

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

На правах рукопису

Іващенко Ольга Андріївна

УДК: 575.86 + 578.832.1

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

03.00.06 – вірусологія

**Дисертація
на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук**

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор
Будзанівська І.Г.

Київ – 2017

ЗМІСТ

	Стор
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1 ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ РЕПРОДУКТИВНОГО ТА РЕСПІРАТОРНОГО СИНДРОМУ СВИНЕЙ	15
1.1 Етіологічний агент репродуктивного та респіраторного синдрому свиней	15
1.1.1 Транскрипційні особливості генів неструктурних білків та характеристика їх протеїнів.	16
1.1.2 Транскрипційні особливості генів структурних білків та характеристика їх протеїнів.	18
1.1.3 Віріон-асоційовані протеїни клітини хазяїна	19
1.1.4 Життєвий цикл вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней	20
1.2 Варіабельність вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней	21
1.3. Патогенез ВРРСС	25
1.3.1 Патогенез ВРРСС на рівні клітини	25
1.3.2. Патогенез ВРРСС на рівні організму	29
1.4. Імунна відповідь організму тварини на ВРРСС інфекцію	31
1.4.1. Гуморальний імунітет	31
1.4.1.1. Протеїни ВРРСС, що беруть участь в інгібіції індукції інтерферону	33
1.4.1.2. Інтерференція ВРРСС з JAK/STAT сигнальною системою	35
1.4.2. Клітинний імунітет	36
1.5. Клінічні прояви репродуктивного та респіраторного синдрому свиней	37
1.5.1. Механізм трансплацентарного інфікування плоду ВРРСС	39
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	41

2.1 Об'єкт дослідження та його характеристика	41
2.1.1. Загальна характеристика об'єкту дослідження	41
2.1.2 Аналіз морфолого-патологічного стану уражених поросят/свиней та відбір зразків для дослідження	43
2.2. Реактиви, матеріали та обладнання, що були використані в роботі	
2.3 Молекулярно-біологічні методи дослідження	46
2.3.1 Конструювання і підбір праймерів для проведення ЗТ-ПЛР	47
2.3.2 Виділення РНК ВРРСС з патологічного матеріалу уражених тварин	49
2.3.3 Постановка реакції зворотної транскрипції	49
2.3.4 Проведення полімеразної ланцюгової реакції	51
2.3.5. Проведення електрофоретичного аналізу продуктів реакцій в агарозному гелі	52
2.3.6 Очищення продуктів ПЛР з агарозного гелю	53
2.3.7. Побудова філогенетичного дерева за допомогою програми MEGA 6.0	53
2.4. Гістологічний метод дослідження	54
2.4.1. Приготування гістологічних зразків	54
2.4.2. Мікроскопіювання і аналіз	56
2.5. Імуногістохімічний метод дослідження зразків тканин	56
2.5.1 Підготовка тканин органів.	56
2.5.2 Процедура проведення реакції	56
2.6. Метод імуноферментного аналізу	58
2.6.1 Приготування реагентів та зразків	58
2.6.2 Процедура проведення реакції	58
2.7. Статистична обробка результатів	59
РОЗДІЛ 3 ПОШИРЕНІСТЬ ВРРРСУ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ ТА ДИНАМІКА ЙОГО РОЗПОВСЮДЖЕННЯ	61
3.1. Характеристика клінічного та морфолого-патологічного стану тварин, відібраних для дослідження	61
3.2. Динаміка розповсюдження вірусу територією України в період 2005 по 2009 р.	64

3.3. Аналіз ситуації за ВРРСС в Україні в період з 2010 по 2014 рр.	67
РОЗДІЛ 4 ОСОБЛИВОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ СЕРОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ У ДІАГНОСТИЦІ ВРРСС	69
4.1. Валідація використання методу імуноферментного аналізу	70
4.1.1. Чутливість та специфічність IDEXX HerdCheck PRRS 3XR ELISA.	70
4.1.2 Точність та повторюваність результатів	72
4.1.3 Міжнародні міжлабораторні порівняльні дослідження	74
4.2 Порівняння чутливості до українських ізолятів комерційних серологічних тест-систем	77
4.3 Використання серологічного моніторингу та особливості інтерпретації результатів	
РОЗДІЛ 5 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ВРРСС	84
5.1 Характеристика праймерів, підібраних для проведення ЗТ-ПЛР з метою діагностики вірусу	84
5.2 Виявлення ВРРСС у патологічному матеріалі органів свиней, в зразках крові, сперми та фаренгіальних змивів	88
5.3 Апробація та вдосконалення умов проведення ПЛР ORF-5	92
5.4 Філогенетичний аналіз ізолятів за ORF-5	97
РОЗДІЛ 6 ГІСТОЛОГІЧНИЙ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ТКАНИН ТВАРИН ІНФІКОВАНИХ ВРРСС	102
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	107
ВИСНОВКИ	127
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	129

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

а.к.з.	-	амінокислотні залишки
АГ	-	Антиген
АТ	-	Антитіло
ДНК	-	дизоксирибонуклеїнова кислота
ЕДТА	-	етилендіамінтетраоцтова кислота
ЗТ	-	зворотня транскрипція
ПЛР	-	полімеразна ланцюгова реакція
п.о.	-	пар основ
РНК	-	рибонуклеїнова кислота
ВРРСС	-	вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней
РРСС	-	репродуктивний та респіраторний синдром свиней
ПА-ВРРСС	-	Північно-Американський ВРРСС
ВП-ВРРСС	-	високопатогенний ВРРСС
ORF	-	open reading frame, відкрита рамка зчитування
NSP	-	неструктурний протеїн
ТИЖ.	-	тижні життя тварини
ЛГК	-	легені
ЛВ	-	лімфатичний вузол
ГС	-	гепарин сульфат
ЕПР	-	ендоплазматичний ретикулюм
ІФА	-	імуноферментний аналіз
UTR	-	нетрансльовані повтори
ГС	-	гепарин сульфат
CD 169	-	сіалоадгезин
гЕПР	-	гладенький ендоплазматичний ретикулюм
kb	-	тисяч пар основ

- HSPA1 - білок 1 теплового шоку
- IDH3A - ізоцитрат дегідрогеназа 3 (NAD⁺) альфа
- NDFUS1 - NAD дегідрогеназа Fe-S протеїн 1
- ANXA2 - алексин A2
- GSTP1 - глутатіон-S-трансферази

ВСТУП

Актуальність. Вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней на теперішній час поширений у більшості країнах-виробниках свинини та продовжує залишатись головною причиною репродуктивних втрат та респіраторних захворювань свиней [1, 2]. На даний момент його вважають економічно одним з найважливіших вірусних патогенів у свинарстві [2]. Це висококонтагіозне захворювання свиней різних вікових груп може проявлятися як гостро, так і субклінічно [3, 4].

Територіальна поширеність ВРРСС, тяжкість його впливу на сприйнятливі популяції тварин, виникнення непередбачуваних надзвичайних епідемічних ситуацій – всі ці факти стали причиною внесення ВРРСС до списку особливо небезпечних захворювань МЄБ [5, 6].

ВРРСС є представником роду *Arterevirus*, родини *Artereviridae*, порядку *Nidovirales*. Аналіз секвенованих нуклеотидних послідовностей та антигенних властивостей показав, що вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (ВРРСС) можна поділити на Північно-Американський (тип 2) та Європейський (тип 1) генотипи, які мають лише 63% ідентичності на геномному рівні [2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14]. Еволюційна мінливість ВРРСС фіксується, як найвища серед РНК вірусів тварин [11, 15, 16]. Так, Dan Liu та колеги експериментально показали високий рівень рекомбінації між двома різними штамами ВРРСС під час одночасного інфікування тварини ними [3, 4]. Високий рівень варіабельності вірусу значно ускладнює постановку правильного діагнозу, вакцинацію та контроль за захворюванням.

Tomasz Stadejek, провів аналіз різних ізолятів вірусу з країн Європи та наголосив на високому рівні варіабельності особливо у Східній Європі навіть за ORF7, що вважається найконсервативнішим геном вірусу [7, 8].

Репродуктивний та респіраторний синдром свиней вперше діагностований в Канаді в 1979 році та швидко розповсюдився в Північній Америці в пізніх 80-тих. В Європі подібний синдром, що був викликаний спорідненим, але генетично відмінним артеревірусом, швидко розповсюдився протягом 1990-1992 років. Серологічні докази також свідчать про те, що вірус ще в 1988 році циркулював у Німеччині [1, 3, 17].

Більш ніж за 10 років вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней розповсюдився в більшості популяцій свиней. Вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней не виявлений лише в Австралії, Новій Зеландії, Норвегії, Фінляндії, Швейцарії та Швеції [1]. Цей збудник визнаний ре-емерджентим, від так, генетичний матеріал ВРРСС був виявлений у Франції, Німеччині, Бельгії, Данії, Іспанії, Італії, Чехії, Латвії, Литві, Росії, Білорусії, Казахстані, Україні, Китаї, Японії, В'єтнамі, Тайланді, США [18, 19, 20, 21].

Беручи до уваги той факт, що поширеність ВРРСС в Україні недостатньо вивчена, виникла необхідність проведення серологічного дослідження для з'ясування ситуації з ВРРСС в Україні.

Вивчення репродуктивного та респіраторного синдрому свиней має велике значення, оскільки дане захворювання може завдати надзвичайних збитків свинарним господарствам. Контагіозність, високий рівень абортів та смертності за згаданого захворювання зумовлює необхідність розробки та застосування експрес-методів діагностики для ідентифікації збудника та запровадження карантинних і профілактичних заходів.

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 за хронічного та персистентного перебігу захворювання, так і у випадку гострого перебігу захворювання. Очевидним є те, що розробка тест-систем на основі ПЛР є

необхідним для швидкої диференційної діагностики ВРРСС, що є надзвичайно важливим для широкого практичного використання. Крім того, лише за допомогою вказаного методичного підходу можливим є виявлення вірусоносійства, що необхідно для успішного контролю за розповсюдженням захворювання [9].

З огляду на значну різноманітність та високу варіабельність штамів ВРРСС, з'ясування походження ізолятів вірусу є необхідним для визначення ступеню їх вірулентності, шляхів зараження тварин. Оскільки для захисту проти різних типів штамів необхідно використовувати специфічні вакцини, аналіз походження виявлених ізолятів є необхідним для адекватної вакцинації тварин. Однією з найваріабельніших ділянок геному ВРРСС є ORF 5, дані про сиквенс якої є найінформативнішим. Це важливо для встановлення філогенетичної спорідненості ізоляту з раніше відомими та для встановлення ступеню гомології з вакцинними штамми для підбору оптимального підходу до вакцинопрофілактики в кожному окремому клінічному випадку. Одним із методів вирішення даної проблеми є відпрацювання тест-системи на основі полімеразної ланцюгової реакції на консервативну ділянку гену ORF 7 для постановки діагнозу та на ORF 5 для подальшого сиквенування вірусу, проте високий рівень варіабельності цієї ділянки геному ВРРСС значно ускладнює виконання цього завдання.

Після постановки діагнозу ВРРСС необхідним наступним кроком є підбір оптимальної схеми вакцинопрофілактики та контроль за ефективністю її застосування. 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.

Враховуючи високу варіабельність nsp-2 регіону ВРРСС в цілому, а також можливість циркулювання на території України ВРРСС з генетичним профілем, характерним для східноєвропейського ВРРСС, постає необхідність

аналізу чутливості серологічних тест-систем, які використовуються в Україні.

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 [22]. Це в свою чергу призводить до розвитку ко-інфекцій, як вірусними так і бактеріальними патогенами. 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 виробіоти України з використанням біоінформаційних технологій» кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, № державної реєстрації 0111U004649.

Мета та завдання дослідження. Ідентифікувати ВРРСС 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 (патолого-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

впроваджені 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, виявив 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, що 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.

РОЗДІЛ 1

Загальна характеристика вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней

Збудником репродуктивного та респіраторного синдрому свиней є РНК-вмісний вірус роду *Arterivirus*, родини *Arteriviridae*, порядку *Nidovirales*. Вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней уражає легені, стінки великих судин легень, лімфатичні вузли, а на пізніх стадіях інфікування - нирки, печінка, мозок, серце свиноматок, хряків та поросят. Клінічно синдром характеризується значним підвищенням кількості абортів на пізніх термінах вагітності, наявністю мертвороджених та ослаблених поросят, зниженням опоросу, гострими респіраторними проявами та високим рівнем смертності поросят [10, 11, 23].

1.1. Етіологічний агент репродуктивного та респіраторного синдрому свиней

Віріон ВРРСС сферичної форми діаметром до 80 нм складається з ізометричного нуклеокапсиду, діаметром близько 25-35 нм. Нуклеокапсид оточений ліпопротеїновою оболонкою, яка формується гранулярним ендоплазматичним ретикулоном, або апаратом Гольджі інфікованих клітин. Вірусний геном представлений одноланцюговою лінійною молекулою (+) РНК, довжиною 15kb [13, 14]. РНК вірусу поліаденільована на 3'-кінці, має 3'- та 5'-UTR (нетрансльовані повтори) [13, 15].

Аналіз нуклеотидних послідовностей та антигенних властивостей показав, що вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней (ВРРСС) можна поділити на Північно-Американський (тип 2) та Європейський (тип 1) генотипи [17, 21, 22, 23, 26], які мають лише 63% ідентичності на геномному рівні [3, 14, 15, 16]. Подібність між двома даними генотипами у відкритих рамках зчитування (ORF) спостерігається наступна:

57-59% ORF7, 70-81% ORF6, 51-59% ORF5, 68% ORF4, 58% ORF3 та 63% ORF2 [17].

Як показано на рисунку 1.1, одноланцюгова (+) РНК репродуктивного та респіраторного синдрому свиней містить 9 відкритих рамок зчитування, що кодують двадцять вірусних білків [13, 27].

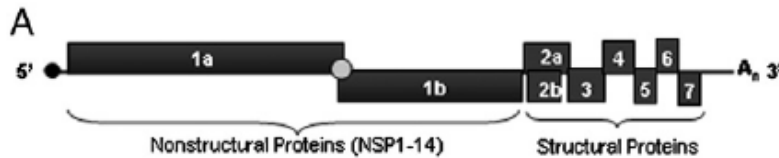


Рис.1.1. Схематичне зображення геномної організації ВРРСС [27].

1.1.1. Транскрипційні особливості генів неструктурних білків та характеристика їх протеїнів

На 5'-кінці геному вірусу знаходяться дві відкриті рамки зчитування (ORF1a та ORF1b), що кодують неструктурні білки, займають близько трьох четвертих геному та експресуються безпосередньо з геномної РНК. Коротка послідовність, в якій ORF1a та ORF1b перекриваються, є специфічною. Разом зі структурою шпильки дана послідовність забезпечує можливість трансляції ORF1b, впливає на синтез ORF1ab поліпротеїну (pp1ab) та ORF1a поліпротеїну (pp1a) [13, 15, 27].

Поліпротеїн pp1a протеолітично розрізається у восьми сайтах. Таким чином формуються дев'ять неструктурних протеїнів (nsp): nsp1 α , nsp1 β , nsp2, nsp3, nsp4, nsp5, nsp6, nsp7, nsp8 [16]. Так, наприклад, nsp1 містить в собі специфічні цистеїнові домени PCP1 α , PCP1 β . PCP1 α необхідний для авторозрізання між nsp1 α та nsp1 β , тоді як для відокремлення nsp1 β від pp1a проходить за участі PCP1 β [16, 28].

Протеолітичне розрізання продукту ORF1b протеїном pp1ab формує неструктурні білки nsp9, nsp10, nsp11, nsp12 [16].

Протеїнам, що були транскрибовані з pp1a, властива протеолітична активність. Продукти трансляції ORF1a (nsp1 α , nsp1 β , nsp2, nsp3, nsp4, nsp5, nsp6, nsp7, nsp8) відповідають за процесінг решти неструктурних білків (nsp),

тоді як протеїни ORF1b (nsp9, nsp 10, nsp11, nsp12) беруть участь у процесах транскрипції та реплікації вірусу [114, 16]. Також, Z.Chen та його колеги показали, що однією із функцій протеїну nsp1 α є інгібіція клітинної продукції інтерферону першого типу та блокування сигнальних шляхів клітини [16, 28]. Nsp1 α є антагоністом інтерферону. Наявність папаїн-подібної цистеїн-протезної активності даного протеїну відграє провідну роль у забезпеченні даної властивості nsp1 [28, 29, 30]. Здатність nsp1 α , nsp1 β взаємодіяти зі складовими імунної відповіді організму вказує на те, що ці два вірусні протеїни є критичними детермінантами вірулентності ВРСС, що відіграють провідну роль в патогенезі вірусу [31, 28].

Ген ВРСС, що кодує неструктурний білок 2 (Nsp2), містить в собі N-термінальну гіперваріабельну послідовність (HV1) та середню гіперваріабельну ділянку (HV2). Довжина HV2 може відрізнятись на 150 амінокислот в залежності від штаму ВРСС. Дві гіперваріабельні ділянки рекомбінантного ВРСС другого типу штаму VR-2332 містять в собі амінокислотну послідовність, що не характерна для синтезу на культурі клітин [32]. Nan та його колеги показали, що цистеїновий домен протеази (PL2) проявляє цис- та транс- активність, розрізає nsp2 - nsp3 конструкцію [33]. PL2 протеаза прямо взаємодіє з протеїнами клітини, бере участь в деубіквінізації протеїнів (убіквілін-декон'югативна активність), що в свою чергу призводить до інактивації однієї із ланок імунного захисту [33, 34]. Nsp2 містить в собі декілька В-клітинних епітопів та індукує В-клітинну відповідь [3, 35]. Ці епітопи можуть бути високоімуногенними [3, 36]. При делеції ES3 домену спостерігається підвищення рівня реплікації вірусу, зниження рівня синтезу інтерлейкіну 1 β та фактору некрозу пухлин α , при цьому рівень синтезу антитіл до ВРСС не змінюється [3, 37].

Дослідники показали протеолітичну активність nsp1, nsp2, nsp11 та їх роль в уникненні імунної відповіді організму [29, 30, 38]. Nsp11 має ендорибонуклеазну активність та містить в собі NendoU домен, активними сайтами якого є His-129, His-144, Lys-173. Саме завдяки ендорибонуклеазній

активності nsp11 інгібує синтез IFN- β , шляхом деактивації TLR3 та RIG-1 сигнальних шляхів [38].

1.1.2. Транскрипційні особливості генів структурних білків та характеристика їх протеїнів

На 3'-кінці вірусного геному знаходиться сім відкритих рамок зчитування (ORF 2a, ORF 2b, ORF 3, ORF 4, ORF 5, ORF 6, ORF 7). Даний регіон кодує чотири мембрано-асоційовані глікопротеїни (GP2, GP3, GP4, GP5, що кодуються субгеномними мРНК 2a, мРНК 3, мРНК 4, мРНК 5), два неглікозильованих мембранних протеїни (М та Е, що кодуються субгеномними мРНК 2b та мРНК 6) та нуклеокапсид (N, що кодується субгеномною мРНК 7) [15, 16].]. Основні властивості структурних білків ВРРСС наведені в таблиці 1.1

Таблиця 1.1.

Структурні протеїни ВРРСС [13].

Протеїн	Розмір (aa)	ORF	мРНК	Функції
Е	67-70	2b	2	малий інтегральний протеїн оболонки
GP2	227-249	2a	2	мінорний глікопротеїн, є частиною GP2/GP3/GP4 гетеротримера
GP3	163-265	3	3	мінорний глікопротеїн, є частиною GP2/GP3/GP4 гетеротримера
GP4	152-183	4	4	мінорний глікопротеїн, є частиною GP2/GP3/GP4 гетеротримера
GP5	199-255	5	5	основний глікопротеїн, несе основні детермінанти для нейтралізації, є частиною GP5/М гетеродимера
М	162-173	6	6	Інтегральний протеїн мембрани, є частиною GP5/М гетеродимера
N	110-128	7	7	Протеїн нуклеокапсиду

Аналіз протеїнів GP2, GP3, GP4, GP5 показав, що GP2 має два потенційних сайти зв'язування гліканів, тоді як у GP3 їх було виявлено сім, GP4 має чотири сайти в чітко визначених позиціях. Глікозилювання протеїнів в різних доменах необхідне для виконання протеїном певних специфічних функцій. Так, наприклад, для глікопротеїну GP5 глікани в

положенні N44 необхідні для синтезу вірусних частинок, тоді як наявність гліканів в положенні N43 та N51 для цього протеїну відповідає за супресію імунної відповіді організму інфікованої тварини (знижує синтез нейтралізуючих антитіл). Глікани в положеннях N42, N45, N131 білка GP3 та N184 протеїну GP2 необхідні для синтезу вірусних частинок; глікозилювання будь-яких трьох сайтів з чотирьох в протеїні GP4 необхідне для відновлення інфекційності ВРРСС, оптимальна взаємодія з CD163 залежить від глікозилювання GP2 та GP4 [39, 40]

Оболонка ВРРСС складається з гетеродимерів та гетеротримерів, які, можливо, обидва відповідають за інфекційні властивості вірусу. Гетеродимер формується з протеїну М та глікопротеїну GP5, які з'єднані між собою дисульфідними зв'язками між консервативними цистеїновими залишками в їх ектодоменах. GP5 протеїн бере участь у проникненні вірусу в клітину шляхом взаємодії з клітинними рецепторами, причетний до інфекційних властивостей вірусу та нейтралізації вірусу [3, 41]. Гетеротример складається з трьох глікопротеїнів GP2, GP3, GP4 [13].

1.1.3. Віріон-асоційовані протеїни клітини хазяїна

В 2010 році Chengwen Zhang та співавтори опублікували відомості про те, що з віріонів ВРРСС було виділено та вдало ідентифіковано 61 віріон-асоційованих протеїнів клітини хазяїна. Ці білки були поділені на декілька груп за своїми функціональними властивостями: протеїни цитоскелету, білки стресу, метаболізм-асоційовані протеїни, глікопротеїни, білки регуляції апоптозу, мембрано-зв'язані кальцій залежні протеїни та інші. Був також проведений аналіз локалізації виділених білків в клітині хазяїна, що показав наявність в цій групі протеїнів цитозолу, ядра, філаментів, цитоплазми, цитоскелету, мембрани, мітохондрій, білків внутрішньої та зовнішньої сторони цитоплазматичної мембрани та тих, локалізацію яких в клітині не виявили. Для більш детального дослідження вченими були вибрані 5 білків (актин, тубулін, алексин A2, S100, HSP27). Було показано, що вищезазначені

протеїни вбудовуються у часточки віріону ВРРСС та, можливо, функціонально беруть участь в життєвому циклі вірусу, патогенезі, вірулентності [42].

1.1.4. Життєвий цикл ВРРСС

В життєвому циклі вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней можна виділити наступні етапи: адсорбція, проникнення, роздягання, транскрипція, трансляція, реплікація, збірка та вивільнення вірусу. На поверхні альвеолярних макрофагів були виявлені три ВРРСС рецептори для проникнення вірусу: гепарин сульфат (ГС), сілоадгезин (CD 169) та CD163 [43, 44]. Початкова взаємодія вірусу з клітиною відбувається за участі ГС. CD 169 бере участь як в прикріпленні, так і в інтерналізації, на посилення якої впливає ГС [43, 45]. N-термінальний домен CD 169 є необхідним та єдиним доменом даного рецептору, що бере участь в процесі адсорбції вірусу [43, 45].

Зв'язування з CD169 – це перший крок в шляху проникнення вірусу до клітини, який включає в себе також участь CD 163. Calvet та колеги показали, що CD163 бере участь у роздяганні вірусу та вивільненні вірусної РНК в цитоплазму [44]. Рецептор CD163 експресується на поверхні легневих макрофагів та дендритних клітин. Саме наявність цього рецептора на поверхні клітини є одним із лімітуючих факторів тропізму ВРРСС. Рівень експресії CD163 прямопропорційно знижується з ростом концентрації мікро-РНК-181 в клітині. Саме через високий рівень мікро-РНК-181 в моноцитах, на їх поверхню не експресується достатня для ВРРСС інфекції кількість CD163 [46, 47]. Ця особливість кореляції рівня мікро-РНК-181 та CD163 може стати ключовим моментом в майбутній розробці препаратів профілактики та лікування ВРРСС. Проникнення ВРРСС також залежне від філамент-ендоцитозного механізму та низького рівня рН, що необхідний для роздягання вірусу [11].

В 2007 році К. Shanmukhappa та колеги показали наявність специфічної взаємодії трансмембранного протеїну клітини CD151 з 3'UTR РНК ВРРСС. Трансмембранний глікопротеїн CD151 містить 4 висококонсервативні трансмембранні гідрофобні домени. При аналізі послідовності білка не було виявлено жодного відомого сайту зв'язування, проте були виявлені послідовності в другому домені, які потенційно могли б бути сайтами РНК-зв'язування. Взаємодія CD151 з 3'UTR РНК ВРРСС може бути використана вірусом для полегшення процесу проникнення в клітину. Під час ендоцитозу, знижується рН в ендосомах, відбувається злиття вірусної оболонки з ендосомою, можливо, за участі CD151. Інша можлива роль даної взаємодії РНК вірусу з трансмембранним протеїном може полягати в процесах доставки рибонуклеопротеїнового комплексу в сайти реплікації вірусу [48].

Матриксні та протеїни оболонки ВРРСС характеризуються як мембрано-асоційовані. Протеїни матриксу накопичуються в ендоплазматичному ретикулумі та взаємодіють з протеїнами оболонки для формування комплексу. Розповсюдження протеїнів нуклеокапсиду першопочатково цитоплазматичне, та накопичуються вони в перинуклеарній області. Через 6 годин після інфікування, білки нуклеокапсиду брунькуються на гладенькому ендоплазматичному ретикулумі та накопичуються в просвіті гЕПР. Збірка віріону починається на ЕПР. Структура нуклеокапсидної оболонки впливає на початок процесу вивільнення вірусу з клітини. Вихід ВРРСС з інфікованої клітини може відбуватись шляхом екзоцитозу або лізису клітини [11].

1. 2. Варіабельність вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней

Як вже зазначалось, збудником репродуктивного та респіраторного синдрому свиней є РНК-вмісний вірус. Для вірусів з даним типом геному характерний високий рівень мутацій у порівнянні з ДНК-вмісними вірусами, оскільки їх вірусні РНК-полімерази не мають корегуючих властивостей при

реплікації. Це пришвидшує темпи еволюції вірусу та сприяє виникненню значної кількості квазівидів.

Ізоляти вірусу прийнято розділяти на Північно-Американський та Європейський генотипи. Генетично різні типи ВРРСС, що практично одночасно з'явилися в Північній Америці та Європі, є однією із загадок сьогодення [15].

