тварин з 254 ферм 25-ти регіонів України**.** В 2010 році ми спостерігали значне збільшення кількості господарств з серологічно-позитивними за ВРРСС тваринами. Ферму вважали ВРРСС позитивною (наявна циркуляція збудника в умовах ферми) лише у випадку, якщо більше ніж 25% досліджених сироваток крові були позитивними за ВРРСС і лише після повторного аналізу сироваток тварин з цієї ферми. У випадку детекції поодиноких сироваток крові з високими титрами антитіл до ВРРСС у тварин з ферм, де раніше не була встановлена циркуляція збудника, ми вважали за необхідне повторити дослідження та встановити постійний серологічний моніторинг для аналізу епізоотичної ситуації в господарстві.

Рис 1. Кількість серологічно позитивних за ВРРСС ферм в Україні в період 2010 – 2014 рр.

Встановлено, що у 84 фермах з 19 регіонів України наявна циркуляція ВРРСС. Також ми детектували поодинокі (<3) сироватки крові з високими титрами антитіл до ВРРСС в стадах Тернопільській, Полтавській областях та Автономній Республіці Крим. Відповідно необхідні подальші моніторингові дослідження для встановлення епізоотичної ситуації в господарствах цього регіону. Антитіла до

ВРРСС не були виявлені лише у тварин з Луганської та Миколаївської областей (рис. 1). Однак хотіли б відзначити, що кількість зразків з цих регіонів була недостатньою для оцінки епізоотичної ситуації і тому робити висновки про епізоотичне благополуччя в даному регіоні зарано, необхідні подальші дослідження.

Загалом, ми проаналізували 97213 сироваток крові з 242 ферм 24 регіонів України в період з 2005 по 2014 рік включно. Шість тисяч шістсоттридцять сироваток крові були серологічно позитивні за ВРРСС. Наші данні, спільно з раніше опублікованими дослідженнями Гаврасьевої та колег вказують на швидке розповсюдження ВРРСС територією України. Аналіз ситуації в період з 2010 по 2014 роки вказує на наявність циркуляції збудника в 19 регіоні України (рис. 1.) Циркуляція вірусу була детектована в 84 фермах України, тоді як в 5 фермах з Одеської, Полтавської та необхідні додаткові дослідження для остаточного аналізу епізоотичної ситуації.

Наші результати значно доповнюють раніше опубліковані данні що до тенденції поширення ВРРСС територією України, а також є абсолютно новими що до сучасної епізоотичної ситуації за ВРРСС.

Особливості застосування серологічних досліджень у діагностиці ВРРСС. Зважаючи на високий рівень варіабельності патогену, а також його значне поширення в Україні та світі, впровадження комплексного підходу до його лабораторної діагностики є необхідним та важливим кроком у контролі цього вірусу та підвищенні біологічної безпеки продовольчого комплексу.

Вибір методу діагностики вірусу залежить від поставленої мети лабораторного дослідження та термінів інфікування тварин. Для встановлення термінів інфікування, поширеності збудника в популяції, контролю якості проведеної вакцинації, ефективності заходів викорінення збудника використовують серологічні дослідження. Серед серологічних методів дослідження найпоширенішим є непрямий імуноферментний аналіз (ІФА), цільовим антигеном в якому є N протеїн. Це не єдиний антигенний детермінант ВРРСС, на який напрацьовується імунна відповідь, проте він є найконсервативнішим за будовою, високо імуногенним та індукує ранню гуморальну відповідь в організмі тварини. Тест-системи ІФА, що містять в якості антигенних детермінант окрім вірусного протеїну N, протеїни nsp-2 та nsp1, проявляють нижчу чутливість та меншу специфічність. Протеїн nsp-2 проявляє значно нижчу спорідненість до обох генотипів ВРРСС, у порівнянні з N-кодуючою ділянкою гену геному (70,6–95,6 порівняно з 84,9–100 % відповідно).

Отож, враховуючи високу варіабельність nsp-2 регіону ВРРСС в цілому, а також можливість циркуляції на території України ВРРСС з генетичним профілем, характерним для східноєвропейського ВРРСС ми провели порівняльний аналіз чутливості чотирьох промислових серологічних тест-систем, що використовуються в Україні.

Проведений порівняльний аналіз сироваток крові тварин на вміст антитіл до ВРРСС в чотирьох комерційних тест-системах різних виробників. За отриманими результатами з двох господарств України всі чотири тест-системи показали однакові результати (табл. 2).

Таблиця 2.

Порівняльні результати серологічних досліджень сироваток крові свиней на наявність антитіл до ВРРСС