За останні 10 років спостерігається стрімкий ріст виникнення нових генетичних варіантів Європейського та Північно-Американського штамів за генами, що кодують як структурні, так і неструктурні білки. Рівень еволюційної мінливості ВРРСС фіксується, як найвищий серед РНК вірусів і сягає $4.71-9.8 \times 10^{-2}$ /сайтів/рік [49, 50, 51]. Мутаційні зміни в генотипі ВРРСС типу 1 виникають повільно, тоді як виникнення більш вірулентних форм ВРРСС типу 2 виникають періодично [19]. Проте дослідження ізолятів ВРРСС типу 1 та 2 показали, що більший рівень штамової різноманітності існує саме серед ВРРСС типу 1 [19, 20].

Існує ряд причин виникнення такої кількості мутацій в геномі ВРРСС. Показано наявність ко-інфікування тварин вірусами двох генотипів ВРРСС одночасно, що може підвищувати рівень еволюційних змін вірусу [24, 51], тому необхідним є вивчення рекомбінації між різними штамми ВРРСС [3]. Також, різноманітності квазівидів сприяє інфікування плодів, в яких відбувається селективний відбір певної вірусної популяції [23]. Необхідно звернути увагу на наявність рекомбінації між дикими та вакцинними штамми вірусів, а також на можливість повернення вакцинного штаму до дикого [21, 52, 53]. З літературних даних відомо, що рекомбінація відбувається в генетично однакових атенуйованому та дикому вірусах [3].

Nsp2 ген має найвищу генетичну різноманітність у геномі ВРРСС. Природні інсерції та делеції рутинно виникають в центральному регіоні гену або біля N-термінального повтору Nsp2 протеїну дикого ВРРСС [3, 54, 55]. Тому nsp2 ген став однією з ділянок геному, дослідження якої використовують для моніторингу еволюції вірусу [54, 56]. Відтак, для

прикладу, Bin Li та колеги при дослідженні nsp2 китайських ізолятів виявили 4 делеції в даному гені [54]. Високий рівень варіабельності зафіксований також в ORF5 [3]. Варіабельність ORF5 візуалізує надзвичайну генетичну різноманітність ВРРСС [18], ORF3 також є варіабельною ділянкою геному ВРРСС [3].

Stadejek та колеги запропонували, що з урахуванням поліморфізму розміру ORF7 та філогенетичного групування можна робити висновки про приналежність ізоляту до того чи іншого кластеру ВРРСС [21, 57].

Dan Liu та колеги показали, що частота рекомбінації між різними штамми ВРРСС в ділянках ORF5, ORF3 та Nsp2-кодуючій ділянці становить 10,51%, 11, 64% та 27,27% відповідно. Рекомбінація виникає, коли два штами вірусу інфікують одну клітину та обидва реплікують субгеномні РНК протягом вірусної реплікації [3]. Кожен життєздатний рекомбінантний вірус повинен бути конкурентоздатним з вихідними вірусними штамми та іншими рекомбінантами [3]. Необхідно також зазначити, що рекомбінації в геномі ВРРСС виникають випадковим чином [3].

За літературними даними, в Японії наявна циркуляція ПА-ВРРСС, що належать до п'яти різних кластерів, також показана динаміка поширення ВРРСС різних кластерів на території країни. Відтак, в 1992-1993 роках виявлено ВРРСС кластерів 1 та 3, тоді як в 2000 – 2001 в господарствах Японії були виявлені ВРРСС, що відносяться до кластерів 1,2,3,4,5 [58].

В квітні 2006 року в Китаї зафіксували епідемію синдрому лихоманки свиней (атипового ВРРСС), що охопила 11 провінцій країни. Вірус характеризувався, як високовірулентний, висококонтagioзний, з нетиповими клінічними проявами та патологічними змінами, що значно ускладнило встановлення етіології захворювання [15, 59, 60]. В охоплених захворюванням провінціях були виділені тридцять три ізоляти вірусів та проведено аналіз структурних та неструктурних білків. У всіх ізолятів була виявлена унікальна зміна в неструктурному протеїні nsp2, що є потенційно фактором вірулентності [27]. В цьому протеїні було знайдено дві делеції:

відсутній лейцин в 482-й позиції та відсутні 29 амінокислот в позиціях від 534-562 [27, 60].

В 2007 році була зафіксована епідемія атипового ВРРСС у В'єтнамі та повторну епідемію ВРРСС у Китаї. Виділивши 5 ізолятів вірусу в різних провінціях країни, було проведено їх повний сіквенс та порівняння з китайськими ізолятами. Було встановлено 99% ідентичність до високовірулентного ВРРСС, що викликав епідемію захворювання в 2006 та 2007 роках в Китаї [42].

Загалом, після епідемії синдрому лихоманки свиней в Китаї, було проведено низку досліджень в різних країнах світу на наявність змін в *nsp2*. Так, делеції в гені, що кодує даний протеїн, було виявлено в США, Китаї, Японії, Данії, В'єтнамі, Тайланді [15, 27, 42, 60].

В Тайланді було відібрано 9 ізолятів ВРРСС другого типу (2007-2008 рр) в центральних провінціях країни. Також на дослідження був взятий один ізолят 2001 року. Було проведене сіквенування геному ізолятів та виявлені чисельні делеції в гені, що кодує *nsp2*. Ідентичність ізолятів вірусів, які були відібрані з одного регіону, сягала від 77-99.7% та 68.1-99.5% за нуклеотидною та амінокислотною послідовностями відповідно. Порівняльний аналіз секвенованих геномів виділених ізолятів з нуклеотидною послідовністю, кодуючою *nsp2* китайського ізоляту SY0608, показав від 69.6% до 75.6% ідентичності. Філогенетичне дерево також вказує на мінімальність генетичної спорідненості вірусів [12].

Також в Тайланді було порівняно ORF5 послідовність 11 зразків вірусів, що були відібрані протягом 2001-2008 років в господарствах з проблемами ВРРСС. Було встановлено певні відмінності в даній кодуючій послідовності досліджуваних ізолятів вірусу [12].

Дослідження, що були проведені в Кореї в 2009 році, які включали в себе аналіз ізолятів вірусу ВРРСС з 1999 по 2008 роки, показали, що в країні персистує 4 основних субгрупи ВРРСС другого типу, що філогенетично споріднені, проте мають значні відмінності по ORF5 [17].

До 2010 року вважалось, що ORF7 є найконсервативнішим геном ВРРСС. Його широко використовували в діагностиці захворювання ВРРСС в тест-системах, побудованих на методі ЗТ-ПЛР та ПЛР в реальному часі [8]. Проте зараз вже показано високий рівень варіабельності ORF7 ВРРСС в Європі. В Східній Європі, було виділено 4 основні субгрупи за даним геном [7, 8].

Рівень варіабельності також досліджували шляхом ЗТ-ПЛР зразків повітря, що були відібрані навколо 4 великих комерційних комплексів по утриманню свиней. Результати показали, що в усіх випадках, гетерогенна популяція ВРРСС була присутня у господарстві : від вісьми до чотирнадцяти штамів ВРРСС було детектовано в одному місці. Навіть у господарстві з низькою густиною утримання свиней вісім штамів ВРРСС було детектовано. Це є важливим в розрізі двох речей: високої концентрації вірусу в повітрі та можливість його передачі здоровій тварині, а також можливі проблеми з перехресним захистом вакцинованих свиней, що інтродуються в господарство. Відтак, вакциновані гетерологічним штамом ВРРСС свині можуть не мати захисту від усіх штамів ВРРСС, що циркулюють у господарстві [61, 62, 63, 64].

Відомостей про українські ізоляти ВРРСС та рівень гетерогенності вірусу в Україні не існує. Враховуючи активне ввезення поголів'я як з Європейських країн, так і з країн колишнього СРСР, і їхню виключну генетичну різність, в Україні можливе виникнення зовсім нових штамів збудника, що може значно різнитися як в патогенезі, так і в можливості його ефективної діагностики та профілактики [65].

1.3. Патогенез вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней

1.3.1. Патогенез ВРРСС на рівні клітини

Хіао та колеги в своїх дослідженнях ідентифікували різну експресію генів протеїнів макрофагів легень, інфікованих атипичним ВРРСС (китайський

тип-високопатогенний ВП-ВРСС) та Північно-Американським ВРСС (ПА-ВРСС), які філогенетично є спорідненими. Було ідентифіковано 45 протеїнів, які беруть участь в різних біологічних процесах та сигнальних шляхах. Було виділено декілька напрямів змін, що викликає ВРСС в інфікованій клітині: зміни в будові цитоскелету та клітинних взаємодіях, відповідь на стрес, зміни в редокс-реакціях та метаболізмі, регуляція апоптозу [42, 62].

При інфікуванні, віріони або субвірусні нуклеопротеїнові комплекси транспортуються з поверхні клітини до сайту вірусної транскрипції та реплікації. Віруси використовують дві стратегії для внутрішньоклітинного транспорту: транспортні шляхи цитоплазматичної мембрани або прямо взаємодіють з цитоскелетом клітини [68]. В легенях, інфікованих ВРСС, зафіксовано зміни у восьми протеїнах цитоскелету та міжклітинних взаємодій. Так, у інфікованих ВП-ВРСС наявні зміни в рівні концентрації актин-гамма 1 та кератин 79, тоді при інфікуванні тварини ПА-ВРСС спостерігаються зміни в концентрації філамін альфа, ламін А/С, анексин А1 та кофелін 1. Наявна вища концентрація віментину в клітинах легень, інфікованих ПА-ВРСС, порівняно з інфікованими ВП-ВРСС, тоді як концентрація езрину та ламіну А/С є значно нижчою. Це вказує на те, що ВП-ВРСС та ПА-ВРСС використовують цитоскелет для поширення вірусної інфекції [67, 69, 70].

При інфікуванні тварини ПА-ВРСС спостерігається різке зниження синтезу білка філамін А в чутливій клітині на 96-ту годину після інфікування, порівняно з нормою. До 186-ти годин після інфікування спостерігається незначне збільшення синтезу даного протеїну, порівняно з 96-ти годинним інфікуванням. Цей феномен можна пояснити як вірусним механізмом керування так і використанням протеїну для поширення інфекції [69].

Перебіг інфекційного процесу викликаний ВРСС характеризується також зміною кількості білків стресу. Було виявлено три таких протеїни:

білок 8 теплового шоку 70 кДа (HSPA8, HSP70), білок 1 теплового шоку 27 кДа (HSPA1) та стрес-індукований-фосфопротейн 1. Значне збільшення концентрації HSPA8 та його найвищий рівень збільшення синтезу порівняно з іншими білками при інфікуванні ВП-ВРРСС, свідчить про важливу роль цієї сполуки в організації протеїн-протеїнових взаємодій в клітині. HSP70 може бути задіяний в патогенезі ВП-ВРРСС та, як специфічний шаперон, може захищати клітину від апоптозу [69].

Значно знижений рівень синтезу протеїну HSPA1 при інфікуванні ПА-ВРРСС в уражених легенях на 96-ту годину після інфікування (порівняно з контрольними зразками), та його незначне збільшення на 186-ту годину після інфікування може свідчити про те, що HSPA1 задіяний в патогенезі ПА-ВРРСС. Також недостача термотолерантності повинна сприяти знищенню інфікованих клітин шляхом апоптозу. Це може бути одним з шляхів захисту організму хазяїна від вірусної інфекції [67, 69].

В інфікованих ВП-ВРРСС легенях наявні чотири різні протеїни, що беруть участь в редокс-реакціях та метаболізмі, серед яких ізоцитрат дегідрогеназа 3 (NAD⁺) альфа (IDH3A), NAD дегідрогеназа Fe-S протеїн 1 (NDFUS1) та алексин A2 (ANXA2). Зміна рівня глутатіон-S-трансферази (GSTP1) спостерігається при інфікуванні ПА-ВРРСС. Спільною характеристикою для обох штамів є зміна концентрації в легенях супероксиддисмутази 1, великої P0, рибосомальних протеїнів [67, 69].

Отож, для кожного етапу розвитку захворювання, викликаного вірусом репродуктивного та респіраторного синдрому свиней, характерні специфічні біохімічні зміни в інфікованій вірусом клітині (рис. 1.2.).

Підсумовуючи вище сказане, зміни в експресії генів деяких протеїнів цитоскелету можуть бути чітким знаком наявності реорганізації цитоскелету, яка необхідна для розмноження вірусу та його збірки. Крім того, спостерігається різниця експресії генів протеїнів захисту від вірус-індукованих стресів (оксидативний, тепловий та токсичний) в залежності від штаму збудника – ПА-ВРРСС чи ВП-ВРРСС. В макрофагах легень,

інфікованих ВП-ВРРСС спостерігалась провідна роль HSPA8, ARHGA29, NDUFS1, тоді як у інфікованих ПА-ВРРСС клітин спостерігалась найвища концентрація протеїнів DDAH2, HSPB1, FLNA. Це може свідчити про різний вірусний патогенез та різну відповідь клітин хазяїна на інфікування В-ВРРСС чи ПА-ВРРСС [58, 69, 72].

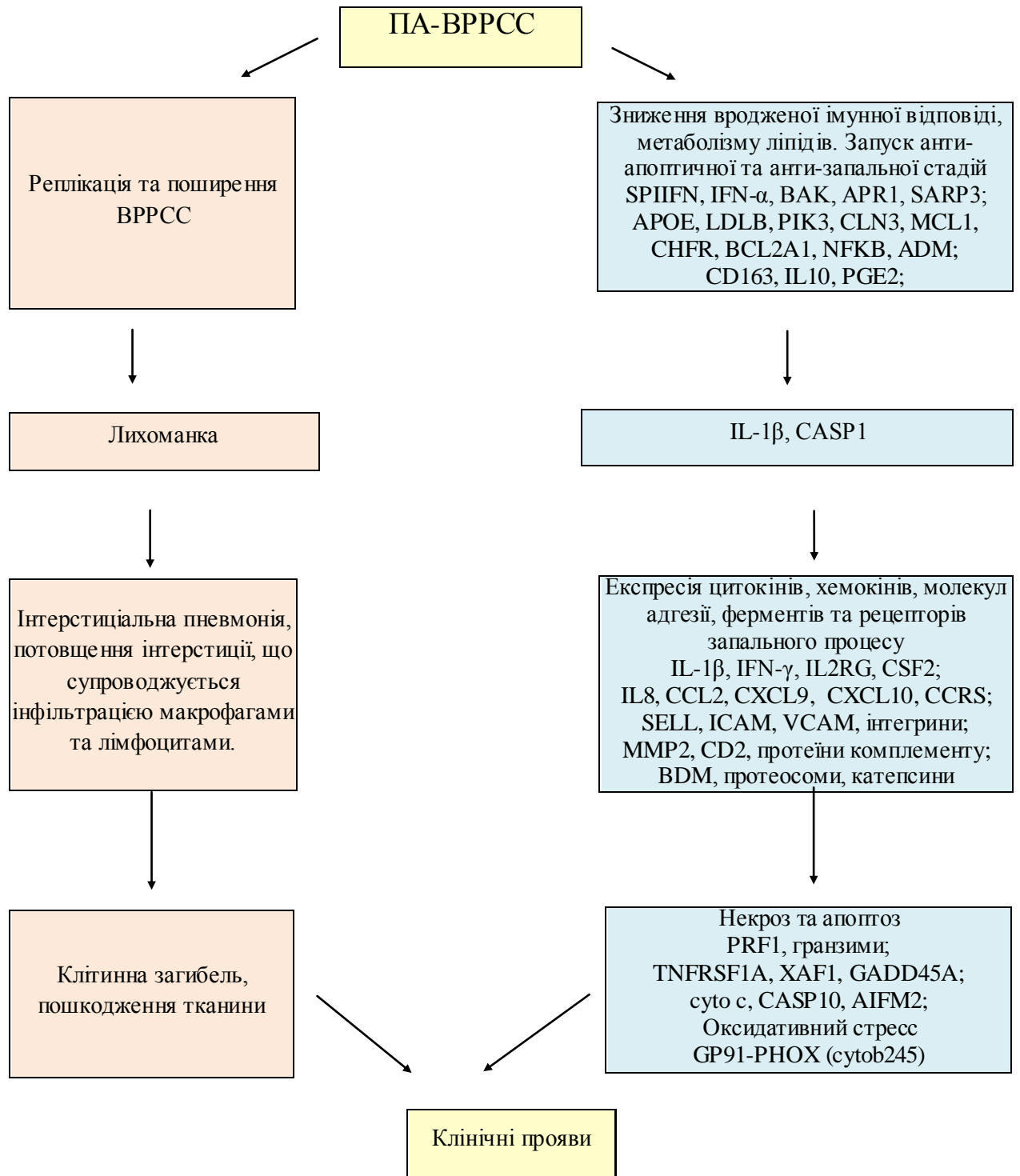


Рис 1.2. Схематичне зображення зміни експресії генів клітин, інфікованих ВРРСС, на різних етапах патологічного процесу, викликаних дією ВРРСС.

При інфікуванні тварини ВРРСС типу 2 спостерігається також вищий рівень продукції прозапальних цитокінів у порівнні з інфекцією, викликаною ВРРСС типу 1. Це може пояснити виникнення більш гострих респіраторних проявів у тварин, інфікованих ВРРСС типу 2 [23].

1.3.2. Патогенез ВРРСС на рівні організму

Дослідження К.Д. Rossow та співавторів стали показовими в розумінні патогенезу ВРРСС на рівні організму. Методом імуногістохімічних досліджень на різних етапах інфікування тварин було підтверджено та уточнено шлях та швидкість поширення вірусного агента по організму хазяїна. Антиген ВРРСС був виявлений в легенях, серці, мигдаликах, мозку та в носових раковинах експериментально інфікованих свиней [71, 73].

Вхідними воротами для ВРРСС є слизова оболонка дихальних шляхів хазяїна. Первинна реплікація вірусу відбувається в місцевих макрофагах з наступною віремією та поширенням в регіональні лімфоїдні тканини. ВРРСС має тропізм до макрофагів та дендритних клітин [11, 46]. Антиген ВРРСС був знайдений в регіональних макрофагах різних тканин, а також в інших типах клітин, включаючи м'язову тканину [11].

В бронхіальних епітеліальних клітинах, артеріальних ендотеліальних клітинах, моноцитах та інтерстиціальних макрофагах АГ-ВРРСС був виявлений в 12 годин, на 1-й, 2-й та 3-ій дні після інфікування та на 5-ий день після інфікування в інтерстиціальних та альвеолярних макрофагах. В ендотеліальних клітинах, моноцитах та макрофагах (інтерстиціальних, альвеолярних, інтраваскулярних) було виявлено АГ - ВРРСС на 7-й, 14-й, 21-й д.п.і., але інтенсивність пофарбування та розповсюдження була значно вищою в 14-й т 21-й д.п.і. [68, 74].

Також, АГ-ВРРСС був виявлений в назальному епітелії слизової оболонки через 12 годин після інфікування та знову на 14-й, 21-й день після ураження тварини збудником. Цікавою особливістю є наявність вірусу в ендотелії судин легень, тоді як в ендотеліальних клітинах судин інших

органів АГ-ВРРСС не було виявлено. Експериментально було встановлено наявність динамічної взаємодії між двома клітинними типами (популяції макрофагів та ендотеліальних клітин судин), що може полегшувати реплікацію ВРРСС. АГ-ВРРСС був виявлений на культурі клітин моноцитів та ендотеліальних клітин артерій, проте не спостерігався в артеріальних ендотеліальних клітинах, що інкубувались без присутності моноцитів. Була зафіксована реплікація ВРРСС в моноцитах *in vitro* [74].

Ще одним цікавим фактом, пов'язаним з ВРРСС, є наявність явища персистенції ВРРСС в організмі хазяїна. Докази існування даної властивості вірусу базуються на різних дослідженнях. Так, методом ЗТ-ПЛР була виявлена ВРРСС-РНК в спермі експериментально заражених хряків в 92 д.п.і., тоді як конкурентний зразок крові був негативний на ВРРСС-РНК [11].

Другий дослід на підтримку існування персистенції ВРРСС був проведений ще в 1996 році Albina M., Madec F. та колегами. Тварини, що не мали контакту з ВРРСС та були вільні від інших видів патогенів, були зведені в одне приміщення з серонегативними за ВРРСС свинями, які попередньо (за 22 тижні до цього) були експериментально заражені вірусом. У свиней, що не мали контакту з ВРРСС до з'єднання даних груп тварин, утворились АТ до ВРРСС та за 1-2 тижні спостерігались клінічні ознаки характерні для РРСС [11].

При аналізі ротоглоткових зішкрябів методом ЗТ-ПЛР ВРРСС був виділений на 70-й, 84-й, 157-й, 134-й д.п.і. після останнього виділення вірусу з крові інфікованих тварин, що також свідчить про наявність явища персистенції збудника в організмі тварини [11, 74].

ВРРСС персистує в інфікованих свинях у життєздатному стані. Збудник може не стимулювати утворення АТ та ВРРСС може бути виявлений значно пізніше в крові, ротоглоткових зішкрябах та спермі, раніше інфікованих тварин [11, 68].

Отож, першопочатково вірус проникає в організм чутливої тварини через епітелій верхніх дихальних шляхів, макрофаги мигдалин, макрофаги

легень, епітлій бронхів та призводить до віремії через 12 годин після інфікування, що в свою чергу викликає розвиток міокардитів, енцефалітів, васкулітів та некрозу лімфоїдної тканини [74, 75, 76].

1.4. Імунна відповідь на ВРРСС інфекцію

Взаємодія між вірусом та імунною системою хазяїна достатньо складна і ще досі є прогалини в розумінні цілісності цього процесу. Проте вже достеменно відомо, що ВРРСС проявляє імуносупресивну дію, що значно ослаблює вроджений захист організму та значно знижує ефективність адаптивної імунної відповіді [77]. ВРРСС уповільнює напрацювання нейтралізуючих антитіл та клітинний імунітет. Основною клітиною-мішенню є альвеолярні макрофаги, що відіграють критичну роль в імунному захисті. Для того, щоб ефективно інфікувати клітину хазяїна, у ВРРСС існує декілька стратегій інтерференції з імунною системою хазяїна [78].

Перший імуносупресивний вплив, зумовлений ВРРСС можна детектувати вже через дві доби після інфікування. Декілька досліджень показали, що основною для ВРРСС особливістю впливу на імунну систему хазяїна є зниження синтезу інтерферону першого типу [79] та спостерігається зменшення на 50% цитоксичності Т-кіллерів [80], що призводить до зниження рівня вродженого імунітету, послаблення або ж уповільнення напрацювання адаптивної імунної відповіді.

1.4.1. Гуморальний імунітет

Антитіла до N протеїну можна детектувати не раніше, ніж через 7 днів після інфікування, через 14 днів після інфікування в сироватці крові наявні антитіла до М протеїну, і через 72 дні антитіла до вірусного GP5 протеїну. Слід зазначити, що реактивність антитіл зменшується зі збільшення гетерогенності між штамми ВРРСС [81]. Польові дослідження показали, що поява цієї надійної імунної реакції на початку інфекції не захищає від

подальшого зараження, як це визначено в експериментах [81]. Отже, ранні антитіла не виконують захисну роль проти ВРРСС інфекції [77].

Вірус нейтралізуючі антитіла з'являються на третьому – четвертому тижні після інфікування тварини. Зазвичай, їх титр низький навіть на пізніх стадіях розвитку інфекції. Нейтралізуючі властивості цих антитіл були показані на альвеолярних макрофагах *in vitro*, принаймні для гомологічних штамів вірусу [81]. Було показано також, що при пасивній імунізації тварин (введення саме нейтралізуючих антитіл) спостерігався дозозалежний захист від інфекції [82]. Рівень нейтралізуючих антитіл може прямо впливати на тривалість та рівень розвитку ВРРСС віремії [77, 83]. Специфічність антитіл відіграє найважливішу роль в ефективності протидії ВРРСС інфекції [84].

Первинними рецепторами впізнавання РНК вірусів є Toll-подібні рецептори (TLRs) та RIG 1-подібні рецептори (RLRs). З TLRs рецепторів вірусну РНК можуть детектувати TLR3, TLR7, TLR8 [78]. З родини RLRs рецепторів для противірусного імунітету значну роль відіграють RIG-1 та MDA-5 [85]. Впізнавання RLRs, TLRs та подальше активування цих сигнальних шляхів призводить до активації інтерферон регулюючих факторів IRF3, IRF7, NF- κ B. Ці фактори активації транскрипції індукують синтез інтерферону першого типу та експресію прозапальних цитокінів. Виявлено 39 функціональних генів інтерферону першого типу в хромосомах 1 та 10 [86].

ВРРСС чутливий до інтерферону першого типу. Чутливість вірусу була доведена *in vitro* та *in vivo*. Обробка альвеолярних макрофагів інтерфероном альфа призводить до значного зниження ВРРСС активності [78]. Попередня обробка клітин інтерфероном бета призводить до значного зниження активності реплікації ВРРСС [87]. У свиней, що були попередньо інфіковані рекомбінантним аденовірусом для експресії інтерферону альфа, та через добу інфікованих ВРРСС, спостерігались менші клінічні та патологоанатомічні прояви. Також значно пізніше розвинулась віремія та відповідно напрацюванн антитіл до ВРРСС у порівнянні з контрольною групою [16].

Саме через таку критичну роль інтерферону у ВРРСС в процесі еволюції розвинулась низка систем інтерференції з інтерфероном хазяїна.

В клітинах легень з високим рівнем реплікації ВРРСС не детектується інтерферон альфа. Рівень індукції синтезу інтерферону альфа при ВРРСС інфекції в 159 разів нижчий у порівнянні з респіраторним корона вірусом [78]. Рівень супресії синтезу інтерферону альфа прямо корелює з рівнем реплікації інтерферону в клітині.

1.4.1.1. Протеїни ВРРСС, які беруть участь в інгібіції індукції інтерферону

Серед протеїнів ВРРСС, що належать до антагоністів інтерферону, виокремлюють nsp1, nsp2, nsp11 та N (табл. 1.2., рис.1.3.). Показано, що nsp 4 інгібує інтерферон бета промотер [88]. Механізм цього процесу мало вивчений та потребує додаткових досліджень.

Таблиця 1.2.

Протеїни ВРРСС, які інтерферують з синтезом та сигналінгом інтерферону [78]

Вірусний протеїн	Місце впливу	Механізм
nsp1 (nsp1 and nsp1)	індукція інтерферону	Інтерференція з IRF3 фосфорилуванням та ядерною транслокацією
		Інгібування IRF3 асоціацію з СВР протеїном та посилення деградації СВР
		Дерегуляція IRF3
nsp1	Інтерферон-активуючий сигналінг	Блокування STAT1/STAT2 ядерну транслокацію через індукцію KPNA1 деградації
nsp2	індукція інтерферону	Блокування IRF3 фосфорилування та ядерної транслокації
		Інтерференція з ІкВ поліубіквітинізацією та запобігання деградації
nsp11	індукція інтерферону	Блокування IRF3 фосфорилування та ядерної транслокації
		Деградація IPS-1 мРНК
N	Індукція інтерферону	Блокування IRF3 фосфорилування та ядерної транслокації
	Інтерферон-активуючий сигналінг	Блокування STAT1/STAT2 ядерну транслокацію через індукцію KPNA1 деградації

Вплив nsp1 на імунну систему вивчений більш детально (табл. 1.2, рис 1.3.). Відтак nsp1 аутопротеолітично розрізається на два білки nsp1-альфа та nsp1-бета. Продукти аутопротеолізу інгібують експресію інтерферону бета через вплив на IRF сигнальний шлях [89]. Крім та співавтори показали, що nsp1 інгібуює асоціацію IRF3 з CBP в ядрі але не впливає на фосфорилування та транслокацію IRF3 [90].

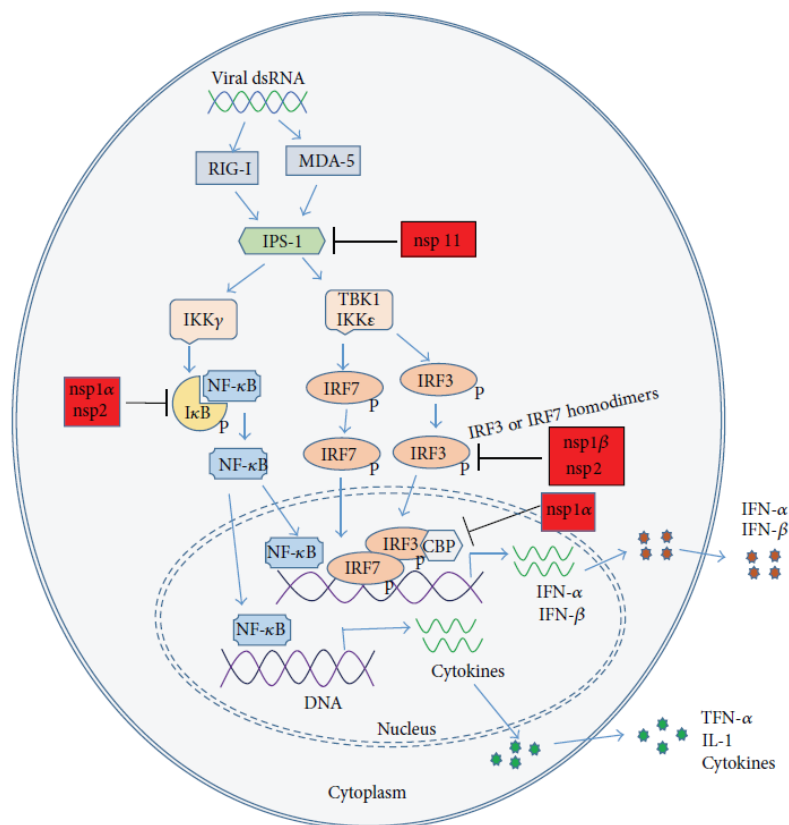


Рис 1.3. Взаємодія інтерферону першого типу з протеїнами ВРРСС. Блоки червоно кольору показують які сигнальні молекули інгібують протеїни ВРРСС [78, 91].

Реплікація nsp1 також впливає на СВР деградацію. Прямі взаємодії nsp1 з СВР не виявлено [90]. Веуга та колеги показали, що nsp1 бета інтерферує з IRF3 шляхом інгібуння фосфорилування та IRF3 ядерної транслокації [88]. Такі відмінності в даних науковців можливі внаслідок різності структури nsp1 бета, використаних у дослідженнях. Відтак у Веуга та

колег nsp1 бета відрізнялась на 27 амінокислотних основ від nsp1 бета, використаного в дослідженнях Kim та колег.

Іншим вірусним протеїном, що блокує IRF3 шляхом інгібіції його фосфорилування та транслокації в ядро є nsp2 (табл. 1.2, рис 1.3). Цей протеїн також інтерферує з NF-κB синальним шляхом. nsp11 є ендонуклеазою [92] та антагоністом інтерферону [88]. Ендонуклеазна активність nsp11 інгібує індукцію інтерферону бета дволанцюговою РНК. Також nsp11 інгібує фосфорилування IRF3. N протеїн інгібує фосфорилування та ядерну транслокацію IRF3, які активуються через дволанцюгову РНК.

Таким чином як ранні (nsp), так і пізній (N) протеїни беруть участь в дерегуляції імунної системи, що може відігравати значну роль на різних стадіях розвитку інфекції ВРРСС. Узагальнена схема впливу протеїнів вірусу на інгібіцію синтезу інтерферону наведена на рисунку 1.3.

1.4.1.2. Взаємодія ВРРСС з JAK/STAT сигнальною системою

Для розвитку протівірусного імунітету важливою є сигналінг інтерферону, що запускається через взаємодію інтерферону першого типу з рецепторами на поверхні клітини. Ця взаємодія інтерферону з рецептором активує JAK, що в свою чергу фосфорилує STAT1 та STAT2, після чого утворюється гетеротример ISGF3 [93]. Саме транслокація цього гетеротримера до ядра та його зв'язування з консенсусною послідовністю ДНК призводять до експресії ISGs, беруть участь в протівірусному захисті [78].

ВРРСС інгібує JAK/STAT сигнальну систему та ISG експресію [78, 94]. Транскрипція ISG15, ISG56, STAT2 значно знижується, ядерна транслокація гетеродимеру STAT1 та STAT2 блокується під час ВРРСС інфекції (рис. 1.4).

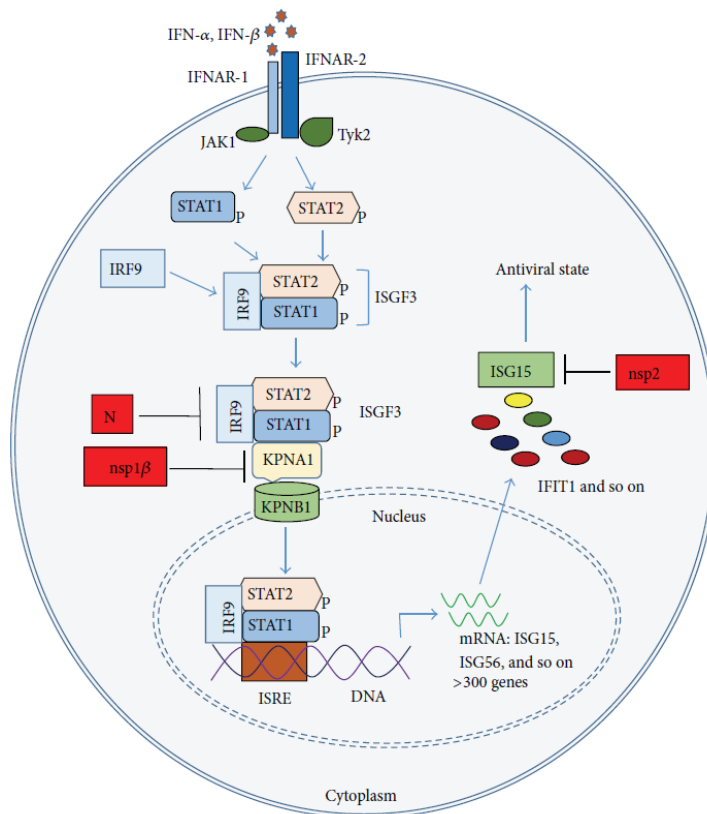


Рис. 1.4. Шлях дерегуляції JAK/STAT сигнальної системи вірусом PPRCC. Блоки червоно кольору показують які сигнальні молекули інгібують протеїни BPPCC[78,].

В процесі дерегуляції вищевказаної сигнальної системи беруть участь одразу декілька вірусних протеїнів: nsp1 бета, nsp7, nsp12, GP3, N. nsp1 бета блокує ядерну транслокацію STAT1 та значно інгібуює експресію ISGs [56]. nsp1 деградує каріоферин-альфа, який бере участь в імпорті IRSG3 до ядра [95]. N протеїн інгібуює STAT1 ядерну транслокацію, проте менш ефективно у порівнянні з nsp1 бета [78, 94].

1.4.2. Клітинний імунітет

В інфікованих BPPCC тварин спостерігалось уповільнення розвитку клітинної імунної відповіді. Імунна відповідь у свиноматок, вакцинованих двічі живою вакциною зі штаммом MLV BPPCC, була порівняна з такою у невакцинованих свиноматок. У невакцинованої від BPPCC групи

спостерігалась вища антиген-специфічна проліферація CD 8⁺ та CD 4⁺ Т-клітин у порівнянні з вакцинованими [91]. Продемонстровано зниження кількості вірус-специфічних гамма інтерферон секретуючих клітин протягом трьох місяців, як у тварин після вакцинації, так і в природньо інфікованих. Нормалізація кількості вищезгаданих клітин спостерігається через 6 місяців після інфікування та вакцинації [96]. Т-клітинна ВРРСС-специфічна імунна відповідь також низька [97].

1.5. Клінічні прояви репродуктивного та респіраторного синдрому свиней

Клінічні прояви інфікування ВРРСС варіюють в залежності від вірулентності вірусу, імунного статусу стада та віку інфікованих тварин [табл.1.3.]. Хвороба, що клінічно проявляється, є наслідком віремії та трансплацентарного проникнення вірусу, що особливо важливо в третьому триместрі супоросності [10, 11].

В інфікованих ВРРСС поросят групи «відлучення» також спостерігаються характерні клінічні ознаки. До них відносяться втрата апетиту, як наслідок втрата ваги, апатія, наявність проблем респіраторного характеру, гіперемія шкірних покривів, грубий волосяний покрив та значне збільшення рівня смертності від вторинних бактеріальних інфекцій [10].

У тварин груп відкорму, хряків, ремонтних свинок ВРРСС зазвичай проявляється короткочасною лихоманкою та втратою апетиту [10, 11, 98, 100].

Розповсюдження, інфікування вірусом репродуктивного та респіраторного синдрому свиней та індукування абортів варіює від спорадичних абортів до масованих абортів в стаді. 15% батьківського стада може уникнути інфекційного процесу, викликаного ВРРСС, що призводить до персистенції вірусу в популяції [9, 11].

Таблиця 1.3.

Клінічні прояви інфікування тварин вірусом репродуктивного та респіраторного синдрому свиней у залежності від віку [10, 98, 99].

	Вікова група			
	Свиноматки	Трансплацентарне інфікування плоду	Новонароджені поросята	Поросята групи відлучення
Клінічні прояви	1.Зниження апетиту	1.Мертвонароджені поросята	1.Нерівномірне дихання	1.Втрата апетиту
	2. Лихоманка	2.Муміфіковані поросята	2.тахіпное	2.Апатія
	3. Гіперемія шкіри	3.Різного розміру, малі, слабкі поросята	3. Кон'юнктивіт	3.Втрата ваги
	4.«Важке» дихання	4. Частково аутолізований плід	4. набряк повік	4.Проблеми респіраторного характеру
	5.Ранній опорос або аборти	5.Хемозис поросята	5. Посиніння вушних раковин	5.Гіперемія шкіри
	6.Смертність свиноматок до 10%	6.Висока смертність до відлучення	6. Шкірна еритема	6.Грубий волосяний покрив
	7.Атаксія, падають на один бік	7.Атака на один бік	7. Діарея.	7. Значне збільшення рівня смертності від вторинних бактеріальних інфекцій.
	8.Агалактія	8.Агалактія	8. Тремор	
	9.Почервоніння чи посиніння вух та вульви	9.Почервоніння чи посиніння вух та вульви	9.Порушення коагуляції крові	
		10. Порушення діяльності ЦНС		

Загалом процес інфікування ВРРСС у стаді можна умовно розділити на два етапи. На першому етапі (гостра фаза захворювання) відбувається інфікування свиноматок ВРРСС, тривалість якого близько двох тижнів, спостерігаються характерні клінічні прояви: летаргія, різка втрата апетиту та ін. (Рис 1.5.). Захворювання швидко розповсюджується в стаді за 7-10 днів. Друга фаза інфікування розпочинається внаслідок трансплацентарного проникнення вірусу [99, 100]. На рисунку 1.5. схематично проілюстровано етапи розвитку інфекції, зумовленої ВРРСС.

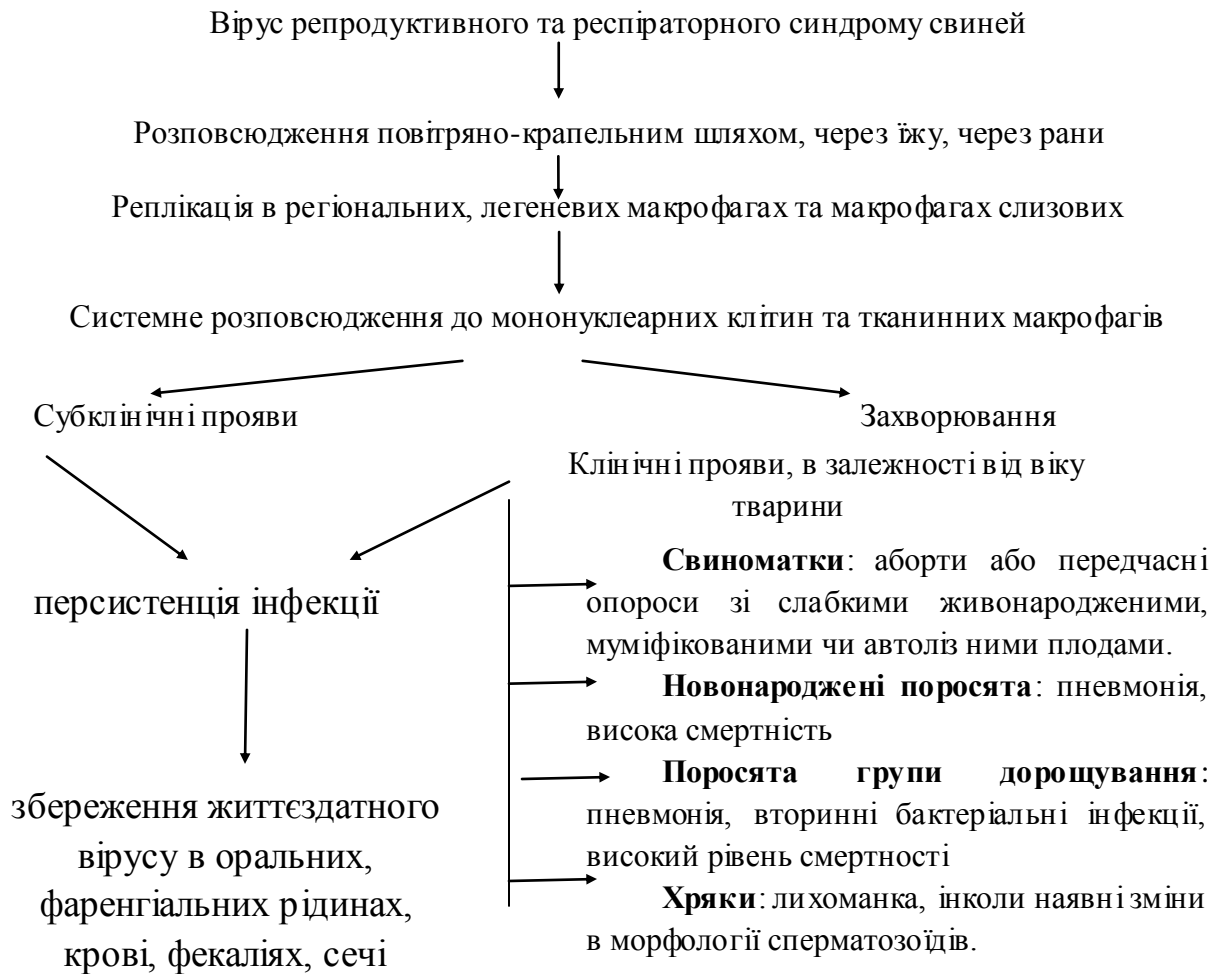


Рисунок 1.5. Схематичне зображення патогенезу вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней, за Rossow [11, 68, 74, 76].

1.5.1. Механізм трансплацентарного інфікування плоду ВРРСС

В 2011 році було запропоновано гіпотетичну модель виникнення абортів та муміфікованих плодів внаслідок інфікування плодів. Відтак, ВРРСС реплікується в макрофагах, що локалізуються периваскулярно в ендометрії. Потім з материнськими макрофагами ВРРСС інфікує плаценту плоду, в макрофагах якої відбувається активна реплікація вірусу. Через кров ВРРСС у вільному стані та в асоціації з макрофагами потрапляє у внутрішні органи плоду [101]. Ця стадія захворювання характеризується репродуктивними проблемами на пізніх етапах вагітності та може тривати від місяця до чотирьох. Поросята, що вижили в період вагітності та в неонатальну фазу

часто стають вразливими до інфекції після відлучення (Рис 1.5.1.). [21, 100, 101, 102].

При трансплацентарному інфікуванні плоду спостерігається низка клінічних ознак таких як мертвонароджені поросята, муміфіковані поросята, слабкі малі поросята різного розміру, частково аутолізовані плоди, високий рівень смертності поросят технологічної групи «відлучення» [10, 23, 98, 99]. Оскільки реплікація вірусу відбувається лише в макрофагах, то вірус не здатен інфікувати плід до появи чутливих до нього клітин [101].

Отже, гостра інфекція у свиноматок, як показано на рисунку 1.5. характеризується зниженням апетиту, лихоманкою, гіперемією шкіри, ранніми опоросами та абортами. Також, у інфікованих ВРРСС тварин даної вікової групи були зафіксовані атаксія, «важке» дихання та рівень смертності до 10 %. Необхідно підкреслити, що при гострому інфекційному процесі, етіологічним агентом якого є ВРРСС, дана група клінічних ознак може проявлятися деякими із вищезазначених симптомів або ж всіма відразу [10, 75, 76, 98, 99, 100].

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження та його характеристика

2.1.1. Загальна характеристика об'єкту дослідження

Об'єктом дослідження був вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней, виділений зі зразків тканин від свиней на території України. Для відпрацювання умов проведення ПЛР та виділення вірусу відбирали свиней чотирьох вікових груп з господарств України. Як представників I вікової групи відбирали поросят до двох тижнів, з II вікової групи відбирали поросят від двох до п'яти тижнів. Як представників III вікової групи відбирали орофаренгіальні змиви, кров, абортвані плоди від свиноматок, з IV вікової групи відбирали (триразово) сперму хряків. Загалом було відібрано по 5 особин кожної вікової групи в кожному з господарств, загальна кількість свиней для дослідження становила 40 особин (Табл.2.1.)

Таблиця 2.1.

Зразки відібрані для відпрацювання ПЛР дослідження

Вікова група. Область	Біологічний матеріал для дослідження					
	Лгк*	Сел**	ЛВ***	Сперма	Кров	Змиви****
Поросята 1-2 тижневого віку. Київська обл.	+	+	+	-	-	-
Поросята 1-2 тижневого віку. Дніпропетровська обл.	+	+	+	-	-	-
Поросята 3-5 тижневого віку. Київська обл.	+	+	+	-	-	-
Поросята 3-5 тижневого віку. Дніпропетровська обл.	+	+	+	-	-	-
Свиноматки. Київська обл.	-	-	-	-	+	+
Свиноматки Дніпропетровська обл.	-	-	-	-	+	+
Хряки . Київська обл.	-	-	-	+	-	-
Хряки. Дніпропетровська обл.	-	-	-	+	-	-

*Лгк – легені; **Сел – селезінка; ***ЛВ - лімфатичний вузол;

****орофаренгіальні змиви

При відборі тварин враховували клінічні ознаки захворювання, характерні для кожної вікової групи [101]. Таким чином, трупи тварин та відібрані зразки крові, змивів та сперми поміщали у спеціальні контейнери з холодогеном. Час транспортування зразків до лабораторії не перевищував 12 годин.

Для виявлення рівня антитіл до ВРРСС відбирали зразки сироватки крові від тварин різних технологічних груп: супоросні та холості свиноматки, хряки та поросята різного віку. Зразки сироватки крові відбирали з різних господарств від тварин основного стада та від хряків. Біологічний матеріал доставляли в термо-контейнерах з льодом. Об'єм кожного зразка становив 3мл. При відборі зразків фіксували необхідну інформацію: клінічні прояви, технологічні особливості господарства, вік тварини, назва господарства, область. Для дослідження відібрали 97213 сироваток крові від тварин зі 242 господарств 24 областей України за період 2005-2014 рр

Для визначення динаміки рівня антитіл в залежності від віку відбирали парні сироватки крові від тварин з 5-ти господарств України (з Дніпропетровської, Донецької, Запорізької та 2 ферми з Київської областей) у віці 4, 7, 10, 15, 24 тижні для проведення імуноферментного аналізу (ІФА) для виявлення антитіл до ВРРСС. Необхідну інформацію (клінічні прояви, технологічні особливості господарства, вік тварини, назва господарства, область) вносили у супровідний документ при відборі зразків на дослідження.

Для дослідження патогенезу ізолятів ВРРСС, що циркулюють в Україні, на гістологічне дослідження відбирали тканини органів від тварин з характерними для ВРРСС клінічними проявами та патологоанатомічними змінами. Для безпосереднього виявлення антигену ВРРСС методом імуногістохімії відбирали секційний матеріал легень та лімфатичних вузлів тварин. Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження тканин органів здійснювали у випадку виявлення характерних патолого-морфологічних змін у тканинах органів.

Для підтвердження ВРСС, як причини абортів свиноматок на гістологічне дослідження відбирали тканини органів (легень, серця, нирок, печінки, селезінки, мозку, тимусу) абортіваних плодів третього семестру супоросності свиноматок, мертвонароджених. Паралельно проводився відбір зразків (секційний матеріал легень та плаценти) від всіх вищевказаних зразків для безпосереднього виявлення генетичного матеріалу збудника в патологічному матеріалі.

Для виявлення ВРСС у хряків триразово відбирали зразки сперми з різницею в часі не менше двох тижнів.

2.1.2. Аналіз патологоанатомічного стану уражених поросят/свиней та відбір зразків для дослідження

Аналіз патологоанатомічного стану відібраних поросят/свиней проводили з метою виявлення і опису зовнішніх ознак захворювання. Після цього проводили розтин трупів, фотографування макроскопічних змін досліджуваних зразків, відбір патологічного матеріалу для наступних досліджень. За виявлення таких проявів як інтерстиціальна пневмонія, набряк парехіми легень, крововиливи в легенях, в комплексі з гіперемією шкіри, грубим волосяним покривом, почервонінням чи посинінням вух та вульви у тварин старших трьохтижневого віку, а також набряк повік, посиніння вушних раковин, порушення коагуляції крові у новонароджених поросят проводили відбір патологічного матеріалу для наступних молекулярно-біологічних та гістологічних досліджень.

Для гістологічного дослідження відбирали матеріал від мертвонароджених поросят, абортіваних плодів, поросят I та II вікових груп без ознак автолізу та той, що не підлягав замороженню. Для гістологічного дослідження відбирали зразки 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. Об'єкти з видимими патологічними змінами тканин (пухлини, крововиливи, некроз, анемічність тканини) відбирали на межі з нормальними частинами, щоб були захоплені здорові і змінені ділянки. Відбір патологічного матеріалу проводили за допомогою пінцету та гострих інструментів (хірургічні ножиці, скальпель). Розмір відібраних зразків становив 2-4 см. Відібрані зразки одразу переносили в 10% розчин формаліну. Контейнер з відібраними зразками маркували: дата відбору зразку, номер супровідного документу. Для молекулярно-біологічних досліджень відбирали зразки легень та лімфатичних вузлів, які поміщали в пластикові чашки Петрі та переносили в холодильник на -20°C .

Для відпрацювання умов проведення ПЛР з парами праймерів 1 та 2,3 використовували генетичний матеріал ВРРСС, надісланий в рамках програми міжнародних порівняльних досліджень.

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

Реактиви та матеріали:

- 2,5 М NaOH (Sigma, США);
- набір для виділення РНК та ДНК «Рибо-сорб» (Амплісенс, Росія), до складу якого входять: лізуючий розчи, розчин для відмивання 1, розчин для відмивання 3, розчин для відмивання 4, сорбент, РНК-буфер;
- набір для виділення РНК та ДНК «MagVet Universal Isolation Kit», до складу якого входять розчини N1, M1, NM2, NM3, NM4, NM6 та NM LSI Beads;
- набір реактивів для проведення зворотної транскрипції «Реверта-L» (Амплісенс, Росія), до складу якого входять: RT-G-mix 1, RT-mix, ревертаза (MMLv), ДНК-буфер;

- набір реактивів для виявлення антитіл до ВРРСС у сироватці крові на основі комерційної тест-системи IDEEX, до складу якої входять розчин для промивки (wash concentrate), розчин для розведення сироваток крові (sample diluents), сироватки крові з антитілами до ВРРСС (PRRSV-positive control) та без антитіл до ВРРСС (Negative control), антитіла до імуноглобуліну G свиней (Anti-Porcine IgG: HPRO conjugate);

– набір реактивів та матеріалів для проведення ПЛР: суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (10 мМ dNTP-mix(Thermo Scientific, Литва), DreamTaq ДНК-полімераза (5 од ак/мкл) (Thermo Scientific, Литва), 2,5 мМ магнію хлорид (Thermo Scientific, Литва), легкоплавкий віск для ПЛР (Амплісенс, Росія);

–ендонуклези рестрикції: Eco911 (Thermo Scientific, Литва), MboI (Thermo Scientific, Литва), SacI (Thermo Scientific, Литва), MvaI (Thermo Scientific, Литва), SspI (Thermo Scientific, Литва), BspMI (Thermo Scientific, Литва);

– агароза для електрофорезу (Thermo Scientific, Китай), етідіум бромід (Sigma, США), барвник (6X Orange Loading Dye) (Thermo Scientific, Литва), маркер молекулярних мас «O`GeneRuler 50 bp DNA Ladder» (Thermo Scientific, Литва);

–набір для виділення ДНК з агарозного гелю «mi-Gel Extraction Kit» (Metabion, Німеччина), до якого входять буфер для екстракції, буфер для відмивання, пластикові колонки із сорбентом;

–матеріали та реактиви необхідні для фіксації паталогічного матеріалу та приготування мікрозрізів: формалін 37 % («чда», Росія), спирт 96 % (ВАТ ВВП «Укрзооветпромстач», Україна), О-ксилол («чда», Україна), парафін - Paraffin type 6 (Richard-Allan Scientific, США);

– барвники еозин-Ү та гематоксилін (Richard-Allan Scientific, США), середовище для фіксування гістологічних зрізів – Mounting Medium Glue (Richard-Allan Scientific, США), імерсійна рідина (Richard-Allan Scientific, США);

Буферні розчини: ПЛР-буфер (10X DreamTaq Green Buffer, 10X DreamTaq Buffer) (Thermo Scientific, Литва); буфер для ендонуклеаз рестрикції (10X Fast Digest Buffer) (Thermo Scientific, Литва); трис-боратний буфер (ТБЕ, Амплісенс, Росія).