Господарство	№ проби	Тест-система 1, США		Тест-система 2, Іспанія		«Тест-система 3, Корея		Тест-система 4, Іспанія	
		ОГ	Результат	ОГ	Результат	ОГ	Результат	ОГ	Результат
1	1	2,984	позитивний	150	позитивний	1,53	позитивний	2,504	позитивний
2	2	3,012	позитивний	80	позитивний	1,53	позитивний	2,845	позитивний
	3	0,699	позитивний	19	слабкопозитивний	0,91	позитивний	0, 53	позитивний
	4	2,932	позитивний	125	позитивний	1,53	позитивний	1,606	позитивний
	5	0,396	слабкопозитивний	9	негативний	0,77	позитивний	0,412	слабкопозитивний
	6	0,059	негативний	0	негативний	0,46	позитивний	0,119	негативний
	7	0,456	позитивний	2	негативний	0,74	позитивний	0,432	слабкопозитивний
4	8	0,556	позитивний	0	негативний	0,18	негативний	0,321	негативний
	9	2,601	позитивний	0	негативний	0,27	негативний	0,273	негативний
	10	0,042	негативний	0	негативний	0,24	негативний	0,141	негативний
5	11	0,387	слабкопозитивний	24	позитивний	0,84	позитивний	0,609	позитивний
	12	2,773	позитивний	123	позитивний	1,43	позитивний	1,506	позитивний
6	13	0,396	слабкопозитивний	7	негативний	0,81	позитивний	0,432	слабкопозитивний
	14	0,027	негативний	0	негативний	0,47	позитивний	0,097	негативний
	15	0,493	позитивний	4	негативний	0,81	позитивний	0,438	слабкопозитивний
7	16	3,484	позитивний	170	позитивний	1,63	позитивний	2,854	позитивний
	17	3,019	позитивний	81	позитивний	1,44	позитивний	2,796	позитивний
	18	0,432	позитивний	18	слабкопозитивний	0,89	позитивний	0, 57	позитивний
8	19	2,732	позитивний	0	негативний	0,17	негативний	0,336	негативний
	20	0,063	негативний	0	негативний	0,19	негативний	0,101	негативний
	21	0,391	слабкопозитивний	23	позитивний	0,91	позитивний	0,703	позитивний
9	22	0,014	негативний	0	негативний	0,54	позитивний	0,102	негативний
10	23	0,489	позитивний	3	негативний	0,81	позитивний	0,421	слабкопозитивний
	24	0,579	позитивний	0	негативний	0,13	негативний	0,401	негативний
Позитивне значення		>0,4		>20		>0,4		>0,450	

В сироватці крові з господарства №4 антитіла до ВРРСС були виявлені лише тест-системою 1, тоді як решта тест-систем показали негативні результати. При використанні тест-системи 3 у двох зразках були виявлені хибно позитивні

результати. тест-система 2 виявилась менш-чутливою до детекції ВРРСС в зразках, що були близькими до значення «cut-off» яке складало 0,4. Необхідно також додати, що отримані при аналазі зразка №11 результати, за використанням тест-систем 2, 3, 4, вказували на даний зразок, як на ВРРСС позитивний, тоді як тест-система 1 показала негативний результат, але близький до значення «cut-off».

Отож, отримані результати вказують на різницю у чутливості всіх комерційних тест-систем, що застосовуються на теперішній час в Україні. Вони підтвердили антигенну відмінність ВРРСС, ізольованого зі східної Європи, у порівнянні з ВРРСС, ізольованими з західній Європі та США.

Чутливість серологічних тест-систем є критичною для отримання результатів, що відповідають дійсності. При використанні тест-системи корейського виробництва можливі хибно позитивні результати. За отриманими даними можна зробити висновок, що найчутливішою до українських ізолятів ВРРСС показала себе тест-система 1, виробництва США. Проте слід зазначити, що використання в Україні тест-системи 2 іспанського виробництва також можливе.

Впровадження ефективних методів діагностики захворювання є одним з інструментів у боротьбі з розповсюдженням ВРРСС серед тварин господарств України. В ході дослідження встановлено оптимальні вікові групи для першого етапу оцінки епізоотичної ситуації у господарстві, а саме: 24 тижні життя тварини. Також оптимізовано вікові групи тварин для проведення серологічного профілювання господарства: 4, 7, 10, 15, 18 та 24 тижні життя тварини. Цей діагностичний підхід необхідний для встановлення динаміки інфекційного процесу (початок інфікування, тривалість, інтенсивність) в умовах господарства.

Визначено, що рівень материнських антитіл має тенденцію до зниження і досягає нульового титру до 4-10 тижнів залежно від їх початкового рівня. Ці данні доповнюють раніше опубліковані результати щодо термінів зниження материнських антитіл. Також була виявлена залежність між терміном інфікування та початковим рівнем материнських антитіл у віці 4 тижні.

Враховуючи високу швидкість поширення, високий рівень варіабельності ВРРСС, неоднорідність клінічних проявів РРСС (в залежності від штаму), та складність розробки схеми вакцинопрофілактики наразі необхідним є комплексний аналіз стану господарств України з метою контролю РРСС в неблагополучних за ВРРСС господарствах, що дасть можливість впровадження ефективних та оптимальних заходів боротьби з ними.

Молекулярно генетичні дослідження ВРРСС. Проведено підбір праймерів для ампліфікації фрагментів геному гену, що кодує нуклеокапсидний білок N, згаданого збудника на основі повних нуклеотидних послідовностей ізолятів ВРРСС, доступних в GenBank. Встановлено положення цих праймерів в нуклеотидній послідовності геному референсного штамму та підраховано рівень гомології нуклеотидних послідовностей праймерів до матричної послідовності. Так, праймери PRRSVp1_Nfor, PRRSVp2_Nrev характеризувалися відповідно 100% та 96,2% рівнем гомології до нуклеотидної послідовності гену нуклеопротеїну ізоляту Gene Bank M96262. Довжина продукту реакції становить 301 п.н. для праймерів PRRSVp1_Nfor, PRRSVp2_Nrev.

Враховуючи високий рівень варіабельності вірусу необхідно зазначити про відмінності в рівні гомології праймерів до матричної послідовності різних ізолятів. Так, рівень гомології праймерів PRRSVp1_Nfor, PRRSVp2_Nrev до нуклеотидної послідовності N-гену ізоляту DQ988980 ВРРСС становив 95,2% та 95,2%, тоді як рівень гомології праймерів до згаданого гену ізоляту CS421743 становив 100% та 95,2% гомології відповідно. Умови підібрані емпірично для даної реакції, що характеризувались високим рівнем специфічності, були наступними: температура гібридизації праймерів становила 58 ºС, а кількість сульфату магнію – 0,75 мкл на зразок.