Обладнання:

–ламіна́рний бокс 2 класу біологічної безпеки (Telstar, Іспанія), бокс абактеріального повітряного середовища (Lamsystems, Росія), екстрактор нуклеїнових кислот «Bead Retriever» (Invitrogen, США), термостат для мікропробірок на 25-100°C (Биоком, Росія); вакуумний відсмоктувач (Biosan, Росія), мікроцентрифуга «MiniSpin» (Eppendorf, Німеччина); центрифуга-вортекс (Биоком, Росія); автоматичні мікродозатори на 2,5, 10, 20, 100 та 1000 мкл (Eppendorf, Німеччина), термоциклер (ампліфікатор) (Eppendorf, Німеччина); камера для горизонтального електрофорезу (Scie-Plas, США); ультрафіолетовий транслюмінатор для перегляду гелів (Vilber Lourmat, Німеччина);

–станція попередньої обробки та проведення тканин STP-120 (Microm, Німеччина), мікротом HM 340-E (Microm, Німеччина), ножі для гістологічних досліджень Sec-130 (Microm, Німеччина), станція транспортування зрізів та водяна баня (Microm, Німеччина), станція заливки парафіну EC-350 I (Microm, Німеччина), кріоблок EC350 II (Microm, Німеччина), мікроскоп світловий люмінесцентний Axioskop 2 plus (Carl Zeiss, Німеччина), мікрохвильова піч (Samsung, Корея), цифровий фотоапарат (Cannon, Японія), пластикові касети Turboflowe (Microm, Німеччина);

- Columbiawasher (TCAN), Reader (TCAN), термостат (miniarticV2).

2.3. Молекулярно-біологічні методи дослідження

2.3.1. Конструювання і підбір праймерів для проведення ЗТ-ПЛР

Для виявлення генетичного матеріалу вірусу РРСС 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) [75].

2.3.2. Виділення РНК ВРРСС з патологічного матеріалу уражених тварин

Першим кроком для виділення РНК із патологічного матеріалу була підготовка робочого місця. Даний етап здійснювали за допомогою 70% розчину етилового спирту, яким обробляли поверхні робочої зони. Для досліду використовували вільні від РНК-аз та ДНК-аз наконечники з аерозольним бар'єром.

В якості патологічного матеріалу використовували легені та лімфатичні вузли масою 0,5 г. Відповідні органи гомогенізували за допомогою стерильного скла з додаванням 0,5 мл холодного фізіологічного розчину. Виділення проводили в стерильних мікропробірках та хімічно-чистими скляними паличками. Отриманий гомогенат центрифугували при 10 тис.об./хв. протягом 3 хвилин.

Виділення нуклеїнових кислот здійснювали за допомогою двох наборів реагентів для ручного (Рибо-сорб) та автоматичного виділення (MagVet Universal Isolation Kit).

Виділення за допомогою набору «Рибо-сорб» проводили наступним чином. Відбирали необхідну кількість пробірок, їх маркували та в кожену додавали по 450 мкл лізуючого розчину. В пробірки з лізуючим розчином додавали по 100 мкл гомогенату тканин, використовуючи носици з аерозольним фільтром. В кожену пробірку додавали по 25 мкл сорбенту, після чого вміст пробірок перемішували за допомогою вортексу та залишали їх у штативі для осідання сорбенту на 10 хв. Далі осаджували сорбент за 10 тис.

об./хв протягом 30 сек. Надосадову рідину видаляли вакуумним відсмоктувачем. Після цього проводили відмивання сорбенту. На першому етапі відмивання у пробірки із осадженим сорбентом додавали по 400 мкл розчину для відмивання 1, ресуспендували сорбент на вортексі, центрифугували проби за 10 тис. об./хв протягом 30 сек. та видаляли надосадову рідину вакуумним відсмоктувачем. Наступні етапи відмивання здійснювались за такою ж схемою. Для другого та третього етапу відмивання у пробірки додавали по 500 мкл розчину для відмивання 3, для четвертого етапу додавали 400 мкл розчину для відмивання 4. Потім пробірки з відмитим сорбетом поміщували у термостат за температури 60 °С на 10 хв. для підсушування. Після цього здійснювали елюцію нуклеїнових кислот. Для цього у проби додавали по 50 мкл РНК-буферу, перемішували їх на вортексі, поміщували в термостат за температури 60 °С на 5 хв. та центрифугували протягом 90 сек. за 13 тис. об./хв.. Надосадову рідину, що містила РНК та ДНК відбирали у попередньо підготовлені пробірки та зберігали за температури -20 °С.

Для автоматичного виділення нуклеїнових кислот використовували екстрактор «Bead Retriever» та набір реагентів «MagVet Universal Isolation Kit». Спочатку у штатив для екстрактора поміщали пластикові стріпи на 5 лунок. Далі до лунок вносили реагенти як вказано в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Порядок внесення та об'єм реагентів, що використовувались для виділення нуклеїнових кислот

№ п/п	Назва реагенту	Номер лунки	Об'єм, мкл
1	NM1 (N1+M1) (лізуючий буфер)	1	250
2	NM3 (розчин для відмивання)	2	600
3	NM4 (розчин для відмивання)	3	600
4	80% етанол	4	600
5	NM6 (буфер для елюції НК)	5	600

6	NM2 (буфер для зв'язування НК)	1	600
7	NM LSI Beads (магнітні кульки)	1	20

В першу лунку з лізуючим розчином (NM1) додавали 100 мкл гомогенату тканин. Далі по-порядку вносили розчини NM3, NM4, 80% етанол та NM6. Після цього штатив із стріпами поміщали у екстрактор на 10 хвилин для лізису зразку. Після завершення лізису у першу лунку додавали розчин для зв'язування нуклеїнових кислот NM2 та NM LSI Beads (магнітні кульки). Потім штатив знову поміщали до екстрактора на 35 хвилин де відбувались наступні етапи виділення ДНК та РНК в такому порядку: звязування НК – 5 хв; відмивка 1 – 3 хв; відмивка 2 – 3хв; відмивка 3 – 2 хв; просушування магнітних кульок – 10 хв; елюція НК –5 хв, 30 сек.. ДНК та РНК готові відбирали із лунки №5 у пробірки та зберігали за температури – 20°C.

2.3.3. Постановка реакції зворотної транскрипції

Після виділення нуклеїнових кислот із патматеріалу проводили реакцію зворотної транскрипції для отримання комплементарної ДНК на матриці вірусної геномної РНК. Для цього використовували набір реагентів «Реверта-L». У пробірки об'ємом 500 мкл відбирали 10 мкл НК та поміщали у термостат за температури 87 °С на 5 хвилин для денатурації. Потім проби переносили у льодяну баню на 3 хвилини. Після цього у пробірки додавали 0,5 мкл ревертази (MMV), 10 мклRT-mix та 0,4мклRT-G-mix1. Кожен реагент вносили окремим носиком і ретельно піпетували. Далі пробірки ставили у термостат на 30 хв за температури 37 °С. Для зупинки реакції пробірки переносили в термостат за температури 87 °С на 5 хвилин. Після цього до кДНК додавали 20 мкл ДНК-буферу. Готову кДНК використовували для постановки полімеразної ланцюгової реакції та зберігали за температури – 20 °С.

2.3.4. Проведення полімеразної ланцюгової реакції

ПЛР проводили у два етапи. Для детекції ВРСС використовували пару праймерів на ORF 7, що є висококонсервативною ділянкою гену геному ВРСС. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції готували ПЛР-суміш з двох фаз: нижньої та верхньої, розділених легкоплавким воском. До складу нижньої фази входили 0,5 мкл дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,25 мкл прямого та зворотнього праймерів та 4 мкл H₂O з розрахунку на один зразок. На суміш нижньої фази нашаровували 10 мкл легкоплавкого воску, попередньо розплавленого за t= +94 °С. До складу верхньої фази входили 5 мкл ПЛР-буферу, 0,75 мкл 2,5 мМ сульфата магнію, 10,75 мкл H₂O та 0,5 мкл Taq-полімерази з розрахунку на один зразок. Готову суміш верхньої фази вносили на поверхню затверділого воску. До реакційної суміш вносили 3 мкл зразків кДНК, отриманих в результаті реакції зворотньої транскрипції. Програмували ампліфікатор згідно температурного режиму наведеного у таблиці 2.3.

Таблиця 2.3

Температурний режим для ампліфікації специфічних ділянок кДНК ВРСС із застосуванням діагностичних пар праймерів

Етапи	Кількість циклів	Температура, °С	Тривалість етапу, хв
Гарячий старт	1	95	2
Денатурація	35	95	0,5
Гібридизація		58	0,5
Елонгація		72	0,5
Кінцева елонгація	1	72	10
Збереження	-	10	Доки не досягне зазначеної температури

. Для кожної реакції використовували окремі набори праймерів, послідовності яких указані в таблиці 2.4.

Таблиця 2.4.

Характеристика праймерів на ORF7, що використовувались для виявлення ВРРСС

Назва та нуклеотидна послідовність праймерів	Довжина амплікону, п.н.	Температура гібридизації, °С
PRRSP1 (5'-CCAGCCAGTCAGTCARCTGTG-3')	301	58
PRRSP2 (5'-GCGAATCAGGCACACWGTATG-3')		

2.3.5. Проведення гніздової полімеразної ланцюгової реакції

Для аналізу генетичної мінливості вірусу використовували дві пари праймерів на одну з найваріабельніших ділянок гену геному вірусу – ORF 5. ПЛР проводили у два етапи. Для першої реакції використовували кДНК, для другої – амплікони отримані у першому етапі реакції. Для кожної реакції використовували окремі набори праймерів, послідовності яких указані в таблиці 2.5.

Таблиця 2.5.

Характеристика праймерів на ORF5, що використовувались для аналізу генетичної варіабельності ВРРСС

Назва та нуклеотидна послідовність праймерів	Довжина амплікону, п.н.	Температура гібридизації, °С
ORF5_For1 (5'CCGTCTGTGATGAGRTGGGC-3')	860	52
ORF5_Rev1 (5'-GGAYACTTTTAGGGCRTATATCAT-3')		
ORF5_For2 (5'TGGGCYACAACCATTGCTTG-3')	721	52
ORF5_Rev2 (5'CACAGGTGTATATGTKATGCTAAA-3)'		

Для проведення першого раунду полімеразної ланцюгової реакції готували ПЛР-суміш до складу якої входили 1 мкл дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,3 мкл прямого та зворотнього праймерів, 5 мкл ПЛР-буферу, 1 мкл хлориду магнію, 0,25 мкл Таq-полімерази та 38 мкл Н₂О. До реакційної суміші додавали 5 мкл кДНК. ПЛР-суміш для другого етапу ПЛР готували аналогічно, але з використанням відповідної пари праймерів. До реакційної суміші додавали 5 мкл амплікону першого етапу реакції, який попередньо розводили у 20 разів. Програмували ампліфікатор згідно температурного режиму наведеного у таблиці 2.6.

Таблиця 2.6.

Температурний режим для ампліфікації специфічних ділянок кДНК
ВРРСС із застосуванням діагностичних пар праймерів

Етапи	Кількість циклів	Температура, °С	Тривалість етапу, хв
Гарячий старт	1	95	2
Денатурація	35	95	0,5
Гібридизація		58	0,5
Елонгація		72	0,5
Кінцева елонгація	1	72	10

2.3.6. Проведення електрофоретичного аналізу продуктів реакцій в агарозному гелі

Після закінчення реакцій проводили електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації та рестрикції в 1,5 % агарозному гелі. Для цього використовували концентрований трис-боратний буфер з етидієм бромідом. Концентрований ТБЕ-буфер розводили дистильованою водою у співвідношенні 1:18. Агарозу розводили готовим буфером та плавили за допомогою мікрохвильової печі. Розплавлений гель заливали у форму камери

для електрофорезу шаром завтовшки 0,6 – 0,8 см та залишали на 20 хв для застигання. Далі гель заливали ТБЕ-буфером, відбирали 10 мкл ампліфікату, ресуспендовували його з барвником і вносили на дно лунок агарозного гелю під буфер. В крайні лунки гелю вносили по 6 мкл маркеру “GeneRuller 50 bp DNA Ladder”. Електрофорез проводили в градієнті напруги 10 В/см протягом 45-50 хв. Після закінчення електрофорезу гелі розглядали і фотографували на транслюмінаторі при ультрафіолетовому світлі, довжиною хвиль 320 нм.

Після використання буфер і гелі, що містили розчин етідіум броміду дезактивували, додаючи 500 см³ 0,5 М КМnO₄ та 500 см³ 2,5 МНСl.

2.3.7. Очищення продуктів ПЛР з агарозного гелю

Для сиквенування 721-нуклеотидного фрагменту гену ORF5 продукт другого етапу ампліфікації очищували з агарозного гелю за допомогою набору реагентів «mi-Gel Extraction Kit». Для цього обраний зразок вирізали з гелю та поміщали у мікропробірку об'ємом 1,5 мл. В цю пробірку вносили 300 мкл буферу для екстракції та інкубували 5-10 хвилин за 65 °С до повного розчинення гелю. Далі вміст пробірок переносили у колонки із сорбентом та центрифугували протягом 1 хв за 13 тис. об/хв. Після цього відмивали колонки додаючи на сорбент 500 мкл буферу для відмивання та центрифугуючи протягом 1 хв за 13 тис. об/хв. Цю процедуру повторювали двічі. Потім проводили елюцію. Для цього в колонки додавали 30 мкл ДНК-буферу та центрифугували 1 хв при 13 тис. об/хв. Очищений зразок ДНК відбирали у пробірки та зберігали при – 20 °С.

2.3.8. Побудова філогенетичного дерева за допомогою програми MEGA 6.0

Для проведення філогенетичного аналізу (встановлення філогенетичної спорідненості) ВРРСС, виділених в Україні, ми застосували підходи та методи молекулярної філогенії. Щоб визначити філогенетичні взаємовідносини між українськими ізолятами та референс-штамами, нами були побудовані філогенетичні дерева, що являють собою проекцію у

двомірному просторі складних багатомірних співвідношень між послідовностями біологічних молекул [104].

Пошук та вибірку необхідних послідовностей проводили за допомогою BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Вирівнювання послідовностей проводили із застосуванням алгоритму ClustalW [130].

Філогенетичні дерева будували у програмі MEGA 6.0 [105]. Еволюційні зміни досліджували методом аналізу дискретних ознак — Maximum Likelihood (ML) [105]. Для вибору оптимальної моделі з 12 доступних користувались відповідною опцією в програмі MEGA 6.0.

2.4. Гістологічний метод дослідження

2.4.1. Приготування гістологічних зразків

Фіксування досліджуваних зразків тканин органів проводили зануренням у 80 мл 10% розчину формаліну та витриманням 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 [106]. Після цього зразки тканин нарізали (ширина зрізу становила не більше 1,5 см) з урахуванням особливостей будови кожного органу та наявності видимих патологічних змін і поміщали у пластикові касети Turboflowe [107].

Після фіксування проводили попередню обробку досліджуваних тканин із використанням автоматизованої станції MicromSTP-120. Тривалість попередньої обробки тканин та реактиви, які використовували для її здійснення, наведено у таблиці 2.7.

Після закінчення процесу попередньої обробки зразки переносили у металеві форми, заливали рідким парафіном і накривали пластиковою касетою з розрахунку 6 мл парафіну на одну касету. Металеві форми зі шматочками органів переносили на кріоконсоль на 30 хв. Для заливки та

охолодження зразків використовували станцію для заливки «MicromEC 350» [103].

Таблиця 2.7

Характеристика і тривалість етапів попередньої обробки зразків у автоматизованій станції STP-120

Етап	Характеристика етапу	Тривалість етапу
1	Занурення патологічного матеріалу у 50 % етанол	2 год
2	Занурення патологічного матеріалу у 70 % етанол	2 год
3	Занурення патологічного матеріалу у 96 % етанол	3 год
4	Занурення патологічного матеріалу у 96 % етанол	3 год
5	Занурення патологічного матеріалу у ксилол	3 год
6	Занурення патологічного матеріалу у рідкий парафін	2 год
7	Занурення патологічного матеріалу у рідкий парафін	2 год

Приготування тонких зрізів із патологічного матеріалу залитого у парафін здійснювали із використанням мікротому «Microm HM 340-E» та ножів для гістологічних досліджень «Sec-130». Прирізку виконували встановлюючи «крок» мікротому 50 мкм, а для виготовлення зразків тканин органів – 5 мкм. Зрізи тканин органів досліджуваних зразків переносили з водяної бані (температура води 39 °С) безпосередньо на скельця [103].

Виготовлені гістологічні зрізи витримували 1-2 години за температури + 37 °С для підсушування. Фарбування гістологічних зрізів здійснювали розчинами еозину та гематоксиліну. Для цього попередньо зрізи послідовно занурювали на 5 хвилин у розчини ксилолу 99,85 %, етанолу 96 %, етанолу 70 % та дистильовану воду, а потім поміщали на 1 хв у розчин еозину. Після витримання у розчині еозину промивали протягом 3 хв у воді, після чого занурювали зріз у розчин гематоксиліну на 30 секунд та знову виконували відмивання зразків водою протягом 3 хв. По закінченню

процесу фарбування зрізи витримували по 3 хв у етанолі різних концентрацій (70 % й 96 %) та у ксилолі 99,85 % [103].

2.4.2. Мікроскопіювання

Мікроскопіювання досліджуваних зразків проводили за збільшення у 100 та 200 разів із застосуванням відповідних об'єктивів та збільшення в 1000 разів із використанням імерсійного об'єктиву мікроскопу Axioskop 2 plus (CarlZeiss). Фотографування зразків для подальшого аналізу виконували за допомогою фотоапарату за чотирьохкратного оптичного збільшення, що дозволяло отримувати мікрофотографії з результуючим збільшенням від 400 до 4000 разів. Отримані мікрофотографії маркували, зберігали в архіві та проводили аналіз і опис виявлених гістологічних змін.

2.5. Імуногістохімічний метод дослідження зразків тканин

2.5.1. Підготовка тканин органів

Секційний матеріал легень, лімфатичного вузла товщиною 1 см заморожували та прикріплювали до кріокасети за допомогою розчину для заморожування (Richard-Allan-Scientific) безпосередньо в кріомікротомі за температури -30°C . Із замороженого блоку виготовляли кріозрізи товщиною 5-6 мкм. Зрізи фіксували протягом 5 хвилин 80% спиртовим розчином ацетону, попередньо охолодженим до -15°C , а потім відмивали в фосфатному буферному розчині тричі по 2 хвилини.

Для наступного порівняння ефективності використання розчинів для вивільнення ендогенної пероксидази використовували розчин 0,3 % пероксиду водню в 0,1% розчині азиду натрію.

Реакцію вивільнення пероксидази виконували в темному місці, протягом 10 хв, а потім відмивали в фосфатному буфері тричі. Для уникнення неспецифічного зв'язування моноклональних антитіл зразки інкубували в 10% розчині альбуміну сироватки бика.

2.5.2. Процедура проведення реакції

Секційний матеріал лімфатичного вузла та легень товщиною 1см заморожували та прикріплювали до кріюкасети за допомогою розчину для заморожування (Richard-Allan Scientific) безпосередньо в кріомікротомі за температури -30°C . Із замороженого блоку та виготовляли кріозрізи товщиною 5-6 мкм. Зрізи фіксували протягом 5 хвилин 80% спиртовим розчином ацетону, попередньо охолодженим до -15°C , а потім відмивали в фосфатному буфері тричі по 2 хвилини.

Для наступного порівняння ефективності використання розчинів для вивільнення ендогенної пероксидази використовували розчин 0,3 % пероксиду водню в 0,1% розчині азиду натрію.

Реакцію вивільнення пероксидази виконували в темному місці, протягом 10 хв, а потім відмивали в фосфатному буфері тричі.

Для уникнення неспецифічного зв'язування моноклональних антитіл зразки інкубували в 10% розчині альбуміну сироватки бика. Для непрямого пофарбування зразків використовували наступні антитіла:

1. первинні антитіла специфічні до поверхневого глікопротеїну 7 ВРРСС ORF 7 PRRSV (Ingenasa, Spain) у розведенні 1:50 (розведення проводили в 0,1% Tween фосфатному буфері). Зразки з первинними моноклональними антитілами інкубували в термостаті при температурі 24°C протягом 2 годин. Надалі зразки тричі промивали в розчині 0,05% Tween у фосфатному буфері.
2. В якості вторинних моноклональних антитіл використовували анти-мишині антитіла (Sigma, USA) з пероксидажною міткою у розведенні 1:100 (розведення проводили в 0,1% Tween у фосфатному буфері). Зразки з вторинними моноклональними антитілами інкубували в термостаті при температурі 24°C протягом 1 години. Після завершення інкубації зразки тричі промивали в розчині 0,05% Tween у фосфатному буфері.

Для візуалізації результату використовували пероксидазний кон'югат. Для проведення реакції спершу готували матричний розчин №1: розчиняли 3-аміно-9-етилкарбазол в n,n-диметил-формаїді у співвідношенні 1:6,66.

Розчин №1 розводили в 0,05 М ацетатному буфері у співвідношенні 1:16,6 - розчин 2, після чого до розчину №2 додавали пероксид водню у співвідношенні 1:0,0017.

Зразки інкубували з кон'югатом протягом 45 хвилин за кімнатної температури. Після завершення інкубації зразки тричі промивали в розчині 0,05% Tween у фосфатному буфері.

2.6. Метод імуоферментного аналізу

Встановлення титру антитіл до ВРРСС в зразках сироватки крові проводили за допомогою ІФА з використанням діагностичних тест-систем фірми IDEEX (США).

2.6.1. Приготування реагентів та зразків

Перед початком роботи всі компоненти набору прогрівали до кімнатної температури (20-24 °С). Приготування миючого розчину проводили шляхом розчинення 30 мл концентрованого розчину для промивання (wash concentrate, IDEEX) у 270 мл дистильованої води. Розчин гріли при кімнатній температурі та гомогенізували для розчинення кристалів. 5 мкл сироватки крові розчиняли в 245 мкл буферу для розведення (sample diluents, IDEEX)

2.6.2. Процедура проведення реакції

В лунки із засорбованими антигенами (Recombinant PRRSS antigens Coated Plates) вносили, не торкаючись дна лунки, по 90 мкл буферу та по 10 мкл, попередньо розведеної, сироватки крові. В лунки з позитивним та негативним контролем вносили по 100 мкл сироваток крові, що входили в набір тест-систем (PRRSV-positive control, Negative control). Плашку із засорбованими антигенами та внесеними зразками поміщали в термостат (miniarticV2) при температурі 20 °С та інкубували протягом 30 хвилин. Після прогрівання проводили промивку (5 разів) зразків попередньо приготованим розчином для промивки з використанням Columbia washer, TCAN. Після

кінцевої аспірації, яка завершувала останню промивку, видаляли залишки рідини з лунок, шляхом витрушування з плашки на адсорбуючий папір.

За допомогою багатоканальної піпетки в лунки вносили по 100 мкл кон'югату (Anti-PorcIn Ig G:HPRO conjugate). Плашку із внесеним кон'югатом поміщали в термостат при температурі 20 °С та інкубували протягом 30 хвилин. Після прогрівання проводили повторну промивку (5 разів) зразків попередньо приготованим розчином для промивки з використанням Columbia washer (TCAN) та вносили по 100 мкл барвника в кожен лунку за допомогою багатоканальної піпетки. Оптичну щільність на Reader (TCAN) вимірювали за довжини хвилі 650 нм. Обчислення результатів проводили за допомогою програми Xcheck, в яку були внесені наступні формули для підрахунку визначення середнього значення негативного контролю $NCx = (NC1 A650 - NC2 A650)/2$, NC1 – значення першого негативного контролю; NC2 – значення другого негативного контролю; визначення середнього значення позитивного контролю $PCx = (PC1 A650 - PC2 A650)/2$, де PC1- значення першого позитивного контролю PC2 - значення другого позитивного контролю; та формулою калькуляції для зразку $S/P = (зразок A650 - NCx) / (PCx - NCx)$.

Для перерахунку оптичної щільності в титр антитіл використовували формулу, що була надана фірмою-виробником тест-системи:

$$\text{Log}_{10} \text{Titer} = 1,09 (\log_{10} S/P) + 3,36, \text{ де}$$

$$1,09 - \text{slope}; 3,36 - \text{inteccept.}$$

2.7. Статистична обробка результатів

Математичну обробку експериментальних даних (середнє значення, стандартне відхилення) здійснювали за допомогою MS Excel пакета OfficeXP. Для статистичного аналізу отриманих результатів користувались методами варіаційної статистики. Достовірність відмінностей між показниками визначали по t-критерію Стьюдента при $p=0,05$ [108].

Для підтвердження припустимого рівню робочих параметрів ІФА використовувався аналіз ряду параметрів, оскільки в основу методики

виявлення антитіл до ВРРСС в біологічному матеріалі (зразки сироватки крові та плазми крові свиней) покладено метод якісного ІФА, для оцінки придатності цієї методики було використано параметри, що використовуються при валідації якісних методик, визначення яких може служити доказом того, що даний метод вимірює саме те, що необхідно, з дотриманням прийнятних робочих параметрів. Достовірність відмінностей між показниками визначали за середньоквадратичним відхиленням та коефіцієнтом варіації [109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118].

Ъ

РОЗДІЛ 3

ПОШИРЕНІСТЬ ВІРУСУ РЕПРОДУКТИВНОГО ТА РЕСПІРАТОРНОГО СИНДРОМУ СВИНЕЙ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ ТА ДИНАМІКА ЙОГО РОЗПОВСЮДЖЕННЯ

3.1. Характеристика клінічного та паталого-анатомічного стану тварин, відібраних на дослідження

Для відпрацювання умов проведення ПЛР та розробки підходу побудови серологічного профілю господарства по ВРРСС використали тварин з п'яти господарств України. Аналіз клінічних симптомів відібраних для дослідження свиней проводили протягом 31 дня. У поросят обох вікових груп з господарств Київської області спостерігалась лихоманка, кон'юнктивіти, анорексія, депресивна поведінка, відставання в рості. У одного поросеня віком 8 днів та 2х поросят 21 та 29 днів спостерігалась атаксія задніх кінцівок (Рис. 3.1.).



Рис.3.1. Клінічні прояви уражених ВРРСС поросят (група №1). А – відставання у рості. В – поросеня з атаксією задніх кінцівок.

У поросят Дніпропетровської області не спостерігали такої гомогенності клінічних проявів, як в Київській. Так, у двох поросят першої вікової групи та трьох поросят другої вікової групи зафіксували незначне відставання в рості та зниження апетиту. На 9-10 день життя поросят першої вікової групи фіксували появу нерівномірного дихання, нервові явища, посиніння вушних

раковин, у двох поросят другої вікової групи спостерігали апатію, втрату ваги, проблеми респіраторного характеру.

У трьох свиноматок з господарства Дніпропетровської області фіксували ранні опороси та зниження апетиту. У однієї з п'яти свиноматок виявили агалактію. У однієї особини, що досліджувалась, не виявили жодних клінічних проявів. При аналізі клінічних проявів свиноматок Київської області у чотирьох досліджуваних особин виявили атаксію, почервоніння вульви, ускладнене дихання, були наявні мертвонароджені поросята. У п'ятої особини не виявили жодних клінічних ознак.

У хряків обох областей не зафіксували жодних клінічних проявів.

Аналіз патологоанатомічного стану відібраних для досліджень свиней було проведено за макроскопічними змінами. Так, при аналізі зразків поросят першої вікової групи Київської та Дніпропетровської областей зафіксували наявність збільшення заглиткових та мезентеріальних лімфатичних вузлів, набряк інтерстиції, нерівномірність забарвлення легень, частковий ателектаз.

Таким чином, було встановлено, що вищезазначені клінічні симптоми та патологоанатомічні зміни, характерні для репродуктивного та респіраторного синдрому свиней, найчастіше детектували у першій та другій вікових групах, відібраних з обох областей, що може свідчити про наявність гострого перебігу захворювання серед поросят господарств, що досліджувались. У свиноматок з обох груп також спостерігали деякі ознаки ВРРСС, що може свідчити про циркуляцію збудника цієї інфекції на території господарств.

Однак, на підставі візуального аналізу не можливо зробити висновки щодо присутності згаданого збудника в данних господарствах, враховуючи те, що клінічні та патоморфологічні прояви ВРРСС не є специфічними. У хряків обох областей жодних клінічних ознак ураження ВРРСС не було виявлено. Проте, відсутність зовнішніх ознак захворювання не виключає наявність збудника в організмі тварин, оскільки для репродуктивного та респіраторного синдрому свиней однією із форм перебігу інфекції є

вірусоносійство без жодних внутрішніх та зовнішніх ознак захворювання (рис. 3.2).

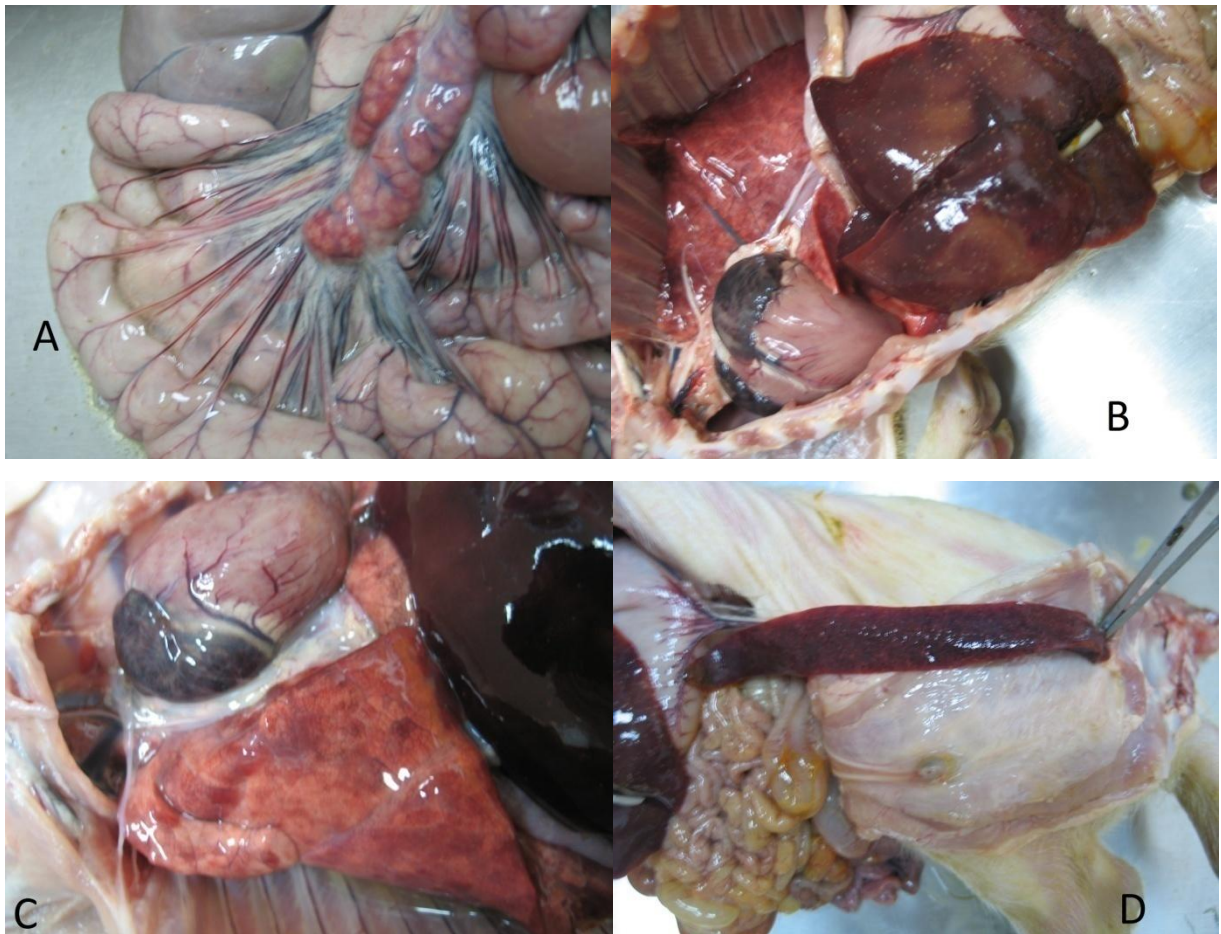


Рис 3.2. Патоморфологічні зміни органів поросят, у яких були зафіксовані характерні для ВРСС клінічні симптоми (група 2.1).

A- гіперемія та набряк мезентеріальних лімфатичних вузлів, гіперемія судин тонкого відділу кишечника. B – точкові некрози на печінці, набряк інтерстиціальної тканини. C- набряк інтерстиціальної тканини легень, ін'єкція судин. D-точкові некрози на селезінці.

На серологічне дослідження відбирали парні сироватки крові від тварин з 5-ти господарств України, в яких були зафіксовані характерні для ВРСС клінічні прояви, а саме абортівання свиноматок в третьому триместрі супоросності, респіраторні проблеми у поросят технологічних груп «відгодівля», «відлучення», «лактація». Гетерогенність груп, у яких були

виявлені клінічні прояви ВРРСС, свідчить про різні терміни ураження тварин. Для встановлення ймовірних термінів інфікування тривалості інфекційного процесу, що необхідно для комплексної оцінки причетності ВРРСС в симптомокомплексі респіраторних проблем, причини їх виникнення та подальшого підбору оптимальної схеми вакцинопрофілактики необхідною є побудова серологічних профілів.

Також, беручи до уваги той факт, що поширеність ВРРСС в Україні недостатньо досліджена, проводили відбір сироваток крові від свиней різних вікових груп у період 2005-2014 роки для встановлення епізоотичної ситуації в господарствах України.

3.2. 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 (таблиця 3.1.) З 2010 по 2014 рік включно ми дослідити сироватки крові тварин з 254 ферм 25-ти регіонів України. Необхідно додати проте, що близько 15 % ферм випали з нашого ретроспективного дослідження через їх закриття та деякі нововідкриті ферми були введені в дослідження пізніше протягом цього періоду.

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 серологічно-позитивній за ВРРСС пробі. Для серологічної тест-системи допускається похибка в результатах до 3 %. Враховуючи це, 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 Київській області.

Таблиця 3.1.

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 за ВРРСС тварини	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 досліджень інших дослідників 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 (рис. 3.3., табл. 3.1). 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 [119]. Необхідно також зазначити, що в 2007 році були детектовані поодинокі ВРРСС позитивні сироватки крові в Житомирській області. В 2008 за кількістю серологічно позитивних тварин та динамікою росту антитіл нами остаточно 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(рис. 3.3., табл. 3.1.).

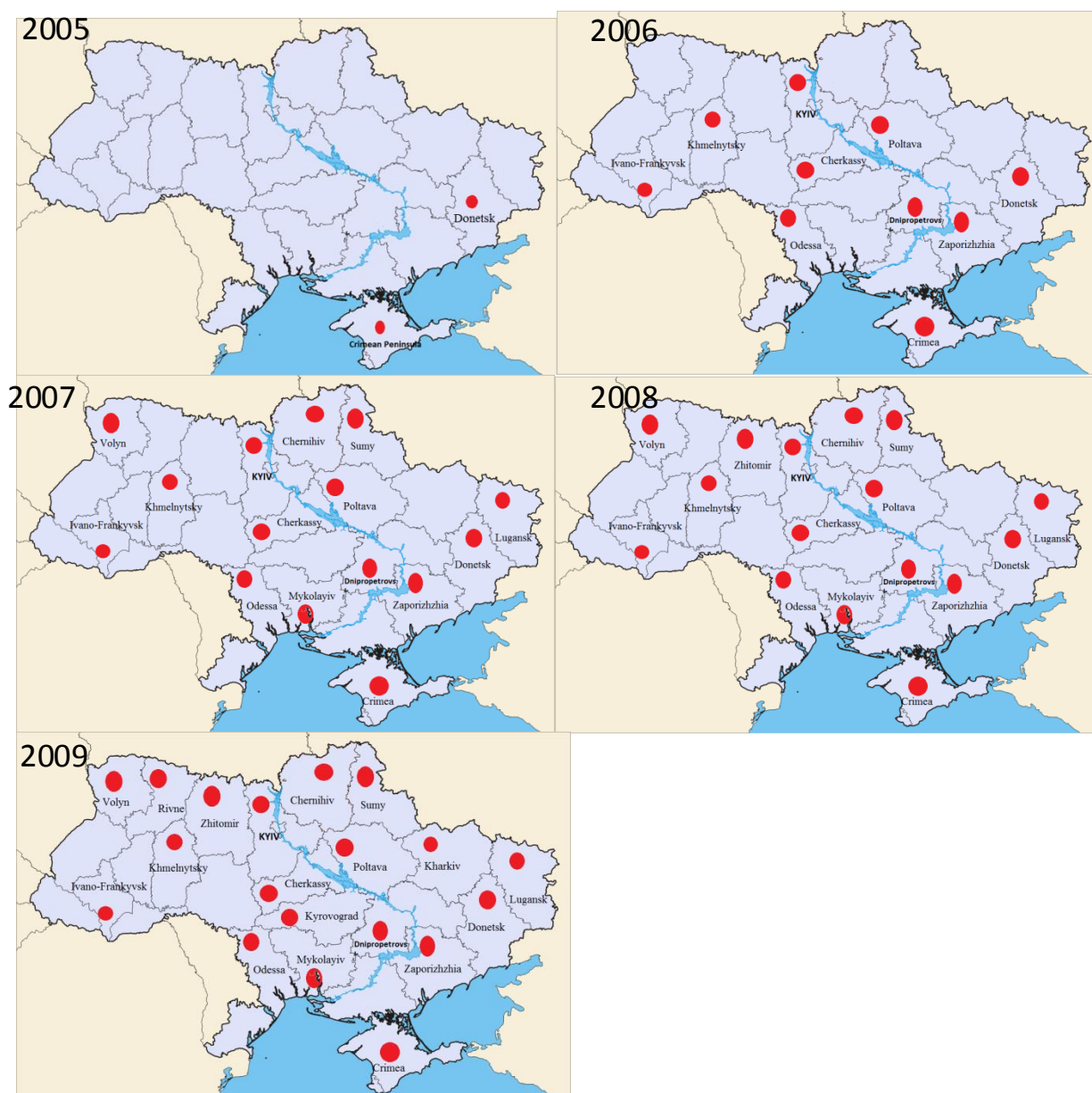


Рис 3.3. Карта поширення вірусу РРСС територією України з 2005 по 2009 рік.

Всі вищевикладені результати свідчать про швидке поширення ВРРСС територією України. Відтак в 2005 році нами була детектована циркуляція ВРРСС лише в двох областях України, а в 2009 – у 19-ти областях (рис. 3.3., табл. 3.1.).

3.3. Аналіз ситуації за ВРРСС в Україні в період з 2010 по 2014 рр.

В 2010 році ми спостерігали значне збільшення кількості господарств з серологіно-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 дослідження 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 повного аналізу та контролю епізоотичної ситуації в господарстві.

З 2010 по 2015 ми продовжили серологічні дослідження тварин усіх областей України. В дослідження були включені сироватки крові від тварин з 242 ферм України. За отриманими даними, ми переконані, 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 Тернопільської, Полтавської та Івано-Франківської областей. Ми вважаємо, що подальші моніторингові дослідження критично необхідні для моніторингу динаміки антитіл в сироваток крові тварин для встановлення епізоотично ситуації в господарствах цього регіону. Антитіла до ВРРСС не були виявлені лише у тварин з Луганської та Миколаївської областей (Рис.3.4.). 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.



Рис 3.4. Кількість серологічно позитивних за ВРРСС ферм в Україні за даними ретроспективного аналізу в період 2010 – 2014 рр.

В загальному, 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 Гаврасьєвої 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 3.4.) Циркуляція вірусу була детектована в 84 фермах України, тоді як в 5 фермах з Одеської, Полтавської та Іванофранкиської областей 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.

РОЗДІЛ 4

ОСОБЛИВОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ СЕРОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ У ДІАГНОСТИЦІ ВРРСС

Зважаючи на високий рівень варіабельності патогену, а також його значне поширення в Україні та світі [1, 2, 120], 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.

4.1. Валідація використання методу імуноферментного аналізу.

Метод оцінки придатності (валідації) використовується в лабораторії для отримання якісних результатів (позитивний/негативний результат) із застосуванням ІФА.

Метою експериментів з валідації є підтвердження припустимого рівня робочих параметрів даного методу. Оскільки в основу методики виявлення антитіл до ВРРСС в біологічному матеріалі (зразки сироватки крові та плазми крові свиней) покладено метод якісного ІФА, для оцінки придатності цієї методики було використано ряд окремих параметрів, що використовуються при валідації якісних методик, визначення яких може служити доказом того, що даний метод вимірює саме те, що необхідно, з дотриманням прийнятних робочих параметрів.

Валідація є засобом постановки, оптимізації, та перевірки основних робочих параметрів методики. Попередній аналіз оцінки придатності методики включає вивчення документації по процедурі валідації методик, процесу підготовки проведення валідації, критеріїв тощо. Крім того, аналіз спеціальної літератури з цього питання, уточнення підходів та аналітичних параметрів, за якими слід проводити валідацію якісних методик.

Оскільки в основу методики визначення антитіл в біологічному матеріалі від свиней покладено метод якісного ІФА, для оцінки придатності цієї методики застосовується ряд окремих параметрів, що використовуються при валідації якісних методик, а саме:

- Чутливість
- Збіжність/або повторюваність;
- Специфічність/селективність методу;
- Достовірність.

У дослідах використовували зразки сироваток крові свиней, що містять антитіла до збудників репродуктивно-респіраторного синдрому свиней, цирковірусу, псевдосказу (хвоорби Ауескі), мікоплазмозу (*M. hyo.*) та вільні від антитіл сироватки:

- сироватки крові, що містять антитіла до ВРРСС (№ В/14/283/3);
- сироватки крові інактивовані, вільні від антитіл (№ В/14/391/2);
- сироватки крові, що містять антитіла до цирковірусу свиней (№ В/00117/3);
- сироватки крові, що містять антитіла до збудника псевдосказу (№В/14/315/3);
- сироватки крові, що містять антитіла до *M. hyo.* (№ Б/00106/3);
- позитивний контроль (К+);
- негативний контроль (К-).

4.1.1. Чутливість та специфічність IDEXX HerdCheck PRRS 3XR ELISA.

Метод визначення антитіл до вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней в зразках сироваток чи плазмі крові засновано на

високоспецифічній імунологічній реакції антигену з відповідним йому антитілом з утворенням імунного комплексу, для виявлення якого в якості мітки використовують фермент [121].

Таблиця 4.1.

Оцінка специфічності результатів виявлення антитіл до вірусу
репродуктивно-респіраторного синдрому свиней

№ п/п	Приготовані зразки сироваток крові	№ проби	Наявність специфічних АТ до ВРРСС	
			Очікувані результати	Отримані результати
1.	Сироватка крові свині з АТ до ВРРСС змішана із сироваткою крові, що містить АТ до цирковірусу свиней (1:1)	V/14/283/3 + V/00117/3/1	виявлено	<i>виявлено</i>
		V/14/283/3 + V/00117/3/2	виявлено	<i>виявлено</i>
		V/14/283/3 + V/00117/3/3	виявлено	<i>виявлено</i>
2.	Сироватка крові свині з АТ до ВРРСС змішана із сироваткою крові, що містить АТ до вірусу хвороби Ауескі (1:1)	V/14/283/3 + V/14/315/3/1	виявлено	<i>виявлено</i>
		V/14/283/3 + V/14/315/3/2	виявлено	<i>виявлено</i>
		V/14/283/3 + V/14/315/3/3	виявлено	<i>виявлено</i>
3.	Сироватка крові свині з АТ до ВРРСС змішана із сироваткою крові, що містить АТ до М. huо (1:1)	V/14/283/3 + B/00106/3/1	виявлено	<i>виявлено</i>
		V/14/283/3 + B/00106/3/2	виявлено	<i>виявлено</i>
		V/14/283/3 + B/00106/3/3	виявлено	<i>виявлено</i>
4.	Сироватка крові свині вільна від АТ, інактивована змішана із сироваткою крові, що містить АТ до цирковірусу свиней (1:1)	V/14/391/2 + V/00117/3/1	не виявлено	<i>не виявлено</i>
		V/14/391/2 + V/00117/3/2	не виявлено	<i>не виявлено</i>
		V/14/391/2 + V/00117/3/3	не виявлено	<i>не виявлено</i>
5.	Сироватка крові свині вільна від АТ, інактивована змішана із сироваткою крові, що містить АТ до вірусу хв. Ауескі (1:1)	V/14/391/2 + V/14/315/3/1	не виявлено	<i>не виявлено</i>
		V/14/391/2 + V/14/315/3/2	не виявлено	<i>не виявлено</i>
		V/14/391/2 + V/14/315/3/3	не виявлено	<i>не виявлено</i>
6.	Сироватка крові свині вільна від АТ, інактивована змішана із сироваткою крові, що містить АТ до М. huо (1:1)	V/14/391/2 + B/00106/3/1	не виявлено	<i>не виявлено</i>
		V/14/391/2 + B/00106/3/2	не виявлено	<i>не виявлено</i>
		V/14/391/2 + B/00106/3/3	не виявлено	<i>не виявлено</i>

Використання позитивних і негативних контрольних сироваток, що входять в комплект тест-системи дозволяє контролювати якість проведення ІФА.

Специфічність методу також було перевірено експериментально. Для цього були використані сироватки крові свиней, що містили антитіла до збудників таких хвороб: цирковірусу, псевдосказу, мікоплазмозу свиней, які змішували у співвідношенні 1:1 з сироватками, що містили АТ до ВРРСС (позитивні) та з вільними від антитіл сироватками (негативні), кожен у трьох повторях, як зазначено у таблиці 4.1.

В результаті проведеного дослідження встановили, що при наявності у зразках антитіл до збудників репродуктивно-респіраторного синдрому, цирковірусу, псевдосказу та мікоплазмозу, дана тест-система специфічна до виявлення антитіл проти вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней.

4.1.2. Повторюваність результатів.

Повторюваність результатів досліджень – це відсутність статистично значимих розбіжностей між характеристиками тесту при вимірюваннях, які виконуються декілька разів в одних умовах [109].

Параметром збіжності (повторюваності) є CV (%) – коефіцієнт варіації, який оцінюється при якісному імуноферментному аналізі, є значення оптичної густини (ОГ) зразка [110].

Слід проводити порівняння розрахованого коефіцієнта варіації ($\%CV$) значень ОГ для серії досліджень зразка в один і той же час з прийнятним значенням коефіцієнта варіації ($\% CVs$), яке зазначене у інструкції до даної тест-системи [111].

У випадку, коли $\%CV \leq \%CV_v$, роблять висновок про хорошу збіжність результатів якісного виявлення антитіл [112].

Таблиця 4.2.

Оцінка збіжності результатів виявлення антитіл до вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней

Зразок	Значення ОГ	ОГ _{сер}	SD	% CV	% CVs
1.1	1,347	1,473	0,1	6,5	10
1.2	1,544				
1.3	1,605				
1.4	1,430				
1.5	1,596				
1.6	1,486				
1.7	1,374				
1.8	1,369				
1.9	1,543				
1.10	1,434				

В даному випадку $\%CV \leq \%CVs$, на цій основі ми робимо висновок про хорошу збіжність результатів якісного виявлення антитіл при цій методиці [113].

Для валідації діагностики ВРРСС серологічним методом наступним кроком було проведення аналізу повторюваності результатів в різні дні та з виконанням усіх біологів-дослідників, що працюють в лабораторії серології. Як еталонні зразки для дослідження точності та повторюваності використовували внутрішні позитивний та негативний контролю із заздалегідь відомим титром антитіл.

Для оцінки точності використовували середнє квадратичне відхилення за критерієм Фішера. Середнє квадратичне відхилення від зазначених еталонних контролей варіювало між 6-10%, що відповідає вимогам міжнародних валідаційних протоколів [115] та вказує на достовірність результатів дослідження в лабораторії серології

4.1.3. Міжнародні міжлабораторні порівняльні дослідження

Ще одним необхідним етапом валідації методу серологічного дослідження є проходження міжнародних міжлабораторних порівняльних досліджень.

Міжнародною європейською лабораторія DEVENTER, яка має сертифікат на проведення таких порівняльних досліджень, було надіслано 12 зашифрованих сироваток крові від свиней. Сироватки крові були відібрані від тварин з різних регіонів Європи, з різним титром антитіл. Саме тому результати цих досліджень використані, як підтвердження не лише точності та повторюваності серологічної реакції, проте й для підтвердження чутливості та специфічності тест-системи, що використовується.

Першим етапом дослідження було паралельне проведення реакції із зашифрованими сироватками крові двома працівниками лабораторії серології. Результати їх досліджень співпали по титр групам в 11 сироватках крові. Лише в сироватці крові №1 спостерігали відхилення: від так дослідник 1 вказав результатом першу титр групу, а дослідник 2 – другу (Табл.4.3.). Після отримання остаточних результатів міжнародних досліджень S/P значення сироватки №1 становив 1,064, що є на межі між першою та другою титр групою, саме через це виникла різниця результатів. Слід проте наголосити на тому, що відхилення значень S/P відповідало гранично допустимій (різниця повинна становити не більше 20%).

Для аналізу повторюваності результатів провели постановку реакції із зашифрованими сироватками крові в різні дні. Результати їх досліджень співпали по титр групам в 11 сироватках крові. Лише в сироватці крові №12 спостерігали відхилення: від так дослідник 1 вказав результатом третю титр групу, а дослідник 2 – другу (Табл 4.4.).

Таблиця 4.3.

Результати дослідження сироваток крові свиней (в рамках міжнародних порівняльних досліджень DEVENTER) методом ІФА з використанням діагностичних тест-систем компанії IDEXX 4 березня 2013

№ п/п	Дата проведення - 04.03.13							
	Дослідник 1				Дослідник 2			
	S/P	Титр	Титр група	Результат	S/P	Титр	Титр група	Результат
1	0,949	2164	1	+	1,102	2547	2	+
2	0,579	1263	1	+	0,641	1411	1	+
3	2,120	5196	4	+	2,488	6187	4	+
4	1,146	2658	2	+	1,015	2328	2	+
5	2,039	4980	4	+	2,249	5542	4	+
6	2,389	5919	4	+	2,255	5558	4	+
7	1,620	3876	3	+	1,691	4061	3	+
8	2,030	4956	4	+	2,027	4948	4	+
9	1,375	3242	2	+	1,402	3311	2	+
10	0,391	823	0	-	0,382	837	1	+
11	0,005	7	0	-	0,000	1	0	-
12	1,484	3523	2	+	1,237	2889	2	+

Отримані результати міжнародних міжлабораторних досліджень та внутрішніх досліджень для валідації методу детекції антитіл до ВРРСС в сироватці крові свиней свідчать про достовірність результатів серологічних досліджень.

Достовірність методу якісних методик виражали як коефіцієнти правильної і хибної позитивної та негативної реакцій. Для цього використовували позитивні та негативні зразки – чисті та з уведенням антитіл інших збудників [115,116] (табл. 4.5.).

Результати експериментів заносили в таблицю та розраховували відповідні показники. Розраховане значення діагностичної ефективності тесту (методики) може бути використане в якості оцінки валідаційної характеристики специфічності [117].

Таблиця 4.4.

Результати дослідження сироваток крові свиней (в рамках міжнародних порівняльних досліджень DEVENTER) методом ІФА з використанням діагностичних тест-систем компанії IDEXX 5 та 6 березня 2013 року

№ п/п	Дослідник/Дата проведення							
	Дослідник 1 (06.03.13)				Дослідник 2 (05.03.13)			
	S/P	Титр	Титр група	Результат	S/P	Титр	Титр група	Результат
1	1,141	2645	2	+	1,070	2466	2	+
2	0,654	1442	1	+	0,574	1251	1	+
3	2,239	5432	4	+	2,124	5207	4	+
4	1,102	2547	2	+	1,010	2316	2	+
5	2,255	5558	4	+	2,127	5215	4	+
6	2,224	5450	4	+	2,329	5757	4	+
7	1,654	3965	3	+	1,566	3735	3	+
8	2,104	5154	4	+	2,030	4956	4	+
9	1,320	3100	2	+	1,293	3031	2	+
10	0,357	745	0	-	0,394	830	0	-
11	0,004	6	0	-	0,004	6	0	-
12	1,511	3593	3	+	1,357	3195	2	+

Відношення правдоподібності позитивного результату теста ВП+ показує, що позитивний результат буде в ВП+ раз більш імовірним у зразка із антитілами, ніж у чистого зразка [118].