Була проведена апробація підібраної пари праймерів на зразках референт штаму ВРРСС (GenBank accession no. M96262) та зразку тканини легень від клінічно здорового порося, зразку тканини легень від поросяти, інфікованого ВРРСС (підтвердження інфікування проводилось гістологічним методом) та зразку негативного контролю (рис. 2).

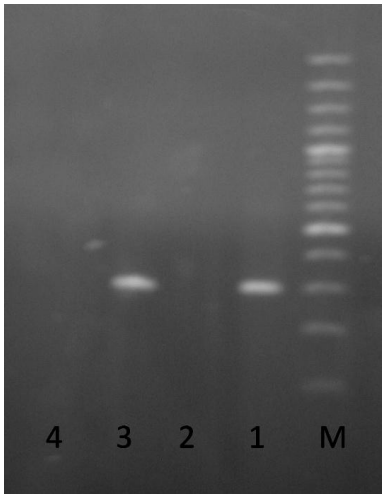

Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації з використанням діагностичної пари праймерів PRRSVp1_Nfor, PRRSVp2_Nrev (продукт реакції 301 п.н.).

1 –референс-штам ВРРСС(код доступу якого в базі даних GenBank M96262*), 2 – зразок легень від клінічно здорової свині, 3 –зразок легень ураженого ВРРСС поросяти, 4 –негативний контроль;М – маркер молекулярних macFermentas, 100 bp*.

Проведення електрофоретичного аналізу продуктів ампліфікації вказало на те, що специфічний продукт реакції, довжиною 301 п.н. був присутній лише в зразку референс-штаму ВРРСС та клінічного випадку РРСС (рис. 3), підтвердженого клінічно, серологічно та гістологічно. Це свідчить про можливість використання даної пари праймерів для виявлення ВРРСС в матеріалі від свиней. Праймери PRRSVp1_Nfor, PRRSVp2_Nrev не гомологічні до ДНК тварини, яку вражає ВРРСС, про що свідчить відсутність специфічного продукту реакції довжиною 301 п.н із зразка клінічно здорової тварини.

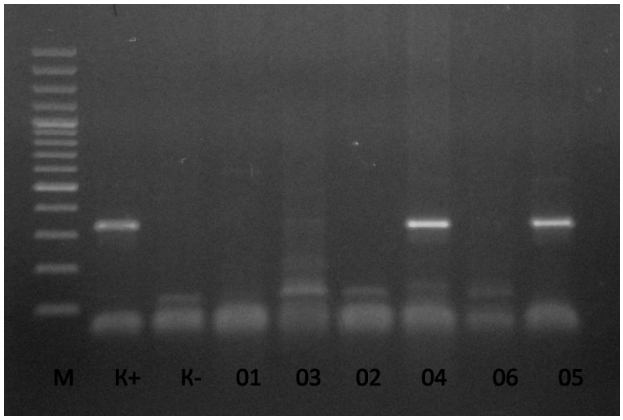

Рис. 3. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами до консервативної ділянки N-гену PRRSVp1_Nfor, PRRSVp2_Nrev (продукт реакції 301 п.н.).

01 – об'єднаний матеріал тканини легень; 02 – об'єднаний матеріал тканини лімфатичних вузлів; 03 – об'єднаний матеріал тканини селезінок групи 1.1; 04 – об'єднаний матеріал тканини легень; 05 – об'єднаний матеріал тканини ліфатичних вузлів; 06 – об'єднаний матеріал тканини селезінок; М – маркер молекулярних macFermentas, 100 bp; К+- позитивний контроль; К- - негативний контроль.

У дослідженнях геному ВРРСС дослідники варіабельності геному збудника показали, що нуклеотидна послідовність гіперваріабельного регіону ORF 5 відрізняється у різних штамів вірусу (Stankevicius at all, 2008), тому її можна використовувати для філогенетичного аналізу різних ізолятів вірусу. Зважаючи на це ми вважали доцільним використання праймерів специфічні до вказаного регіону гену ORF 5.

Була проведена апробація підібраної пари праймерів на зразках референт штаму ВРРСС (код доступу в базі даних Gene Bank M96262) зразку тканини легень від клінічно здорового порося, зразку тканини легень від порося, інфікованого ВРРСС (підтвердження інфікування проводилось за допомогою ЗТ ПЛР з використанням пари праймерів PRRSVp1_NFor та PRRSVp2_NRew) та зразка негативного контролю.

Проведення електрофоретичного аналізу продуктів ампліфікації вказало на те, що специфічний продукт реакції, довжиною 721 п.н. був присутній лише в зразку референс-штаму ВРРСС та клінічного випадку РРСС, підтвердженого методом ПЦР на N-глікопротеїн. Це свідчить про можливість використання даних пар праймерів для виявлення ВРРСС в матеріалі від свиней для подальшого секвенування. Праймери ORF5_F1, ORF5_R1, ORF5_F2 ORF5_R2 не гомологічні до ДНК тварини з ВРРСС, про що свідчить відсутність специфічного продукту реакції довжиною 301 п.н із зразка клінічно здорової тварини.

Наступним етапом в дослідженні було проведення секвенування та філогенетичний аналіз отриманих результатів. З огляду на вищевикладене, нами проведено визначення нуклеотидної послідовності гіперваріабельного регіону гену ORF5 українських ізолятів. Отриману послідовність порівнювали зі штамами зі Східної та Західної Європи, а також вакцинними штамами для встановлення спорідненості між ними та будували філогенетичне дерево за допомогою програми

MEGA 6 (рис. 4). У результаті проведених досліджень було показано, що частина виявлених нами ізолятів вірусу формували окрему групу, та виявляли найвищий ступінь спорідненості з ізолятами з Російської Федерації та Італії.