Відношення правдоподібності негативного результату теста ВП- показує, що негативний результат буде в ВП- раз більш імовірним у чистого зразка, ніж у зразка із антитілами (табл 4.5.).

Якщо відношення правдоподібності позитивного результату тесту дорівнює 1, то це означає, що імовірність позитивного результату тесту у зразка із антитілом така ж, як і у чистого зразка.

Таблиця 4.5.

Обрахунок достовірності результатів дослідження

Критерій	Збудник присутній	Збудник відсутній
Позитивний результат	a – дійсно позитивний ¹⁹	b – помилково позитивний
Негативний результат	c – помилково негативний -	d – дійсно негативний ¹⁴
Апріорна імовірність наявності збудника	$(a + c) / (a + b + c + d)$ = доля зразків в досліджуваній групі зразків	
Чутливість тесту	$a / (a + c)$ = доля дійсно позитивних результатів в досліджуваній групі зразків	
Специфічність тесту	$d / (b + d)$ = доля дійсно негативних результатів в досліджуваній групі зразків	
Передбачувальна цінність позитивного результату	$a / (a + b)$ = доля дійсно позитивних результатів серед всіх позитивних результатів	
Передбачувальна цінність негативного результату	$d / (c + d)$ = доля дійсно негативних результатів серед всіх позитивних результатів	
Діагностична ефективність тесту	$(a + d) / (a + b + c + d)$ = доля дійсних результатів серед всіх результатів тесту	1
Відношення правдоподібності позитивного результату тесту	$a / (a + c)$ ВП+ = ----- $b / (b + d)$	
Відношення правдоподібності негативного результату тесту	$d / (b + d)$ ВП- = ----- $c / (a + c)$	

В межах робочого діапазону хибно-негативних та хибно-позитивних результатів відмічено не було. В результаті проведеної роботи було встановлено, що всі параметри валідації методу визначення антитіл до вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней методом ІФА відповідають міжнародним вимогам, що гарантує отримання точних та достовірних результатів.

4.2. Порівняння чутливості до українських ізолятів комерційних серологічних тест-систем

Враховуючи високу варіабельність nsp-2 регіону ВРРСС в цілому [122], а також можливість циркулювання на території України ВРРСС з генетичним профілем, характерним для східноєвропейських ізолятів ВРРСС ми провели

порівняльний аналіз чутливості чотирьох промислових серологічних тест-систем, що використовуються в Україні:

- «Ingezim PRRS Universal 11.PRU.K1», Іспанія;
- «BIONOTE», Корея;
- «CIVTESTsuisPRRS», HIPRA, Іспанія
- «IDEXX HerdCheck PRRS 3XR ELISA», США.

За отриманими результатами з двох господарств України всі чотири тест-системи відобразили однакові результати по детекції антитіл до ВРРСС (табл. 4.6.).

Таблиця 4.6

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	0,49 3	позитивний	4	негативний	0,8 1	позитивний	0,438	слабкопозитивний
7	16	3,48 4	позитивний	17 0	позитивний	1,6 3	позитивний	2,854	позитивний
	17	3,01 9	позитивний	81	позитивний	1,4 4	позитивний	2,796	позитивний
	18	0,43 2	позитивний	18	слабкопозитивний	0,8 9	позитивний	0,57	позитивний
8	19	2,73 2	позитивний	0	негативний	0,1 7	негативний	0,33 6	негативний
	20	0,06 3	негативний	0	негативний	0,1 9	негативний	0,101	негативний
	21	0,39 1	слабкопозитивний	23	позитивний	0,9 1	позитивний	0,703	позитивний
9	22	0,01 4	негативний	0	негативний	0,5 4	позитивний	0,102	негативний
10	23	0,48 9	позитивний	3	негативний	0,8 1	позитивний	0,421	слабкопозитивний
	24	0,57 9	позитивний	0	негативний	0,1 3	негативний	0,401	негативний
позитив не знач.		>0,4		>2 0		>0, 4		>0,45 0	

Отож, отримані результати вказують на різницю у чутливості всіх промислових тест-систем, що застосовуються на теперішній час в Україні, що повністю корелює з раніше опублікованими результатами Karniychuk та співав[122].

4.3. Проведення серологічного моніторингу та особливості інтерпретації результатів

Імуноферментний аналіз має низку переваг перед іншими методами, проте для інформативності цього методу дослідження необхідними є правильні терміни відбору зразків та коректність інтерпретації результатів дослідження. Зважаючи на особливості технології утримання тварин в умовах промислового господарства, для первинного аналізу статусу господарства (наявність/відсутність циркуляції патогену в стаді), було запропоновано відбирати зразки сироватки крові від свиней найстаршої вікової групи – 24 тижні життя.

Для встановлення можливих термінів інфікування необхідним є оцінювання рівня колостральних антитіл (материнських антитіл) та динаміки

його зниження. Під час дослідження ми оцінювали рівень колостральних антитіл (материнських антитіл) та динаміку його зниження у віці 4,7,10 тижнів життя тварини.

У зразках сироватки крові тварин у віці 4 тижнів з 5 різних господарств виявили колостральні антитіла різного рівня, що свідчить про циркуляцію цього вірусу в умовах утримання материнського стада та про контакт свиноматок з ним. Рівень колостральних антитіл у досліджуваних груп тварин різнився за основними показниками (мінімальний, максимальний та середній титри) (таблиця 4.7.).

Таблиця 4.7.

Порівняльна динаміка рівня колостральних антитіл до ВРСС

№ господарст	Титр антитіл* (МО/л)								
	Мінімальний			Середній			Максимальний		
	4 т**	7 т	10 т	4 т	7 т	10 т	4 т	7 т	10 т
1	4600	740	2800	4726	791	3896	4800	835	4700
2	2000	345	830	3240	591	976	4540	870	1100
3	890	1	123	1069	111	205	1987	345	343
4	123	890	2153	529	1203	2810	832	2314	3456
5	5678	1009	100	7677	2310	228	7654	3421	345

Примітка: * – значення вище 844 розглядають як позитивний; ** т – тижнів життя тварини.

Середній титр антитіл (показник групового гуморального імунітету) варіював у межах 529 – 4726 МО/л. Встановлено, що динаміка рівня колостральних антитіл у зразках сироватки крові досліджуваних поросят мала тенденцію до зниження і досягала нульового рівня у віці 4 – 10 тижнів життя залежно від початкового рівня антитіл (рис. 4.1., 4.2.), що корелює з результатами інших дослідників [9, 122].

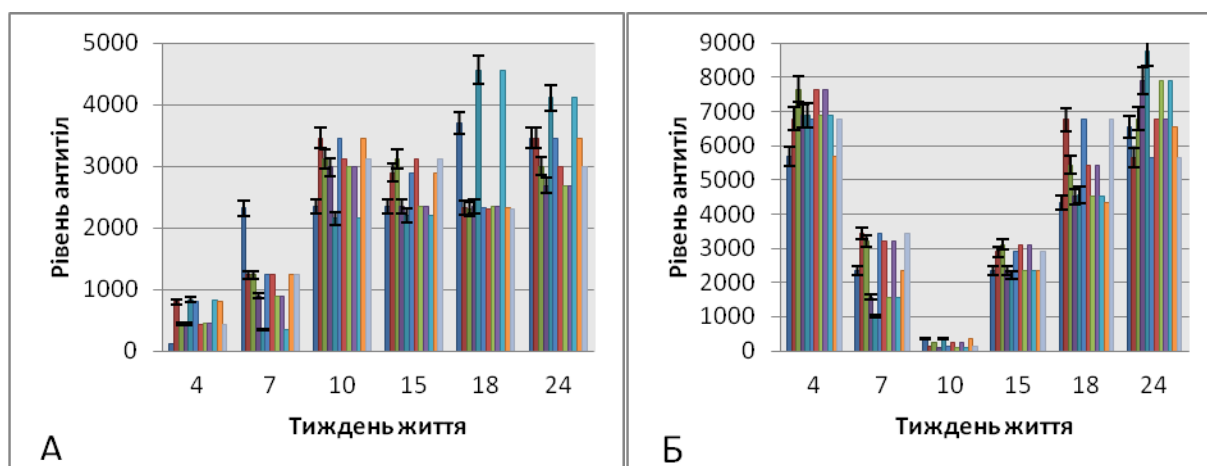


Рис. 4.1. Динаміка рівня антитіл до ВРРСС у зразках сироватки крові тварин з господарства Донецької області (А), господарства Запорізької області (Б).

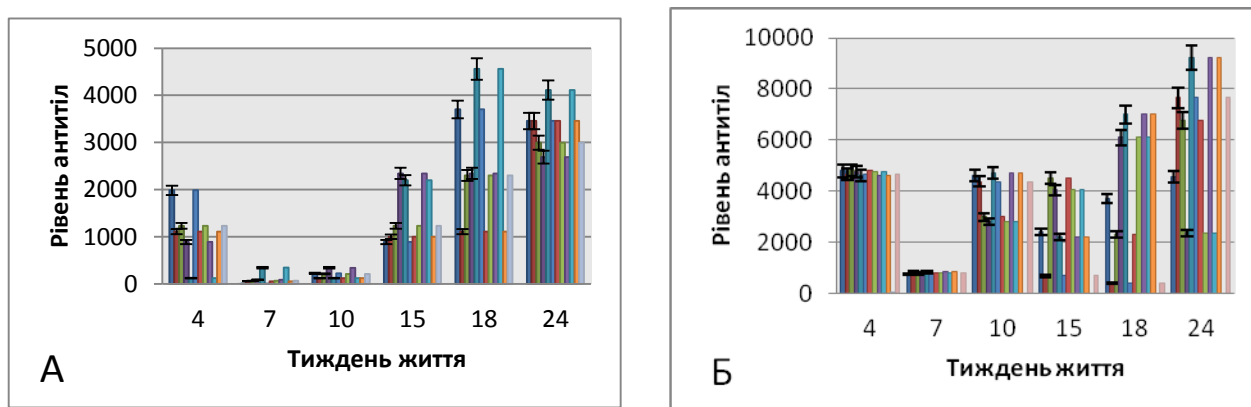


Рис. 4.2. Динаміка рівня антитіл до ВРРСС в сироватці крові тварин з господарств Київської (А) та Дніпропетровської (Б) областей.

Під час моніторингових досліджень вивчали динаміку постінфекційного імунітету. Появу антитіл унаслідок контакту тварин з польовим вірусом реєстрували, починаючи з 4-х тижневого віку. Було виявлено залежність між рівнем колостральних антитіл першого місяця життя тварини та моментом її інфікування. За низького рівня антитіл у 4-тижневому віці серологічна конверсія виникала у віці 10 тижнів. З огляду на ці данні, можна зробити висновок про інфікування тварин цього господарства приблизно на 6 – 7 тиждень їх життя (Рис 4.2. Б). На фоні відсутності колостральних антитіл у зразках сироватки крові поросят 4-тижневого віку (рис. 4.1. А) було

зафіксовано серологічну конверсію, починаючи з 7 тижня, що свідчить про раннє інфікування (період лактації або відлучення) на фоні відсутності гуморального материнського імунітету та за циркуляції польового вірусу в умовах їх утримання

Високий рівень антитіл у віці 4 тижнів (середній титр 6777 МО/л) досягав нульового рівня у віці 10 тижнів, а сероконверсія внаслідок контакту з польовим вірусом виникала у віці 15 тижнів (рис. 4.1. Б). За літературними даними, сероконверсія після інфікування виникає через 10 – 12 днів [9], тому з огляду на отримані результати, можна констатувати пізнє інфікування (період відгодівлі). Отже, для встановлення термінів інфікування тварин ВРРСС та відповідно можливості застосування превентивних заходів, для серологічних досліджень доцільно відбирати зразки сироватки крові тварин у віці 4, 7, 10 та 15 тижнів.

Під час аналізу зразків сироваток крові тварин у віці 18 та 24 тижнів оцінювали динаміку рівня та однорідності титрів антитіл. В усіх господарствах, де проводили дослідження, спостерігалась динаміка росту рівня постінфекційних антитіл до 24-тижневого віку тварин, що свідчить про інтенсивність інфекційного процесу впродовж вказаного терміну. Слід наголосити, що за наявності високих титрів антитіл до ВРРСС у віці 15 тижнів можливим є виключення з серологічного профілю аналізу зразків сироватки крові від 18-тижневих тварин.

Крім того, важливим є аналіз не лише рівня антитіл до ВРРСС, але й ступеню їх однорідності в умовах однієї вікової групи. Однорідність титрів чітко корелює з клінічною стабільністю господарства за ВРРСС.

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 необхідні 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.

РОЗДІЛ 5

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПАТОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

5.1. Характеристика праймерів, підібраних для проведення ЗТ-ПЛР з метою діагностики вірусу

З метою виявлення генетичного матеріалу вірусу РРСС у відібраних зразках було 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 на нуклеотидній послідовності геному референсного штамму Lelystadt та підраховано рівень гомології нуклеотидних послідовностей праймерів до матричної послідовності. На нуклеотидній послідовності вони розташовані таким чином, що ділянки гену, які будуть ампліфікуватись під час проведення ПЛР матимуть довжину 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, наприклад, праймери PRRSVp1_Nfor, PRRSVp2_Nrev характеризувалися відповідно 100% та 96,2% рівнем гомології до нуклеотидної послідовності гену нуклеопротеїну ізоляту DQ489311 (рис. 5.1 А). Рівень гомології праймерів PRRSVp1_Nfor, PRRSVp2_Nrev до нуклеотидної послідовності N-гену ізоляту DQ988980 ВРРСС становив 95,2% та 95,2% (рис. 5.1.Б), тоді як рівень гомології праймерів до згаданого гену ізоляту CS421743 становив 100% та 95,2% гомології відповідно (рис. 5.2.).

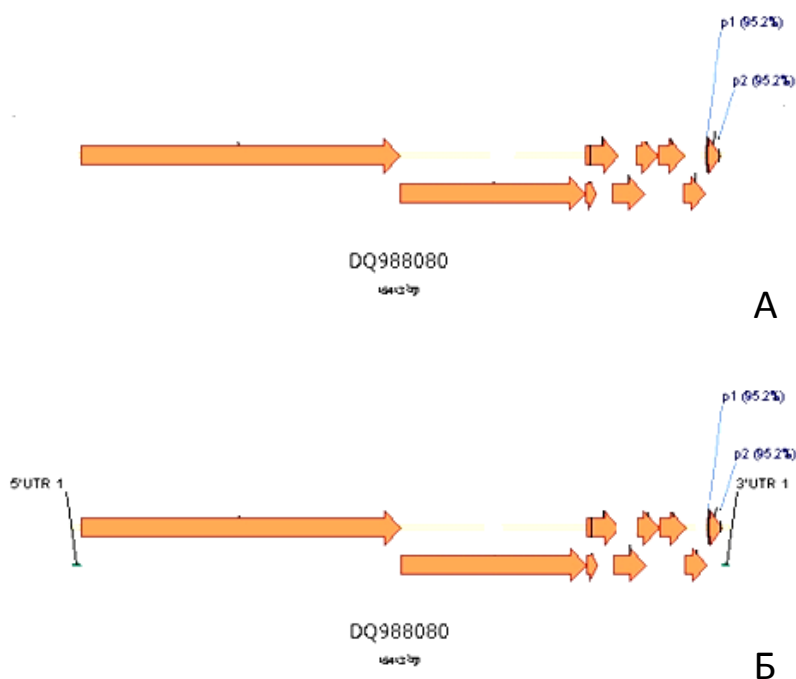


Рис. 5.1. Схема положення та рівень гомології праймерів, підібраних до N-гену на основі нуклеотидної послідовності референс-штаму ВРРСС, код доступу якого в базі даних GenBank – DQ489311 (А). Схема положення та рівень гомології праймерів, підібраних до N-гену на основі нуклеотидної послідовності референс-штаму ВРРСС, код доступу якого в базі даних GenBank – DQ988980 (Б).

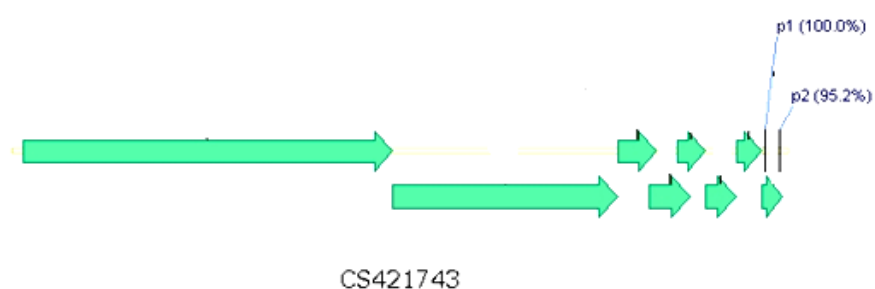


Рис5.2. Схема положення та рівень гомології праймерів, підібраних до N-гену на основі нуклеотидної послідовності референс-штаму ВРРСС, код доступу якого в базі даних GenBank – CS421743.

Положення в геномі матричної нуклеотидної послідовності, до якої гомологічні праймери PRRSVp1_Nfor, PRRSVp2_Nrev варіює. Так, на

приклад, для праймеру PRRSVp1_Nfor положення в геномі ізоляту DQ489311 буде від 14606 до 14626, для ізоляту BPPCC DQ988980 – 14938-14958, а для послідовності штаму BPPCC, код доступу якого в базі даних GenBank – DQ779791 ці значення будуть від 15045 до 15065.

Довжина пари праймерів до консервативної ділянки ORF7 становить 21 п.н. З них один праймер прямої орієнтації, а один – зворотньої. Характеристику використаних для проведення досліджень праймерів та їх нуклеотидні послідовності наведено у таблиці 5.1. Довжина продукту реакції становить 301 пару нуклеотидів.

Таблиця 5.1.

Характеристика праймерів, використаних для проведення ЗТ-ПЛР

Праймер	Орієнтація Праймеру	Нуклеотидна послідовність праймеру
PRRSVp1_NFor	Прямий	5'-CCAGCCAGTCAATCAACTGTG-3'
PRRSVp2_NRev	Зворотній	5'-GCGAATCAGGCGCACAGTATG-3'

Підібрані праймери перевіряли на наявність гомології з іншими послідовностями ДНК за допомогою BLAST.

Теоретична температура гібридизації моделювалась за допомогою програми Vector NTI Ver.10, США при стандартній концентрації солей в ПЛР буфері 50 мМ. Температура гібридизації для пари праймерів становила від 56 до 60°C. Підбір температури гібридизації надалі проводився емпірично, використовуючи різні температурні режими.

Ампліфікація специфічного продукту реакції довжиною 301 п.н. спостерігалась при температурі гібридизації 58 °C, проте при цьому утворювались неспецифічні продукти реакції, що вказує на необхідність підбору специфічних умов ПЛР шляхом зміни концентрації йонів магнію, кількості дНТФ.

Умови проведення для данної реакції були підібрані емпірично. Вони характеризувались високим рівнем специфічності і були наступними: температура гібридизації праймерів становила 58 °С, а кількість сульфату магнію – 0,75 мкл на зразок.

Була проведена апробація підібраної пари праймерів на зразку штаму вірусу РРСС (код доступу в базі даних Gene Bank DQ988980), який був наданий фірмою Нірга, зразку тканини легень від клінічно здорового поросся, зразку тканини легень від поросся, інфікованого ВРРСС (підтвердження інфікування проводилось гістологічним методом) та зразку негативного контролю.

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. 5.3), підтвердженого гістологічно.

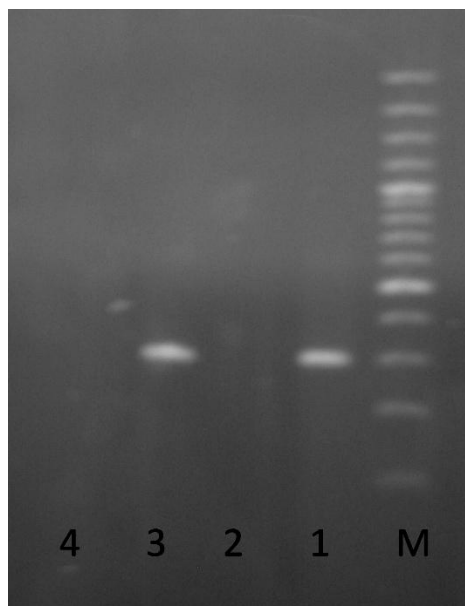


Рис. 5.3. Електрофореграма продуктів ампліфікації з використанням діагностичної пари праймерів PRRSVp1_Nfor, PRRSVp2_Nrev (продукт реакції 301 п.н.).

1 –штам ВРРСС(код доступу якого в базі даних GenBank DQ988980), 2 –зразок легень від клінічно здорової свині, 3 –зразок легень ураженого ВРРСС поросяти, 4 –негативний контроль;М – маркер молекулярних масFermentas, 100 bp.

Були виявлені характерні макрофагальні інфільтрати в інтерстиції та в просвіті легень, в тканині мозку зафіксовані периваскулярні макрофагально-лімфоцитарні інфільтрати, а також була виявлена гіпертрофія та гіперплазія альвеолоцитів другого порядку в легенях зразка позитивного контролю. 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 уражає ВРРСС, про що свідчить відсутність специфічного продукту реакції довжиною 301 п.н із зразка клінічно здорової тварини.

5.1.1.Виявлення ВРРСС у патологічному матеріалі органів свиней, в зразках крові, сперми та фаренгіальних змивів

Для виявлення вірусу ВРРСС у патологічному матеріалі, відібраному від хворих свиней, проводили ЗТ-ПЛР з метою ампліфікації консервативної ділянки N-гену. Для цього використали підбрану пару діагностичних праймерів PRRSVp1_Nfor, PRRSVp2_Nrev. У даному дослідженні було використано кДНК, синтезовану на основі РНК, виділеної з матеріалу тканин внутрішніх органів поросят першої та другої вікових груп. Таким чином, окремо досліджували тканини легень, лімфатичних вузлів, селезінки. Після проведення електрофоретичного аналізу в агарозному гелі продуктів ЗТ-ПЛР, специфічний продукт, довжиною 301 п.н. було зареєстровано в зразках тканин легень та лімфатичних вузлів (№04, 05 07, 08, 010 та № 011), в зразках крові та фаренгіальних змивах свиноматок (№ 013, 014, 016) та в зразках сперми хряків(№018). Проте, в зразках тканин селезінки (№03, 06, 09 та 013), легень та лімфатичних вузлів (№ 01, 02)зразку сперми (№017), в зразку крові свиноматок (№015) продукти реакції були відсутні (рис. 5.4 А, Б, рис 5.5).

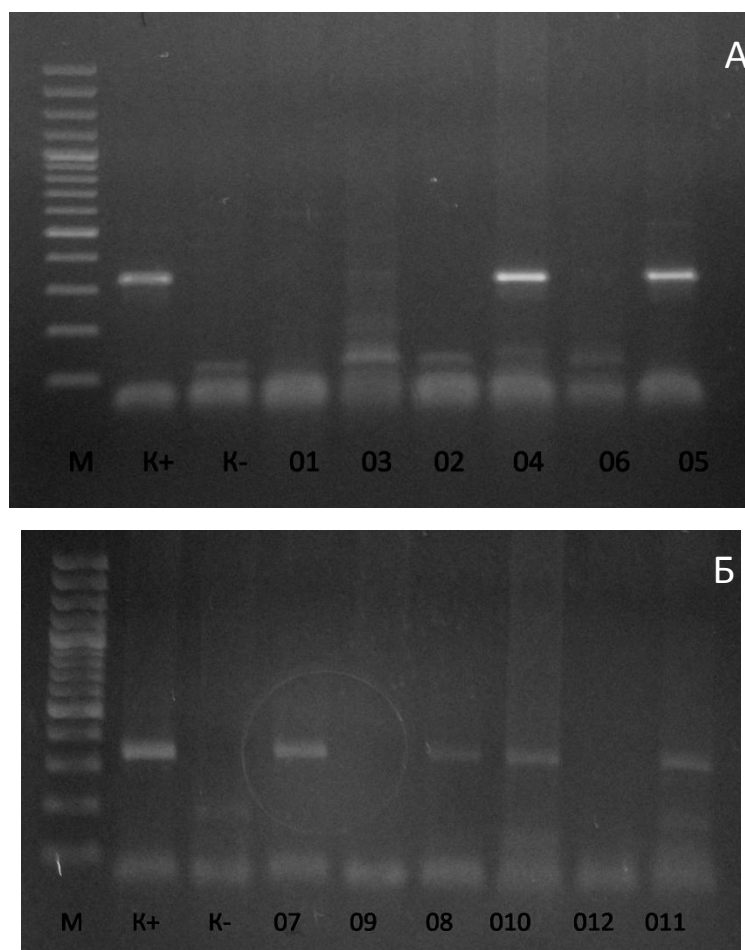


Рис 5.4. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами до консервативної ділянки N-гену PRRSVp1_Nfor, PRRSVp2_Nrev (продукт реакції 301 п.н.).

01 – об'єднаний матеріал тканини легень групи 1.1; 02 – об'єднаний матеріал тканини лімфатичних вузлів групи 1.1; 03 – об'єднаний матеріал тканини селезінок групи 1.1; 04 – об'єднаний матеріал тканини легень групи 1.2; 05 – об'єднаний матеріал тканини ліфатичних вузлів групи 1.2; 06 – об'єднаний матеріал тканини селезінок групи 1.2; М – маркер молекулярних macFermentas, 100 bp; K+ - позитивний контроль; K- - негативний контроль; 07 – об'єднаний матеріал тканини легень групи 2.1; 08 – об'єднаний матеріал тканини лімфатичних вузлів групи 2.1; 09 – об'єднаний матеріал тканини селезінок групи 2.1; 010 – матеріал легень групи 2.2, 011 – матеріал ліфатичних вузлів групи 2.2; М – маркер молекулярних macFermentas, 100 bp; K+ - позитивний контроль; K- - негативний контроль

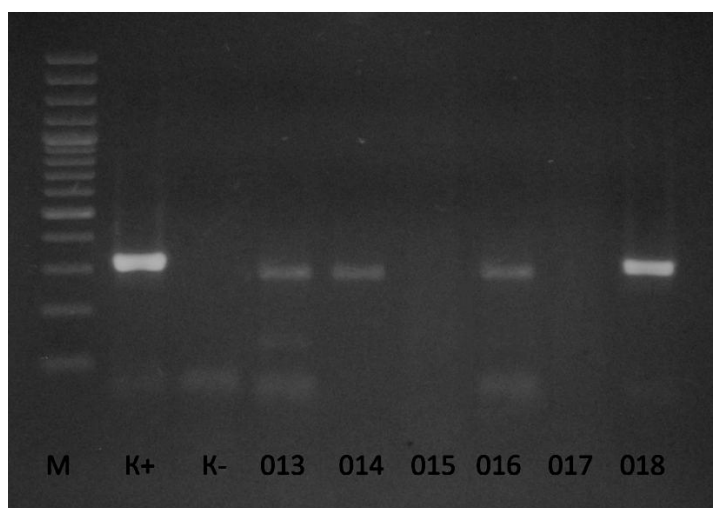


Рис 5.5. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами до консервативної ділянки N-гену PRRSVp1_Nfor, PRRSVp2_Nrev (продукт реакції 301 п.н.).