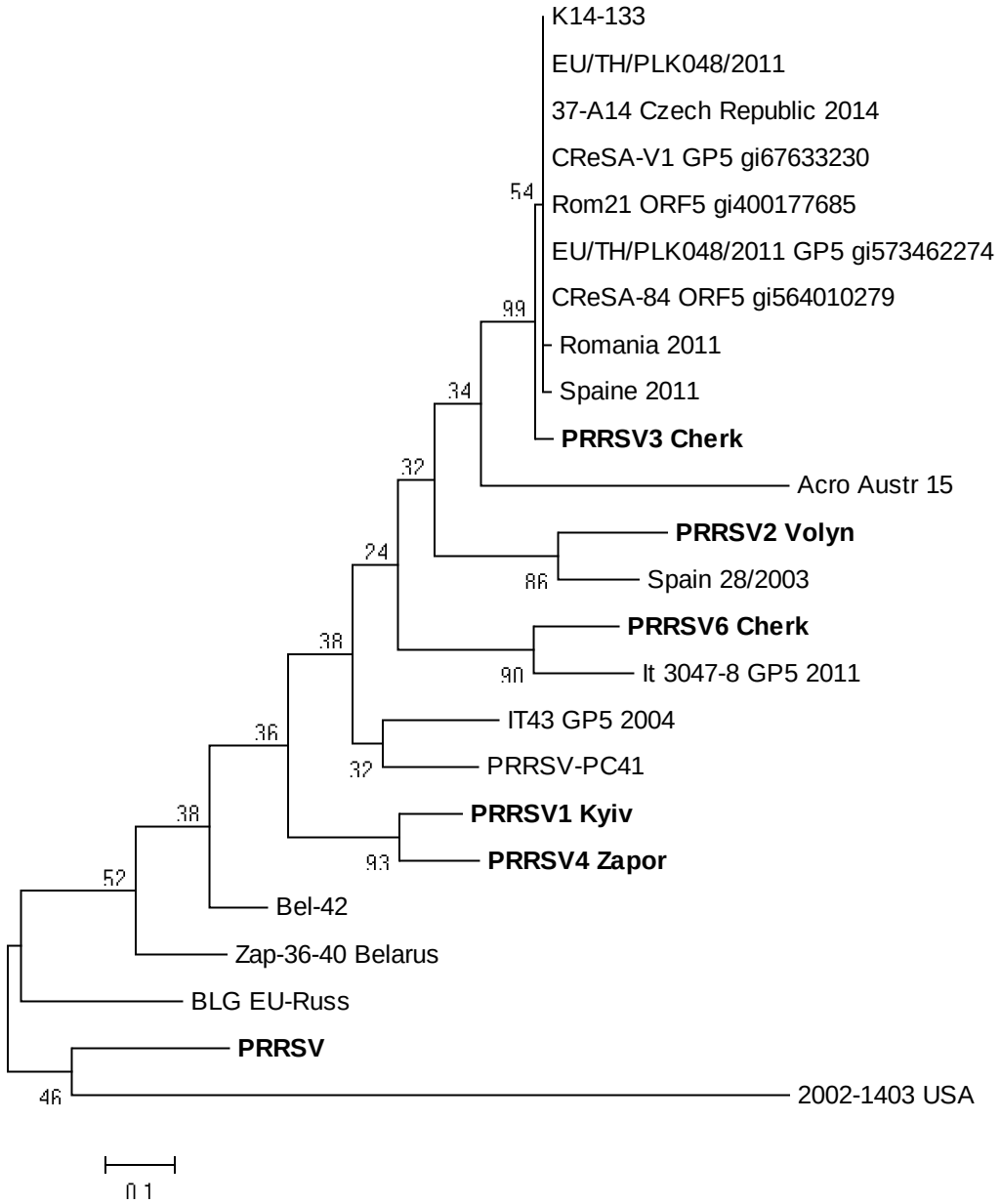

Рис. 4. Філогенетичний аналіз амінокислотних послідовностей гіперваріабельного регіону гену ORF5 українських ізолятів ВРРСС методом максимальної правдоподібності.

Результати секвенування зразка №3 вказують на найбільшу спорідненість до іспанських ізолятів та вакцинного штаму. Генетичний матеріал вірусу детектували з легень від тварини, з характерним для ВРРСС змінами. Також методом гістологічного дослідження виявили характерні для ВРРСС зміни в тканинах органів. Всі ці факти, а також близька спорідненість ізоляту до вакцинного штаму

можуть вказувати на зміни в структурі вакцинного штаму вірусу та його реверсії до дикого типу.

Ізолят №4 має найбільшу спорідненість до італійського та білоруського ізолятів. З точки зору професора з референт-лабораторії по ВРРСС Tomasz Stadejk (усне спілкування), цей ізолят міг виникнути внаслідок розвитку одночасної ВРРСС інфекції двох штамів в організмі однієї тварини. Філогенетичний положення ізоляту №2 вказує на його спорідненість до штамів ВРРСС Іспанії та Італії.

Таким чином, філогенетичний аналіз українських ізолятів чітко ілюструє гетерогенність популяції ВРРСС. Ці данні є першими опублікованими результатами філогенетичного аналізу українських ізолятів ВРРСС. За нашими даними українські ізоляти мають спільне походження зі штамами з Білорусії, Іспанії та Італії.

Гістологічний та імуногістохімічний аналіз тканин тварин інфікованих ВРРСС

Беручи до уваги наявність інших збудників захворювань свиней, що спричиняють схожу до РРСС клінічну картину та необхідність розробки комплексних підходів до диференційної діагностики РРСС були проведені гістологічне та імуногістохімічне дослідження зразків від клінічно хворих тварин з господарств серопозитивних за ВРРСС.