013 – об'єднаний матеріал крові групи 3.1; 014 – об'єднаний матеріал фаренгіальних змивів групи 3.1; 015 – об'єднаний матеріал крові групи 3.2.; 016 – об'єднаний матеріал фаренгіальних змивів групи 3.2; 017 – об'єднаний матеріал сперми групи 4.1, 018 – об'єднаний матеріал сперми групи 4.2; M – маркер молекулярних мас; K+- позитивний контроль; K- - негативний контроль.

Отже, результати досліджень засвідчують, що в об'єднаних зразках тканин органів поросят першої вікової групи Дніпропетровської області та другої вікової групи Київської та Дніпропетровської областей, що досліджувались, ВРСС був присутній у тканинах легень та лімфатичних вузлів. Це можна пояснити тропністю згаданого збудника до клітин вказаних органів та накопиченням його у великій кількості. Таким чином, можна підсумувати, що для діагностики даного збудника доцільно відбирати зразки легень та лімфатичних вузлів. Було встановлено, що в об'єднаних зразках фаренгіальних змивів від свиноматок Київської та Дніпропетровської областей, ВРСС був присутній в обох зразках. При цьому дослідження об'єднаних зразків крові показали відсутність специфічного продукту реакції ЗТ-ПЛР в зразку крові свиноматок Дніпропетровської області. Отож для прижиттєвої діагностики найбільш інформативними будуть зразки

фаренгіальних змивів та сперми. При використанні зразків крові є ймовірність псевдонегативних результатів за відсутності віремії у тварини, що виключає можливість виявлення персистентної інфекції.

Слід зазначити, що електрофоретичний аналіз продуктів ЗТ-ПЛР дозволив зареєструвати наявність специфічних продуктів реакції довжиною 301 пара нуклеотидів у об'єднаних зразках від свиней всіх вікових груп з господарства Дніпропетровської області, а також в зразках від поросят групи 2.1, які наведені у додатку 1, в фаренгіальних змивах та крові свиноматок з господарства Київської області. Натомість, в зразках сперми хряків з господарства Київської області вказаний вірус був відсутнім. Наступним кроком було встановлення кількості інфікованих тварин в кожній групі, в якій були виявлені специфічні продукти реакції. Для виявлення ВРРСС в поросят першої та другої вікової групи використали об'єднаний матеріал тканин легень та лімфатичних вузлів кожного окремого зразка.

Так, в групах 1.2 та 2.2 Дніпропетровської області було виявлено специфічний продукт, довжиною 301 п.н., в об'єднаних зразках тканин легень та лімфатичних вузлів чотирьох поросят з п'яти, тоді як в зразках №19, 21, 58, 60 продукт реакції був відсутній. У групі 2.1 Київської області була зафіксована гомогенність результату – специфічний продукт реакції, довжиною 301 п.н., був виявлений у всіх зразках, що досліджувались.

При дослідженні зразків крові та фаренгіальних змивів свиноматок Київської області продукт реакції був зафіксований у трьох з п'яти випадків досліджуваної крові та у всіх зразках змивів, що свідчить про наявність віремії у свиноматок №1, 2, 4 та вірусоносійства свиноматок №3, 5. При електрофоретичному аналізі продуктів ЗТ-ПЛР дозволив виявити специфічний продукт реакції, довжиною 301 п.н., в двох зразках із п'яти з фаренгіальних змивів свиноматок та трьох з п'яти зі сперми хряків Дніпропетровської області. Відсутність продуктів реакції у зразку негативного контролю, є свідченням адекватності результатів проведеного дослідження.

Отримані результати засвідчують, що існує залежність між місцем відбору та виявленням ВРРСС, однак кореляції між наявністю збудника та віком тварин встановлено не було. Також необхідно відмітити, що в поросят першої вікової групи (Дніпропетровської та Київської областей) були виявлені однакові клінічні та патоморфологічні зміни, характерні для тварин, інфікованих ВРРСС, проте в поросят Київської області групи 1.1 при електрофоретичному аналізі не було виявлено специфічного продукту реакції ЗТ-ПЛР (в об'єднаних пробах), що свідчить про відсутність вірусу в патологічному матеріалі. В спермі хряків Дніпропетровської області, що не мали жодних клінічних ознак, був виявлений специфічний продукт реакцій ЗТ-ПЛР, що свідчить про наявність збудника в організмі тварини. З цього можна зробити висновок, що аналіз лише клінічних та патолого-анатомічних ознак є недостатнім для підтвердження чи спростування наявності захворювання репродуктивного та респіраторного синдрому свиней.

5.2. Апробація та вдосконалення умов проведення ПЛР для детекції ORF-5

У дослідженнях геному вірусу ВРРСС дослідники варіабельності геному збудника [49, 50, 51] показали, що нуклеотидна послідовність гіперваріабельного регіону ORF 5 відрізняється у різних штамів вірусу, 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.

На першому етапі досліджень на основі аналізу літератури нами було обрано дві пари праймерів для ампліфікації ORF 5, послідовності яких наведено в таблиці 5.2. Праймери ORF5_F1 та ORF5_R1 були описані Bayliss та співавт. [125]. Продукт ампліфікації із використанням згаданої пари праймерів має довжину 860 п.н. Для підвищення чутливості реакції використовували ще одну пару праймерів ORF5_F2 та ORF5_R2. Останні

були розроблені для ампліфікації внутрішнього регіону амплікону, отриманого за допомогою праймерів ORF5_F1 та ORF5_R1. Унаслідок другого раунду ПЛР утворюється продукт довжиною 721 п.н. [125].

Обрані нами для проведення ПЛР праймери, аналізували *in silico* за допомогою програми VectorNTIAdvanced 11 (Invitrogen, США), для визначення рівня гомології праймерів до гену VP2 використовували доступні у базі GeneBank нуклеотидні послідовності ORF5, а саме 15 ізолятів ВРРСС генотипів 1, 2.

Загалом було визначено рівень гомології праймерів до послідовностей гену геному ORF 5 п'ятнадцяти штамів вірусу.

На підставі проведеного аналізу можна підсумувати, що описані пари праймерів характеризуються достатніми рівнями специфічності до нуклеотидних послідовностей ізолятів вірусу.

Так, праймери ORF5_F1 та ORF5_R1 характеризувалися відповідно 82,5% та 83,3% рівнем гомології до нуклеотидної послідовності гену нуклеопротейну референтного штаму Lelistad. Оскільки ORF 5 є вкрай варіабельною, така гомологія праймерів є допустимою. Тоді як пара праймерів ORF5_F2 та ORF5_R2 характеризувалися відповідно 97,6% та 97,6% рівнем гомології до нуклеотидної послідовності гену нуклеопротейну ізоляту DQ489311 (.рис 5.6. А). На нуклеотидній послідовності вони розташовані таким чином, що ділянки гену, які будуть ампліфікуватись під час проведення ПЛР матимуть довжину 860 п.н. для праймерів ORF5_F1 та ORF5_R1 та 721 п.н. для ORF5_F2 та ORF5_R2.

Враховуючи високий рівень варіабельності вірусу необхідно зазначити про відмінності в рівні гомології праймерів до матричної послідовності різних ізолятів. Так, рівень гомології праймерів ORF5_F1 та ORF5_R1 до нуклеотидної послідовності ORF5-гену ізоляту Lena ВРРСС становив 82,5,2% та 87,5% для першої пари праймерів, для другої пари праймерів - 97,6 % та 92,9 %, відповідно (рис 5.6 Б.). Рівень гомології праймерів до згаданого гену ізоляту CS421743 становив 82,5% та 83,3%

гомології – для першої пари праймерів та 97,6% для другої пари праймерів (рис.5.10.). Рівень гомології праймерів ORF5_F1 та ORF5_R1 до нуклеотидної послідовності ORF5-гену ізоляту DQ489311 ВРРСС становив 82,5% та 83,3% для першої пари праймерів, для другої пари праймерів - 97,6% та 97,6% відповідно (рис. 5.6.).

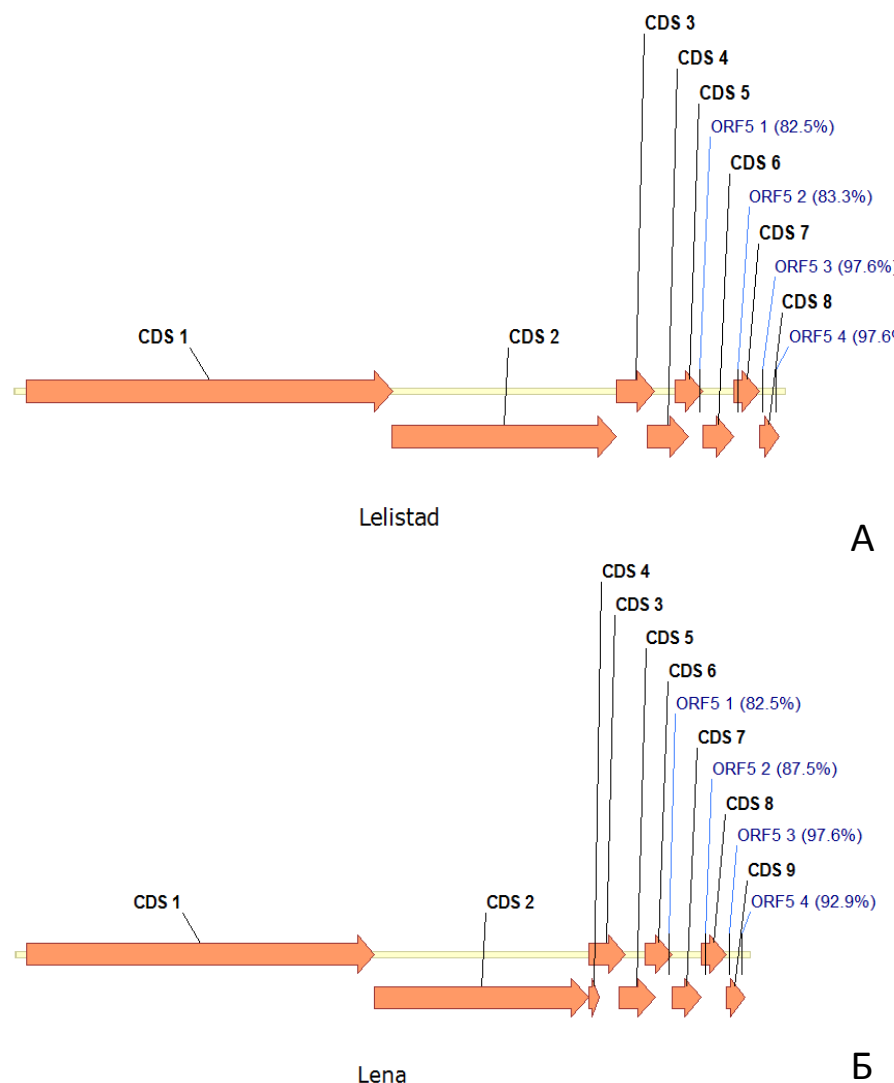


Рис. 5.6. Схема положення та рівень гомології праймерів, підібраних до ORF 5 на основі нуклеотидної послідовності референс-штаму ВРРСС, код доступу якого в базі даних GenBank – Lelistad (А). . Схема положення та рівень гомології праймерів, підібраних до ORF 5 на основі нуклеотидної послідовності референс-штаму ВРРСС, код доступу якого в базі даних GenBank – Lena (Б).

Враховуючи високий рівень варіабельності вірусу необхідно зазначити про відмінності в рівні гомології праймерів до матричної

Рівень гомології праймерів ORF5_F1 та ORF5_R1 до нуклеотидної послідовності ORF5-гену ізоляту DQ489311 BPPCC становив 82,5% та 83,3% для першої пари праймерів, для другої пари праймерів - 97,6% та 97,6% відповідно (рис. 5.7.Б).

Загалом, було використано 2 пари праймерів. З них 2 праймери прямої орієнтації, а 2 – зворотньої. Характеристику використаних для проведення досліджень праймерів та їх нуклеотидні послідовності наведено у таблиці 5.2. Довжина продукту реакції першої та другої пари праймерів становить 860 пар нуклеотидів та 721 пару нуклеотидів відповідно.

Таблиця 5.2.

Характеристика праймерів, використаних для проведення ЗТ-ПЛР ділянки гену геному ORF5 [999]

Праймер	Орієнтація Праймеру	Нуклеотидна послідовність праймеру
ORF5_F1	Прямий	5'CCGTCTGTGATGAGRTGGGC-3'
ORF5_R1	Зворотній	5'-GGA YACTTTTAGGGC RTATATCAT-3'
ORF5_F2	Прямий	5'-CCAGCCAGTCAATCARCTGTG-3'
ORF5_R2	Зворотній	5'-GCGAATCAGGCGCACWGTATG-3'

Підібрані праймери перевіряли на наявність гомології з іншими послідовностями ДНК за допомогою BLAST.

Теоретична температура гібридизації проводилась за допомогою програми Vector NTI Ver.10, США при стандартній концентрації солей в ПЛР буфері 50 мМ. Температура гібридизації для першої пари праймерів становила від 51 до 55 °С, для другої – 50 до 53. Підбір температури гібридизації надалі проводився емпірично, використовуючи різні температурні режими.

Умови підібрані емпірично для реакції з використанням першої пари праймерів, що характеризувались високим рівнем специфічності, були

наступними: температура гібридизації праймерів становила 52 °С, а кількість сульфату магнію – 0,75 мкл на зразок. Для другої пари праймерів умови для реакції були такі ж, як для першої: температура гібридизації – 52 °С, а кількість сульфату магнію – 0,75 мкл на зразок.

Була проведена апробація підібраних пар праймерів на зразках референт штаму вірусу РРСС (код доступу в базі даних Gene Bank DQ988980), що був наданий фірмою Nipra, зразку тканини легень від клінічно здорового поросся, зразку тканини легень від поросся, 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 ВРРСС, 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, яку вражає ВРРСС, про що свідчить відсутність специфічного продукту реакції довжиною 721 п.н із зразка клінічно здорової тварини.

5.3. Філогенетичний аналіз ізолятів за ORF-5

З огляду на велику різноманітність та високу варіабельність штамів ВРРСС, з'ясування походження досліджених ізолятів вірусу є необхідним. Також, аналіз походження виявлених ізолятів є необхідним для застосування програм вакцинації тварин відповідно до епізоотичної ситуації, оскільки для захисту проти різних штамів необхідно використовувати найбільш

З огляду на вищевикладене, нами проведено визначення нуклеотидної послідовності гіперваріабельного регіону гену ORF5 українських ізолятів. Для молекулярно-біологічного були використані зразки з Волинської, Запорізької, Київської, Дніпропетровської та Черкаської областей Отриману послідовність порівнювали зі штамми зі Східної та Західної Європи, а також вакцинними штамми для встановлення спорідненості між ними та будували філогенетичне дерево за допомогою програми MEGA 6 (Рис. 5.8.). У результаті проведених досліджень було показано, що частина виявлених нами ізолятів вірусу формували окрему групу, та виявляли найвищий ступінь спорідненості з ізолятами Італії.

Результати секвнування зразка №3 (з Черкаської області) вказують на найбільшу спорідненість до іспанських ізолятів та вакцинного штамму іспанської вакцини. 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 штамму можуть вказувати на зміни в структурі вакцинного штамму вірусу та його реверсії до дикого типу.

Аналіз нуклеотидної послідовності ізоляту з Черкаської області вказує на його спорідненість до італійського ізоляту ВРРСС. Джерелом тварин для поповнення поголів'я свиней в данному господарстві є частково тварини з господарств України.

Ізолят №4, що був виділений від тварини із Запорізької області, має найбільшу спорідненість до італійського та білоруського ізолятів. З точки зору професора з референт-лабораторії по ВРРСС Tomasz Stadejek (усне спілкування), цей ізолят міг виникнути внаслідок розвитку одночасної ВРРСС інфекції двох штамів в організмі однієї тварини. Незрозумілим залишається лише шлях інфікування тварин господарства, враховуючи закритий цикл вирощування тварин. Єдиним джерелом генетичного матеріалу, що не належить господарству є сперма хряків з США. На території

США детектують циркуляцію Північно-Американського генотипу ВРРСС, циркуляції вищезазначених подібних до італійських та білоруських штамів ВРРСС не описується. Ввезення поглов'я тварин з Італії та Білорусії на територію господарства не проводилось. Цікавим є факт високого рівня гомології цього ізоляту із Запорізької області з ізолятом, що був виділений в Київській області. Можливо, саме господарство Київської області, де не відбувається такого строго контролю за рухом тварин та біобезпекою є джерелом поширення вірусу в данному випадку.

Високий рівень спорідненість до білоруських ізолятів ізолятів з Київської та Запорізької областей є очікуваним, оскільки жорсткий контроль торговельного руху тварин між Радянським Союзом та Європейськими країнами призвели до формування окремої, відмінної від заходноєвропейської групи штамів, що характерні Східній Європі. З іншого боку, Tomasz Stadejek зазначав ризик виникнення абсолютно нових штамів ВРРСС саме в країнах Східної Європи після активізації торговельних відносин та активного ввезенню тварин із Західної Європи до країн пострадянського простору. За наявності циркуляції в умовах однієї закритої популяції (господарства) двох штамів вірусу, можливим є виникнення абсолютно нового штаму не лише за генотипом, проте й за фенотипом. Неочікуваним є спорідненість саме до італійських ізолятів, адже активного ввезення тварин з цієї частини Європи не спостерігається.

Філогенетичний положення ізоляту №2 вказує на його спорідненість до штамів ВРРСС Іспанії та Італії.

Незважаючи на те, що основними джерелами поповнення поголів'я свиней господарств є тварини з Данії та Німеччини, постає питання в джерелах розповсюдження саме Італійських та Іспанських штамів ВРРСС. Слід також зазначити, що високий рівень гомології між італійськими та іспанськими штамми ВРРСС, а також наявність циркуляції українських ізолятів гомологічних до них, вказує на доцільність використання вакцинних штамів саме цього походження.

Таким чином, філогенетичний аналіз українських ізолятів чітко ілюструє гетерогенність популяції вірусу РРСС. Ці данні є першими опублікованими результатами філогенетичного аналізу українських ізолятів ВРРСС. Слід наголосити на тому, що за попередніми прогнозами, очікувалась висока спорідненість українських штамів з білоруськими. Проте за нашими даними українські ізоляти мають спільне походження зі штамми з Росії, Іспанії та Італії.

РОЗДІЛ 6

ДІАГНОСТИКА ВІРУСУ РЕПРОДУКТИВНОГО ТА РЕСПРАТОРНОГО СИНДРОМУ СВИНЕЙ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ГІСТОЛОГІЧНИХ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ МЕТОДІВ

Враховуючи високий рівень варіабельності вірусу, необхідним етапом дослідження є встановлення патогенезу вірусу на рівні тканин, що дозволить з'ясувати на скільки зміни в геномі впливають на патогенез ВРРСС, що циркулює в Україні. Окрім цього, з'ясування характерних для українських ізолятів ВРРСС патогістологічних змін в тканинах органів надасть можливість використання гістологічного методу у діагностиці ВРРСС. Можливість отримання хибно негативних результатів необхідним є комплексний підхід до діагностики ВРРСС.

З огляду на те, що ВРРСС виявлений в 19 областях України та спостерігається тенденція до його поширення на території України, нами було проведено дослідження для розробки підходів та впровадження методів діагностики цього захворювання. Наявність інших збудників захворювань свиней, що спричиняють схожу до РРСС клінічну картину [3, 126], імуносупресивний вплив ВРРСС, що в свою чергу призводить до розвитку ко-інфекцій, - все це зумовлює необхідність диференційної діагностики та встановлення першопричини розвитку патології. Одним з методів, який був нами запропонований для розв'язання цих завдань став саме гістологічний метод дослідження тканин органів інфікованих тварин.

Для з'ясування характерних для українських ізолятів ВРРСС патогістологічних змін в тканинах органів та для подальшого використання гістологічного методу у діагностиці ВРРСС 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.

У нашому дослідженні цитопатичні зміни, спричинені ВРРСС, були зафіксовані в легенях тварин. Слід зазначити, що одержані нами дані підтвердили раніше опубліковані результати [68, 78]. Так, в зразках тканини легень були виявлені різного ступеня ураження інтерстиції з характерними макрофагальними інфільтратами, заповненням просвіту альвеол клітинним детритом, білковим ексудатом та макрофагами (рис. 6.1. А). Характер поширення патогістологічних змін у паренхімі легень досліджуваних зразків повністю відповідає раніше опублікованим результатам.

Також, в легенях тварин, інфікування ВРРСС яких підтвердили методом ПЛР, була виявлена значна кількість альвеолоцитів другого порядку з ознаками гіпертрофії та гіперплазії, що свідчить про специфічність та показовість цієї ознаки у постановці діагнозу ВРРСС гістологічним методом дослідження (рис. 6.1. Б).

У досліджених нами зразках легень від тварин, інфікованих ВРРСС, не було виявлено ознак наявності/формування синцитій, хоча Rossow та співавтори зазначали про формування синцитій в паренхімі легень, як про характерну ознаку ВРРСС. Ця розбіжність в результатах може пояснюватись різницею патогенезу штамів, які циркулюють в Західній та Східній Європі [129], або ж все ж таки утворення синцитій не є специфічною ознакою, яку можна використовувати у діагностиці ВРРСС гістологічним методом.

Необхідно наголосити на тому, що в наших дослідженнях характерних ознак розвитку міокардитів виявлено не було, хоча Rossow та співавтори відзначали наявність змін в серцевому м'язі.

При дослідженні тканин мозку лише в одному зразку виявили зміни, характерні для ураження тварини ВРРСС, а саме периваскулярні лімфоцитарні інфільтрати. Слід наголосити на тому, що характерних для

ВРРСС змін в мозку таких як лімфоцитарно-гістіоцитарних інфільтратів, окрім периваскулярних лімфоцитарних інфільтратів, не було виявлено. При імуногістохімічному дослідженні зразка мозку, з вищезазначеними змінами, антиген збудника нами не було детектовано. Це свідчить про непричетність ВРРСС до розвитку вищевказаної патології в мозку, а також може вказувати на не специфічність, описаних раніше, змін в мозку при ВРРСС інфекції.

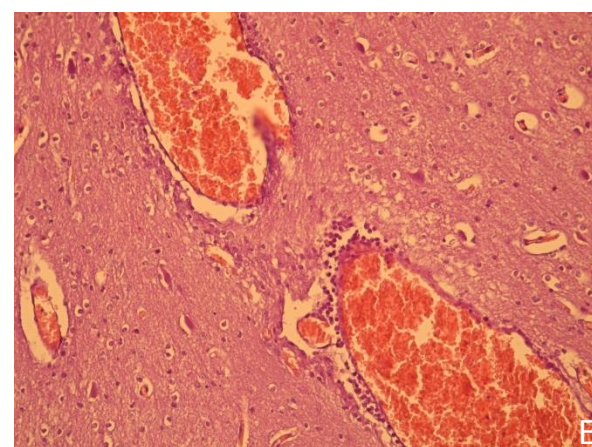
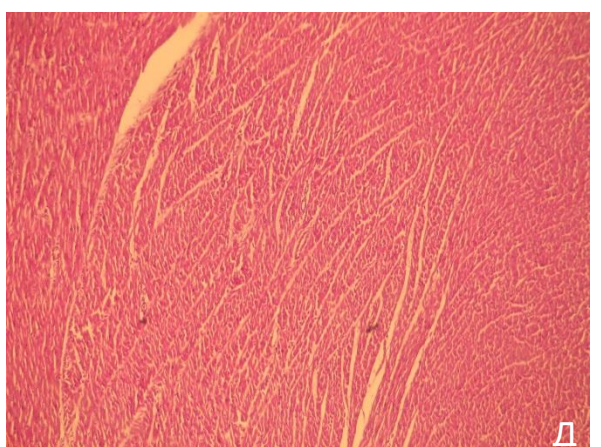
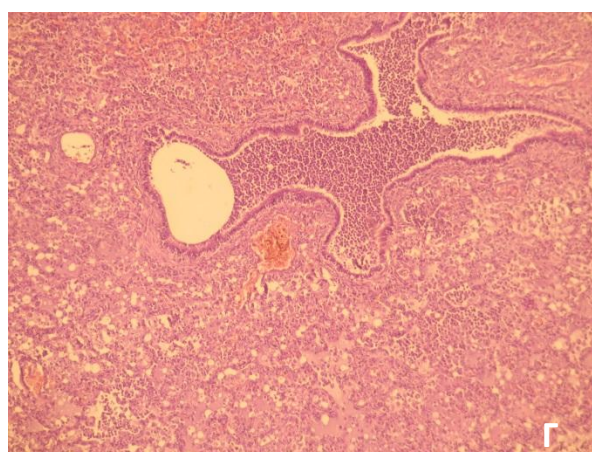
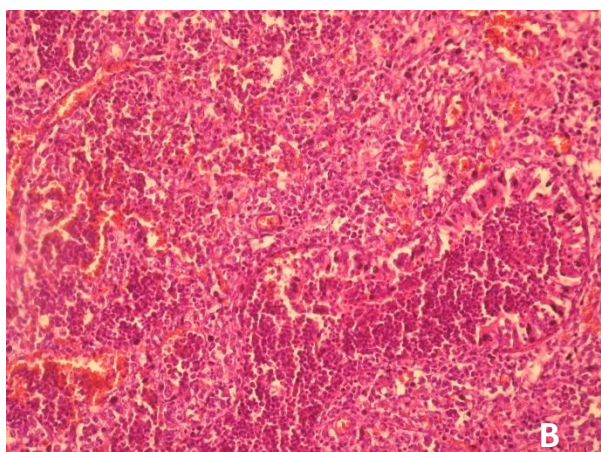
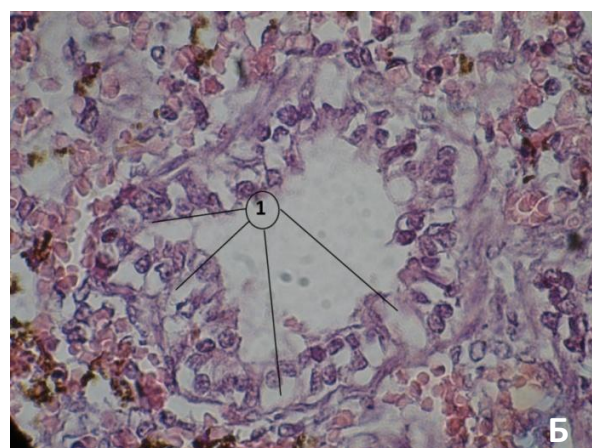
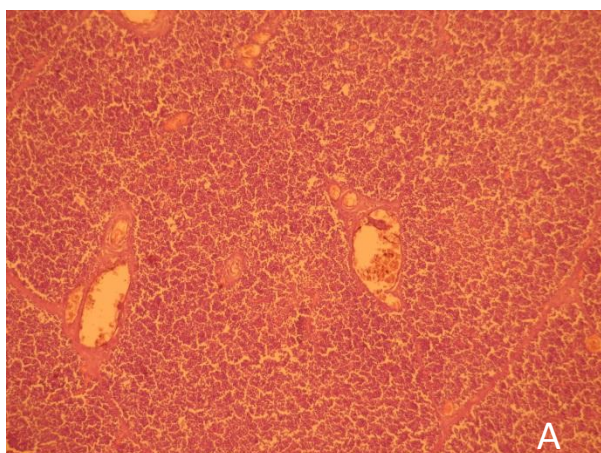


Рис 6.1. Препарат тканини легень (А-Г) зразків від клінічно хворих на ВРРСС тварин, фарбування еозином та гематоксиліном x100 (А, Г,Д), x400(В, Е), x1000 (Б).