Під час експерименту було досліджено тварин з 32 серологічно позитивних за ВРРСС господарств України. У зразках з 11 ферм виявили характерні цитопатичні зміни в тканинах легень та антиген збудника в тканинах легень, тимусу, лімфатичних вузлів.

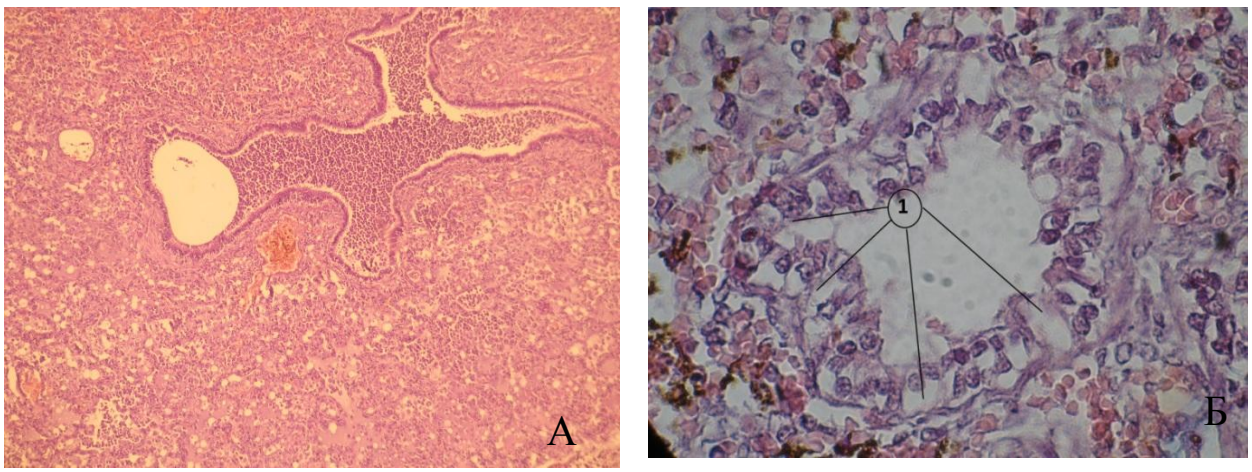

Рис 5. Препарат тканини легень зразка взятого від тварини з клінічними проявами, характерними для РРСС, фарбування еозином та гематоксиліном х100 (А, Г), х400(В), х1000 (Б):

А: Просвіт альвеол заповнений макрофагами та незначною кількістю лімфоцитів; Б: 1 – гіперплазія, гіпертрофія альвеолоцитів другого порядку.

Цитопатичні зміни, спричинені ВРРСС, були зафіксовані в легенях. Були виявлені різного ступеня ураження інтерстиції з характерними макрофагальними інфільтратами, заповненням просвіту альвеол клітинним детритом та макрофагами (рис. 5 А).

Збільшена кількість гіпертрофованих пневмоцитів другого порядку є ще однією ознакою ВРРСС-індукованої інфекції. У нашому дослідженні в усіх пізніше підтверджених методом ПЛР клінічних випадках РРСС була виявлена значна кількість альвеолоцитів другого порядку з ознаками гіпертрофії та гіперплазії, що свідчить про специфічність та показовість цієї ознаки у постановці діагнозу РРСС гістологічним методом дослідження (рис. 5 Б).

Для підтвердження причетності ВРРСС до виникнення патолого-морфологічних змін та унеможливлення хибно позитивних результатів, ми паралельно проводили імуногістохімічне дослідження для виявлення антигену збудника безпосередньо в тканині органів. Антиген ВРРСС у зразках абортованих плодів у найбільшій кількості виявляли в тканині тимусу, поодиноко в легенях (рис. 6). У випадку респіраторного прояву РРСС, найбільшу кількість антигену детектували в легенях та трахіобронхіальних лімфатичних вузлах.

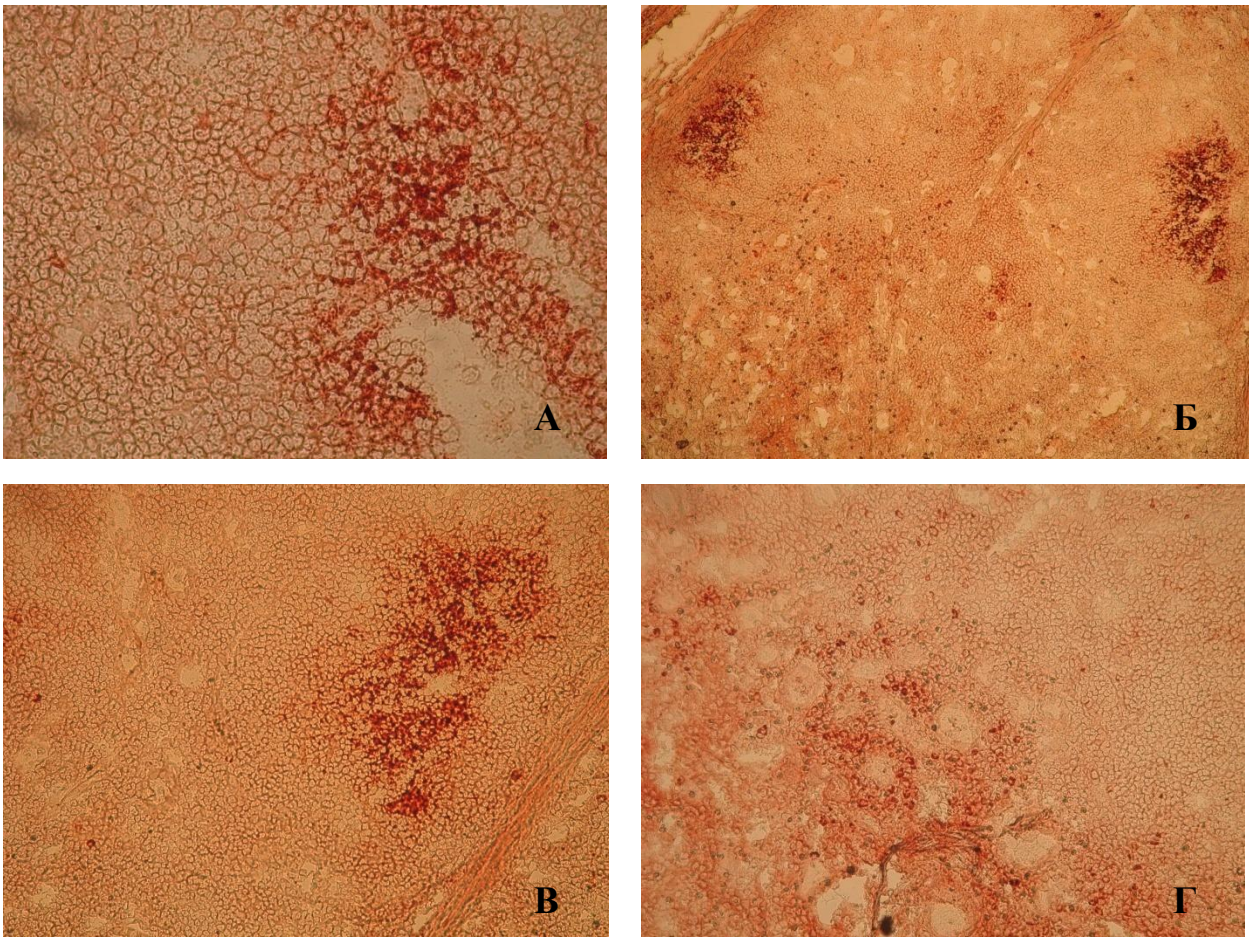

Рис. 6. Препарат зразка тканини тимусу від абортованого плоду свині (А, В) та легень (Б, Г), імуногістохімія х 400 (А), х100 (Б, В), х200 (Г).

Результати наших досліджень вказують на можливість та доцільність використання патоморфологічного дослідження для диференційної діагностики ВРРСС у складних клінічних випадках. Основними патолого-морфологічними змінами при інфікування ВРРСС є наявність гіпертрофії та гіперплазії альвеолоцитів другого порядку, заповнення клітинним детритом та білковим ексудатом просвіту альвеол, потужне збільшення кількості альвеолярних макрофагів у легенях, незначне потовщення інтерстиції легень внаслідок інфільтрації макрофагами. Проте слід наголосити на відсутності певних патоморфологічнихих змін, що вважаються, за раніше опублікованими даними, класичними для ВРРСС, як, наприклад, інфільтрація м'яза серця макрофагами і лімфоцитами та утворення синцитій подібних клітин у паренхімі легень.

ВИСНОВКИ

В дисертації була вирішена науково-практична проблема – досліджені молекулярно-біологічні особливості циркулюючого в Україні ВРРСС, що дозволить оперативно діагностувати збудник, оцінювати епізоотичну ситуацію для впровадження адекватної схеми вакцинопрофілактики, оцінювати ефективність застосованих профілактичних засобів та заходів біобезпеки для попередження розповсюдження ВРРСС територією України.

Основні результати представлені у висновках:

1. Виявлено циркуляцію вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней у 60 господарствах 19-ти областей України. Захворюваність поголів'я свиней на ВРРСС в України за період 2005-2014 рр має тенденцію до зростання. Основними причинами цього є збільшення поголів'я тварин, ввезення тварин із закордону.
2. Встановлення різниці чутливості серологічних комерційних тест-систем до українських ізолятів ВРРСС показали неможливість використання тест-систем корейського та іспанського виробництва. Серед досліджених найчутливішою до українських ізолятів ВРРСС показала себе серологічна тест-система 1 (виробництва США).
3. Встановлено, що для першого етапу оцінки епізоотичної ситуації за ВРРСС у господарстві доцільно проводити дослідження сироватки крові від тварин у віці 24 тижнів (кінець продуктивного періоду).
4. Вперше проведено підбір оптимальних вікових груп для побудови інформативного серологічного профілю за ВРРСС – 4, 7, 10, 15, 18 та 24 тижні життя, результати якого використовуються для розробки та контролю ефективності застосування профілактичних заходів.
5. Для швидкої рутинної діагностики ВРРСС до консервативного фрагменту ORF7 геному вірусу підібрано пару праймерів PRRSVp1_Nfor, PRRSVp2_Nrev. Оптимізовано умови проведення ЗТ-ПЛР: найбільша специфічність реакції спостерігається за температури гібридизації 58°С та концентрації 2,5 мМ магнію сульфату в межах 0,75 мкл.

6. Для проведення філогенетичного аналізу ВРРСС до варіабельного фрагменту ORF5 геному вірусу підібрані дві пари праймерів. Оптимізовано умови проведення ЗТ-ПЛР для ідентифікації та подальшого секвенування генетичного матеріалу ВРРСС у зразках. Найбільша специфічність реакції спостерігається за температури гібридизації 52°С та концентрації 2,5 мМ магнію сульфату в межах 0,75 мкл.
7. Показана різниця у патогенезі на рівні тканини українських штамів ВРРСС, у порівнянні з американськими та західноєвропейськими. Виявлені характерні зміни в тканинах органів тварин уражених ВРРСС на різних стадіях захворювання, що робить можливим використання гістологічного методу для диференційної діагностики ВРРСС у складних клінічних випадках ко-інфекції.
8. Філогенетичний аналіз українських ізолятів ВРРСС доводить гетерогенність їх популяцій, що свідчить про їх різне походження. За нашими даними, українські ізоляти мають спільне походження зі штамами з Білорусії, Іспанії та Італії.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Ivashchenko O.A. The spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Ukraine / O.A. Ivashchenko // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Сер. Біол. – К. – 2012. – Т.62. – С. 9-11. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження за темою статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*
2. Іващенко О. Ефективність використання серологічних тест-систем різних виробників для детекції антитіл ВРРСС, що циркулює в Україні / О. Іващенко, І. Будзанівська, І. Іващенко, В. Поліщук // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Сер. Біол. – К. – 2013. – Т.65. – С. 32-34. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження на тему статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*
3. Іващенко О.А. Контроль вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней за використання методів серологічної діагностики / О.А. Іващенко, І.Г. Будзанівська, І.В. Іващенко, В.П. Поліщук // Агроекологічний журнал. – К. – 2014. –№3. – С. 32-35. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження на тему статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*
4. Бережна Д.С. Оцінка епізоотичної ситуації вірусу хвороби Марека на території України / Бережна Д.С., О.А. Іващенко, В.П. Поліщук // Микробиология и биотехнология. – 2015. – №1 (29). – 14-20. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*

5. Іващенко О.А. Діагностика вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней за допомогою аналізу гістологічних змін тканин органів інфікованих тварин / О.А. Іващенко, І.Г. Будзанівська, І.В. Іващенко // Науковий вісник НУБіП. – Київ. – 2014, №7 (49). – 14 с. – електронний ресурс http://nd.nubip.edu.ua/2014_7/index.html *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження на тему статті, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень)*.
6. Ivashchenko O. Detection of porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus using PCR and immunohistochemistry in the tissues of abortion fetuses / O. Ivashchenko, L. Dudar, V. Polischuk // Науковий вісник НУБіП. – Київ. – 2016, №1 (58). – 14 с. – електронний ресурс – http://nd.nubip.edu.ua/2016_1/ index.html *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*
7. Іващенко О.А. Встановлення часу інфікування тварин вірусом репродуктивного та респіраторного синдрому свиней за цитопатичними змінами в тканинах органів / О.А.Іващенко, О.О. Нечипуренко // Всеукраїнська наукова конференція студентів та молодих вчених : тези доповідей. – Київ, 2011. – С. 34-35.
8. Ivashchenko O.A. The spread of porcine respiratory and reproductive syndrome virus in Ukraine from 2005-July 2012 years // Understanding and combating PRRS in Europe : Third EuroPRRS net conference. – Будапешт (Угорщина), 2012.– P. 74-78.
9. Dudar L.V. Prevalance of PRRSV and PCV 2 associated abortions in Ukraine in 2007-2012 period / L.V.Dudar, O.A. Ivashchenko // Vth European symposium of porcine health management. – Edinburg (UK), 2013. – P.132.
10. Berezhna D. The histoipathological lesions of Mareks' disease virus in poultryof Ukrainian farms / D.Berezhna, O. Ivashchenko, D. Dreval, I. Sobko // VIII World Veterinary Poultry Association : Proceedings. – France, 2013. – P. 218.
11. Іващенко О. А. Ефективність використання серологічних тест-систем різних виробників для детекції антитіл ВРРСС, що циркулює в Україні / О. А. Іващенко, І.В. Іващенко, І. Г. Будзанівська // VII міжнародна конференція «Біоресурси та віруси»: зб. тез. – Київ, 2013. – С. 50.
12. Бережна Д.С. Ідентифікація форм хвороби Марека в птахофабриках України / Д.С. Бережна, О. А. Іващенко // VII міжнародна конференція «Біоресурси та віруси». – Київ, 2013. – С. 47.
13. Іващенко О.А. Використання ІФА для встановлення термінів інфікування, інтенсивності та тривалості інфекційного процесу, зумовленого ВРРСС / О.А. Іващенко, І.В. Іващенко, І. Г. Будзанівська // XIII З'їзд Товариства мікробіологів України: зб. тез – Ялта, 2013. – С. 453.
14. Іващенко О.А. Діагностика вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней за допомогою аналізу гістопатологічних змін в тканинах органів ураженої тварини / О.А. Іващенко, І.Г. Будзанівська, І.В. Іващенко // «Молодь та поступ біології» : X міжнародна наукова конференція: зб. тез. – Львів, 2014. – С. 174-175.

15. Бережна Д.С. Діагностика вірусу хвороби Марека методом гістологічного аналізу з оцінкою тяжкості ураження / Бережна Д.С., Іващенко О.А., Поліщук В.П. // "Молодь та поступ біології" : X міжнародна наукова конференція,-– Львів, 2014. – С. 162.
16. Dudar L.V. Evaluation of Ukrainian experience in control of pig neonatal diarrhea / L.V. Dudar, O.A. Ivashchenko, M. Uhnovsky // VIth European symposium of porcine health management : abstr. – 2014. – P. 97.
17. Ivashchenko O.A. Molecular and biological characteristics of porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV) / O.A.Ivashchenko, D.S. Berezhna, I.G. Budzanivska, I.V. Ivashchenko // Global Virus Networking. – Estonia, 2014.
18. Dudar L.V. / Pathohistology as a diagnostics tool for confirmation of the sudden death syndrome of sows and its frequency and distribution in Ukraine / L.V. Dudar, O.A.Ivashchenk, O. Beh// IPVS.– Cancun, 2014. – P. 108.
19. Ivashchenko O.A. Prevalence of Newcastle disease virus in Ukraine in the period 2011-April 2014 / O.A. Ivashchenko, A.A. Rudenko, I.G. Budzanivska // Epizoone: Xth International Congress of Veterinary Virology : proceedings. Corum Montpellier (France) , 2015. – P. 56.
20. Ivashchenko O., PRRSV: dynamic of spreading in Ukraine, molecular-biological characteristics of Ukrainian isolates / O.A.Ivashchenko, V.P. Polischuk, I.G. Budzanivska, A. Pasturya // Міжнародна конференція «Біоресурси та віруси»: зб. тез. – Київ, 2016. – С. 175-178.

АНОТАЦІЯ

Іващенко О.А. **Ідентифікаця вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней в Україні на основі вивчення його молекулярно-біологічних особливостей** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.06 – вірусологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2016.

У роботі представлено аналіз динаміки поширення вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней в Україні у період з 2005 по 2014 рік. Визначена тенденція його розвитку.

Була проведена розробка та апробація праймерів до консервативної ділянки геному ВРРСС для швидкої рутинної діагностики ВРРСС. Для проведення філогенетичного аналізу ВРРСС до варіабельного фрагменту ORF5 геному вірусу підібрані дві пари праймерів. Оптимізовано умови проведення ЗТ-ПЛР для ідентифікації та подальшого секвенування генетичного матеріалу ВРРСС у зразках. Проведено виділення в Україні місцевих ізолятів вірусу ВРРСС, зроблений їх філогенетичний аналіз. Філогенетичний аналіз українських ізолятів ВРРСС доводить гетерогенність їх популяцій, що свідчить про їх різне походження. Досліджені ізоляти мають спільне походження зі штамами з Росії, Білорусії, Іспанії та Італії.

Показана різниця у патогенезі на рівні тканин ВРРСС українських штамів, у порівнянні з американськими та західноєвропейськими, а саме відсутність певних патоморфологічнихих змін, що вважаються, за раніше опублікованими даними, класичними для РРСС, як, наприклад, інфільтрація м'яза серця макрофагами і лімфоцитами та утворення синцитій подібних клітин у паренхімі легень.

Ключові слова: вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (ВРРСС, вірус РРСС), діагностика ВРРСС, поширеність ВРРСС в Україні.

АННОТАЦИЯ

Иващенко О.А. Идентификация вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней в Украине на основе изучения его молекулярно-биологических особенностей. – Рукопись.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.06 – вирусология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2016.

В работе представлен анализ динамики распространения вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней в Украине с 2005 по 2014 год. Результаты исследований свидетельствуют о быстром распространении ВРРСС территорией Украины. В 2005 году была детектирована циркуляция ВРРСС только в двух областях Украины, а в 2009 – у 19-ти областях. Сравнительный анализа данных по серопревалентности к ВРРСС среди промышленных свиней, домашних свиней и диких кабанов, показал более быстрое распространение вируса среди поголовья именно промышленных животных. Высокий уровень вариабельности ВРРСС является одним из факторов, что значительно усложняют контроль за патогеном, так как это усложняет не только вакцинопрофилактику, но и диагностику ВРРСС. Наблюдается отличие чувствительности серологических тест-систем из-за высокого уровня вариабельности. Мы исследовали эффективность четырёх доступных в Украине серологических тест-систем. Полученные результаты указывают на разницу в их чувствительности. При использовании тест-системы корейского производства возможны ложно позитивные результаты, тогда как тест-система 4 (Испания) может показывать значительное количество ложно негативных результатов, что в свою очередь указывает на нецелесообразность использования данных тест-систем. По полученным результатам можно сделать вывод, что самой чувствительной к украинским изолятам является тест-система №1 (США). Также, следует отметить возможность использовать для диагностики ВРРСС в Украине тест-систему №2 (Испания).

Была проведена разработка и апробация праймеров к консервативной области генома ВРРСС для рутинной диагностики возбудителя. Для проведения филогенетического анализа ВРРСС были подобраны две пары праймеров к высоковариабельному фрагменту генома вируса ORF5. Проведена оптимизация условий проведения ЗТ-ПЦР для детекции и дальнейшего секвенирования генетического материала в образцах. Филогенетический анализ украинских

изолятов ВРРСС был проведен. Его результаты показали гетерогенность популяции, что может указывать на разность происхождения изолятов ВРРСС. Исследованные изоляты показали самый высокий уровень гомологии к штаммам с Российской Федерации, Белоруссии, Испании и Италии.

Показана разность патогенеза на уровне тканей ВРРСС, который циркулирует в Украине, в сравнении с американскими и западноевропейскими.

Ключевые слова: вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней (ВРРСС, вирус РРСС), диагностика ВРРСС, распространенность ВРРСС в Украине.

SUMMARY

Ivashchenko O.A. Identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Ukraine by studying its molecular features – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences, specialty 03.00.06 - virology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2016.

The dynamics of spreading PRSSV in Ukraine during the period 2005-2014 was analyzed. The results show fast tendency of spreading PRRSV.

The exceptional variability of PRRSV and its influence on sensibility of different serological test-systems are well known. The comparison analysis of four serological test kits was made. The research showed considerable difference in its sensibility. This may indicate antigenic difference Ukrainian isolates of PRRSV with those that circulate in Asia, America and West Europe. The design and approbation of primers to conservation region of PRRSV for the future usage in routing diagnostics were made.

Approbation of two pairs of primers to highly variable region ORF5 for farther phylogenetic analysis of PRRSV were held. Ukrainian isolates of PRRSV were isolated and phylogenetic analysis were made. The result of this analysis reviles heterogeneity of the PRRSV population in Ukraine and proves difference in its origin. The isolates, which were studied, showed the highest homology to Russian, Spain, Belorussia and Italy strains.

The difference in pathogenesis of PRRSV circulating in Ukraine compared with American and West European isolates was shown.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), diagnostics of PRRSV, the spread of PRRSV in Ukraine.