Б 1 – гіперплазія, гіпертрофія альвеолоцитів другого порядку.

При імуногістохімічному дослідженні зразка мозку, з вищезазначеними змінами, антиген збудника нами не було детектовано. Це свідчить про непричетність ВРРСС до розвитку вищевказаної патології в мозку, а також може вказувати на не специфічність, описаних раніше, змін в мозку при ВРРСС інфекції. При імуногістохімічному дослідженні зразка мозку, з вищезазначеними змінами, антиген збудника нами не було детектовано. Це свідчить про непричетність ВРРСС до розвитку вищевказаної патології в мозку, а також може вказувати на не специфічність, описаних раніше, змін в мозку при ВРРСС інфекції.

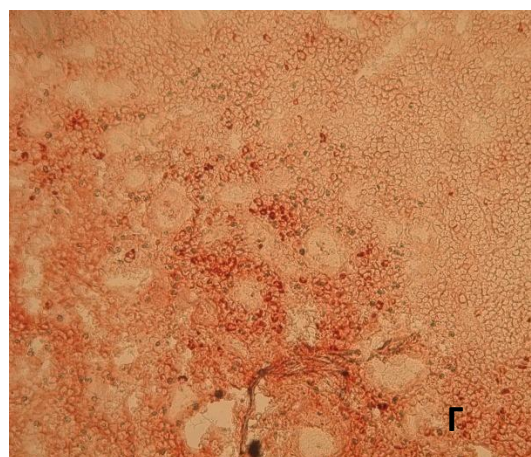
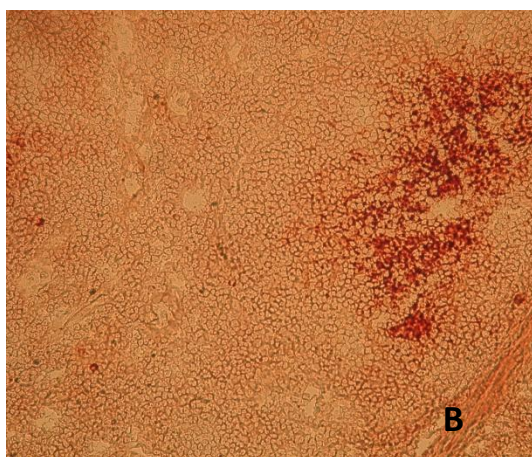
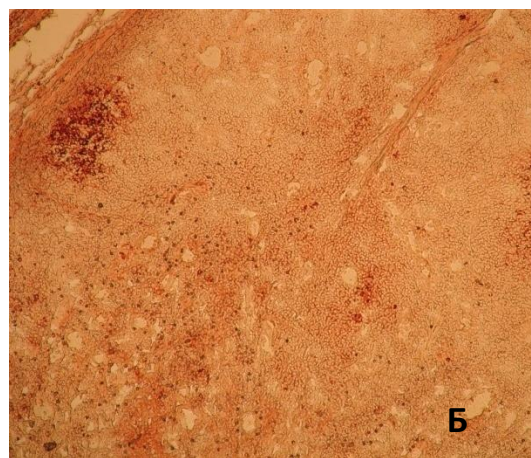
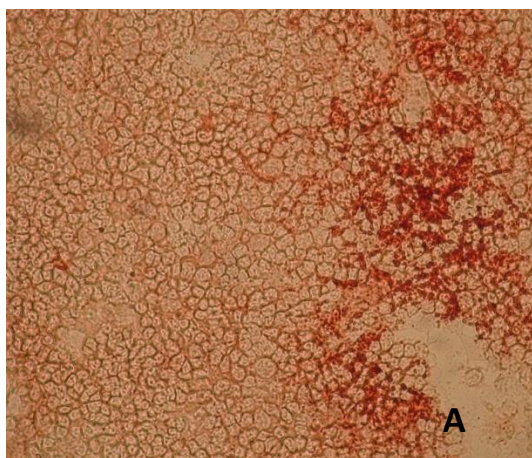


Рис 6.2. Препарат зразка від абортваного плоду тканини тимусу (А, В) та легень (Б, Г), імуногістохімія x 400 (А), x100 (Б, В), x200 (Г).

Раніше опубліковані дані про специфіку патогістологічних змін при інфікуванні вірусом ВРСС та характер виявлених нами у зразках легень змін свідчить про те, що лише у 23% випадків ВРСС був причиною розвитку патологій репродуктивного та респіраторного тракту. Локалізація патогістологічних змін та їх характер вказує на те, що матеріал був відібраний на ранніх термінах інфікування тварини ВРСС.

Для підтвердження причетності ВРСС до виникнення патолого-морфологічних змін та унеможливлення хибно позитивних результатів, ми паралельно проводили імуногістохімічне дослідження для виявлення антигену збудника безпосередньо в тканині органів (рис. 6.3.). Антиген ВРСС у зразках абортваних плодів у найбільшій кількості виявлявся в тканині тимусу, поодинокі в легенях (рис. 6.3.). У випадку респіраторного прояву ВРСС, найбільшу кількість антигену детектували в легенях та трахіобронхіальних лімфатичних вузлах (рис 6.3.).

Результати наших досліджень вказують на можливість та доцільність використання патоморфологічного дослідження для диференційної діагностики ВРСС у складних клінічних випадках. Основними патолого-морфологічними змінами при інфікуванні ВРСС 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 патоморфологічних змін, що вважаються, за раніше опублікованими даними, класичними для ВРСС, як, наприклад, інфільтрація м'яза серця макрофагами і лімфоцитами та утворення синцитій подібних клітин у паренхімі легень. Враховуючи це, необхідним є виключення наявності молекулярно-біологічних аспектів різності патогенезу ВРСС, що циркулює в Україні, з раніше дослідженими штамми.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней є представником роду *Arterivirus*, родини *Artereviridae*, порядку *Nidovirales*. Цей вірус поділяють на два генотипи Північно-Американський (тип 2) та Європейський (тип 1) генотипи, які мають лише 63% ідентичності на геномному рівні [2, 7, 8, 9, 10, 11]. ВРРСС характеризується найвищим рівнем варіабельності серед усіх РНК вірусів тварин загалом, а найбільшу генетичну мінливість вірусу спостерігають у Східній Європі, що значно ускладнює контроль за даним патогеном [11, 15, 16, 129].

Територіальна поширеність ВРРСС, тяжкість його впливу на сприйнятливі популяції тварин, виникнення непередбачуваних епідемічних ситуацій – всі ці факти стали причиною внесення ВРРСС до списку особливо небезпечних захворювань МЕБ [5, 6].

Згідно класифікації інфекційних агентів, розробленої Орлянкіним Б.Г. [130, 131], ВРРСС відносять до першої групи респіраторних патогенів. До цієї групи респіраторних патогенів відносять патогени, що самостійно (без додаткового впливу інших сприйнятливих факторів) спричиняють ураження легень тварин. Роль ВРРСС в розвитку респіраторного симптомокомплексу різниці в різних країнах світу в залежності від епізоотичної ситуації, умов утримання та рівня біологічної безпеки [132]. Низкою науковців був проведений аналіз етіологічних чинників респіраторного симптомокомплексу в свиногосподарствах різних частин світу. Відтак ВРРСС в Азії був причиною розвитку респіраторних захворювань в 63% випадків, в Європі – 35%, Китаї – 68,9 %, тоді як в Канаді частота ВРРСС становила лише 22% [132, 133, 134, 135]. Циркуляція вірусу репродуктивного та респіраторного синдрому свиней підтверджена в більшості країнах-виробниках свинини. Генетичний матеріал збудника детектували у Франції, Німеччині, Бельгії, Данії, Італії, Чехії, Латвії, Литві, Росії, Білорусії,

Казахстані, Вірменії, Китаї, Японії, В'єтнамі, Тайланді, США та ін. [15,16, 17, 18, 136]. В Україні перші відомості про детекцію ВРРСС в Україні датуються 1994 роком [138], проте слід також зазначити, що до 2007 року жодних інших відомостей про детекцію вірусу, специфічних антитіл до нього або ж клінічних проявів не було опубліковано. Перше розширене дослідження з питань поширеності ВРРСС в Україні було опубліковано в 2007 році. Гаврасьєва та її колеги в 2006-2007 дослідили сироватку крові від свиней зі свиного господарств 16 регіонів України. За їх даними циркуляція вірусу була виявлена в 12-ти з них [119]. Оскільки вчені вважали, що дикі кабани є головним джерелом поширення ВРРСС, в 2014 році Ситюком М.П. та його колегами були опубліковані результати моніторингових досліджень щодо серопревалентності патогену в популяції диких кабанів [139-140]. До дослідження було включено 6817 зразків сироватки крові, що відбирались у щорічні сезони полювання на диких кабанів з 2001 по 2014 роки. З них лише 162 зразки були позитивні. Ситюк М.П. показав, що поодинокі серологічно позитивні тварини дикої фауни України були вже в 2001 році. Проте слід зазначити, що середній рівень серологічної превалентності серед диких кабанів за 13 років в середньому становив від 2,08 % до 3,41 % [139, 140, 141]. Одержані результати вказують на низький рівень поширеності серед поголів'я диких кабанів. Також необхідно додати, що в дослідження було включено зразки з 20 областей України, проте в різні роки дослідження проводились не в усіх областях, тому неможливо прослідкувати динаміку поширення в регіонах. Цікавим є також той факт, що в двох досліджуваних областях, а саме Закарпатській та Кіровоградській, серологічно позитивних за ВРРСС тварин не детектовано [139, 140, 142].

В 2012 році Неволько та колегами була опублікована інформація щодо поширення ВРРСС серед домашніх свиней. За їх результатами ВРРСС циркуляція не була детектована в 12-ти областях України [142, 143]. Однак необхідно зазначити, що кількість зразків з різних регіонів відрізнялась.

Загалом за останні роки була проведена низка досліджень поширеності ВРРСС на території України [119, 139, 140, 143]. Проте ретроспективного дослідження поширеності цього патогену серед поголів'я промислових свиней проведено не було.

В нашому дослідженні поширення ВРРСС в Україні було використано 97324 сироватки крові. В період 2005-2009 роки ми провели серологічне дослідження тварин зі 166 ферм усіх регіонів України з 2010 по 2014 рік включно ми дослідити сироватки крові тварин з 254 ферм 25-ти регіонів України. Необхідно додати проте, що близько 15 % ферм випали з нашого ретроспективного дослідження через їх закриття та деякі нововідкриті ферми були введені в дослідження пізніше протягом цього періоду. Саме через стрімкий розвиток свинарства в Україні, що призвів до інтенсифікації ввезення поголів'я свиней з-за кордону та швидкого росту поголів'я свиней в Україні, чисте ретроспективне дослідження провести було достатньо складно. Зважаючи на це нашою метою було прослідкувати тенденцію поширення збудника територією України за 10 років (з 2005 по 2014 рік включно).

Ми обрали для дослідження саме промислові поголів'я свиней не лише через брак інформації що до епізоотичної ситуації в промислових господарствах України. Більш вагомим аргументом є вищий ризик виникнення спалахів та розповсюдження ВРРСС у поголів'ях тварин, що утримуються в промислових умовах. На це є ряд причин: скупчене утримання свиней в обмеженому за площею приміщенні, безвигульне утримання свиноматок, недотримання норм освітлення, раннє відлучення поросят, формування неоднорідних за віком та мікрофлорою груп свиней, одноманітний концентратний тип годівлі [132, 133, 135].

В 2005 році ми провели перше в Україні серологічне дослідження крові промислових тварин з 18 областей України. Циркуляція ВРРСС виявили лише в Донецькій області та в Автономній республіці Крим. Слід наголосити, що в період 2002-2006 роки в Автономній республіці Крим не

було виявлено жодного серологічно позитивного дикого кабана і лише в 2007 році була детектована перша ВРРСС позитивна сироватка крові [139]. Данні дослідження сироваток від диких кабанів з Донецької області за 2005 рік відсутні.

В Київській та Житомирській областях в 2005 році ми виявили по одній серологічно-позитивній за ВРРСС пробі. Оскільки для серологічної тест-системи допускається похибка в результатах до 3 %. 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.

Загалом в 2006 році ми виявили серологічно-позитивних за ВРРСС тварин у 7-ми областях України. Також необхідно додати, що Гаврасьєва та її колеги також проводили своє дослідження поширеності ВРРСС в Україні протягом 2006-2007 років [119]. Беручи до уваги їхні результати 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 [119]. Оскільки патогенез ВРРСС характеризується тривалою персистенцією з можливістю виділення патогену зі слиною, повітряно-крапельним шляхом, спермою елімінація збудника з промислового поголів'я може бути лише шляхом

депопуляції, тому наявність серологічно позитивних тварин в промислових поголів'ях вказує на ВРРСС неблагополучне стадо [132, 134].

В 2008 остаточно нами було встановлено факт циркуляції ВРРСС також в Житомирській області. Якщо проаналізувати данні серопревалентності до ВРРСС популяції диких кабанів в цій області, то лише в 2004, 2005 роках було детектовано по одному ВРРСС позитивному дикому кабану, тоді як у зразках від диких тварин, відібраних в 2007-2009 роках, антитіл проти ВРРСС не було виявлено [139].

В 2009 році результати нашого серологічного моніторингу підтвердили наявність ВРРСС в господарствах Рівненської, Харківської та Кіровоградської областей. Необхідно зазначити, що за даними досліджень Неволько О.М та Ситюка М.П. в Кіровоградській області були відсутні серологічно позитивні за ВРРСС домашні свині та дикі кабани [139,143].

Всі вищевикладені результати свідчать про швидке поширення ВРРСС територією України. Відтак в 2005 році нами була детектована циркуляція ВРРСС лише в двох областях України, а в 2009 – у 19-ти областях. Також при порівняльному аналізі даних по серопревалентності серед промислових свиней з даними серед домашніх свиней та диких кабанів, можна прослідкувати більш швидке поширення ВРРСС серед поголів'я саме промислових тварин. Можливо, саме промислові тварини є тим фактором розповсюдження патогену територією України, а не дикі кабани та свійські тварини. Для з'ясування цього питання необхідно провести філогенетичний аналіз не лише ізолятів ВРРСС, що були виявлені від свиней з промислових господарств, проте й від диких кабанів та домашніх свиней.

В 2010 році ми спостерігали значне збільшення кількості господарств з серологічно-позитивними за ВРРСС тваринами. Причиною такого різкого росту частоти виявлення ВРРСС в господарствах могло бути зумовлене двома чинниками: швидким поширенням ВРРСС в Україні внаслідок недотримання правил біобезпеки та ввезення нових поголів'їв тварин з-за

кордону але також, в певній мірі, ця тенденція може бути пов'язана зі зміною серологічної тест-системи на більш чутливу.

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 дослідження сироваток тварин з цієї ферми [9, 144]. Ми вважали за необхідне повторити дослідження та встановити постійний серологічний моніторинг для повного контролю та аналізу епізоотичної ситуації в господарстві у випадку детекції поодиноких сироваток крові з високими титрами антитіл до ВРРСС у тварин з ферм, де раніше не була встановлена циркуляція збудника,

Серологічні дослідження в 2010 – 2014 роками в усіх областях України. Сироватки крові з 254 промислових господарств України були нами включені до дослідженняю За отриманими нами даними циркуляція ВРРСС наявна у 84 фермах 19 регіонів України. Також ми детектували поодинокі (<3) сироватки крові з високими титрами антитіл до ВРРСС в стадах Тернопільської області. Ми вважаємо, що подальші моніторингові дослідження необхідні для встановлення епізоотично ситуації в господарствах цього регіону. Антитіла до ВРРСС не були виявлені лише у тварин з Луганської та Миколаївської областей. Однак, беручи до уваги малу кількість зразків з цих регіонів, які були залучені до дослідження, інформації не була недостатньою для оцінки епізоотичної ситуації і тому робити висновки про епізоотичне благополуччя в даних регіонах робити зарано, необхідні подальші моніторингові дослідження.

В загальному, ми проаналізували 97213 сироваток крові з 254 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 Гаврасьєвої та колег вказують на швидке розповсюдження ВРРСС територією України [119]. Аналіз ситуації в період з 2010 по 2014 роки вказує на наявність циркуляції збудника в 19 регіоні України. Циркуляція вірусу була

детектована в 84 фермах України, тоді як в 5 фермах необхідні додаткові дослідження для остаточного аналізу епізоотичної ситуації. Наші результати значно доповнюють раніше опубліковані данні що до тенденції поширення ВРСС територією України, а також є абсолютно новими що до сучасної епізоотичної ситуації за ВРСС.

ВРСС є висококонтагіозним патогеном [145, 146, 147, 148, 149, 150]. Шляхи інфікування патогеном зумовлюють швидке розповсюдження збудника в популяції навіть з декількома ВРСС позитивними тваринми. Саме тому вчасне діагностування ВРСС є необхідним кроком в контролю розповсюдження патогену. Постановка діагнозу РСС на основі одних клінічних ознак, є досить сумнівним методом. Діагностування захворювання також може ускладнюватись наявністю ко-інфекцій. Респіраторні прояви захворювання, схожі до РСС, спостерігаються при інфікуванні свиней іншими збудниками вірусної та бактеріальної етіології.

Так, респіраторні прояви РСС подібні до клінічних ознак значної кількості хвороб: свинячий грип, ензоотична пневмонія, проліферативна та некротична пневмонія, гемофільоз, свинячий коронавірус, синцитіальні пневмонія та міокардит, цирковірус-асоційовані інфекції свиней, враження вірусом Ніпа. В таблиці 7.1. наведений ряд респіраторних та репродуктивних захворювань, що подібні за клінічними проявами до враження тварини ВРСС. Часто ці хвороби можуть проявляти себе в більш помірних формах, що унеможлиблює відрізнити їх одну від одної [5, 103].

Таблиця 7.1.

Перелік захворювань, як потрібно враховувати при диференціальній діагностиці РСС [74].

Репродуктивні захворювання	Респіраторні захворювання
Класична чума свиней	свинячий грип
Африканська чума свиней	ензоотична пневмонія
Лептоспіроз	проліферативна та некротична пневмонія
Парвовірус свиней	Гемофільоз
Ентеровірус свиней	свинячий коронавірус
Хвороба Ауескі	синцитіальні пневмонія та міокардит

heammagglutinating encephalomyelitis virus	цирковірус-асоційовані інфекції свиней
	Nipahvirus infections.

Отож, подібність клінічних ознак та різноманіття хвороб репродуктивного здоров'я свиней унеможлиблює постановку діагнозу без додаткових лабораторних тестів.

Міжнародне епідеміологічне бюро виділяє, як найбільш ефективні, наступні методи діагностики захворювання: ізоляція вірусу, серологічні реакції (ІФА), метод ПЛР, метод ПЛР в реальному часі [6].

Серед серологічних методів дослідження найпоширенішим є непрямий імуноферментний аналіз (ІФА), цільовим антигеном в якому є N протеїн. Це не єдиний антигенний детермінант ВРСС, на який напрацьовується імунна відповідь, проте він є найконсервативнішим, високо імуногенним та індукує ранню гуморальну відповідь в організмі тварини. Тест-системи ІФА, що містять в собі в якості антигенних детермінант окрім вірусного протеїну N, протеїни nsr-2 та nsr1, проявляють нижчу чутливість та меншу специфічність. Протеїн nsr-2 проявляє значно нижчу спорідненість до обох генотипів вірусу РСС, у порівнянні з N-кодуючою ділянкою гену геному (70,6–95,6 порівняно з 84,9–100 % відповідно) [9, 152]. Цей факт можна пояснити тим, що nsr-2-кодуючий регіон є високоваріабельною ділянкою гена. До 2010 року вважалось, що ORF7 (кодує N геном) є найконсервативнішим геном ВРСС. Його широко використовували в діагностиці захворювання РСС в тест-системах, заснованих на методі ЗТ-ПЛР та ПЛР в реальному часі [4]. Проте Tomasz Stadejek та співавтори провели аналіз ізолятів вірусу з країн Європи та наголосили на високому рівні варіабельності особливо у ізолятів зі Східної Європи за ORF7 [152]. Отож, враховуючи високу варіабельність nsr-2 регіону ВРСС в цілому, а також можливість циркулювання на території України ВРСС з генетичним профілем, характерним для східноєвропейських ізолятів ВРСС ми провели порівняльний аналіз чутливості чотирьох промислових серологічних тест-систем, що використовуються в Україні:

- «Ingezim PRRS Universal 11.PRU.K1», Іспанія;
- «BIONOTE», Корея;
- «CIVTESTsuisPRRS», HIPRA, Іспанія
- «IDEXX HerdCheck PRRS 3XR ELISA», США.

Варіабельність ВРРСС – це виклик для діагностики цього захворювання. Tomasz Stadejek та його колеги дослідили ефективність 5-ти найпоширеніших серологічних тест систем у світі та показали їх різну чутливість в залежності від географії виділення ізолятів ВРРССС. Також, Tomasz Stadejek наголошував на існуванні різкого розділення між генетичним різноманіттям ВРРСС в східній та західній Європі, що пояснюється відсутністю активної торгівлі між тодішнім ССРСР та Європою. Для прикладу, ізоляти ВРРСС виділені на території Польщі за генетичними особливостями були віднесені до однієї субгрупи ВРРССС, тоді як білоруські ізоляти були розділені на три генетичні субгрупи [152].

За отриманими результатами з двох господарств України всі чотири тест-системи відобразили однакові результати по детекції антитіл до ВРРСС.

В сироватці крові з господарства №4 антитіла до ВРРСС були виявлені лише тест-системою №1 (США), тоді як решта тест-систем показали негативні результати. Слід наголосити, що хибно негативні результати лабораторних досліджень призводять до поширення цього високонтагіозного захворювання серед тварин стада та до значних економічних втрат внаслідок абортів, народження ослаблених нежиттєздатних поросят, розвитку респіраторного симптомокомплексу у свиней старшої вікової групи [102]. З іншого боку, хибно позитивні результати також є неприпустимою помилкою в постановці діагнозу ВРРСС. Для виключення хибно позитивного результату на тест-системі №1 (США) з господарства №4 повторно були відібрані сироватки крові від тих же тварин, що були на дослідженні. Титр антитіл до ВРРСС та динаміка зміни цих титрів вказували на наявність інфекційного процесу, зумовленого ВРРСС [155].

При використанні тест-системи 2 у двох зразках були виявлені хибно позитивні результати. Тест-система 4 виявилась менш-чутливою до детекції ВРРСС в зразках, що були близькими до значення «cut-off». Необхідно також додати, що отримані при аналізі зразка №11 результати, за використанням тест-систем 2,3,4, вказували на даний зразок, як на ВРРСС позитивний, тоді як тест-система 1 показав негативний результат, але близький до значення «cut-off» [155].

Отже, отримані результати вказують на різницю у чутливості всіх промислових тест-систем, що застосовуються на теперішній час в Україні, що повністю корелює з раніше опублікованими результатами Karniuchuk та співав. Вони підтвердили значну генетичну та антигенну відмінність ВРРСС, ізольованого зі східної Європи, у порівнянні з ВРРСС, ізольованими з західній Європі та США [122].

Чутливість серологічних тест-систем є критичною для отримання результатів, що відповідають дійсності. При використанні тест-системи корейського виробництва можливі хибно позитивні результати, тоді як тест-система 4 (Іспанія) може показувати значну кількість хибно негативних результатів, що в свою чергу вказує на недоцільність використання даних тест-систем. За отриманими даними можна зробити висновок, що найчутливішою до українських ізолятів ВРРСС показала себе серологічна тест-система №1 (США). Проте слід наголосити, що використання в Україні тест-системи 2 (Іспанія) також можливе [155].

Імуноферментний аналіз має низку переваг перед іншими методами, таких як швидкість, доступність, зручність у використанні, висока специфічність. Проте для інформативності цього методу дослідження необхідним є як вибір високо чутливих серологічних тест-систем, так і терміни відбору зразків та коректність інтерпретації результатів дослідження. Для встановлення термінів інфікування, а також інтенсивності та тривалості інфекційного процесу і встановлення оптимальних термінів відбору проб для первинного оцінювання епізоотичної ситуації та для аналізу динаміки

інфекційного процесу в умовах циркуляції збудника у господарстві необхідним є вивчення динаміки рівня титрів антитіл в умовах серологічно позитивно реагуючого стада.

Імуноглобуліни класу G до ВРРСС у сироватці крові інфікованої тварини можна детектувати вже на 7 – 10 день після інфікування, проте здебільшого пік титрів спостерігається на 30 – 50 день. Слід наголосити, що зниження титрів антитіл до негативного рівня спостерігається приблизно на 300-й день після інфікування [121]. Для побудови серологічних профілів господарства Duinhof та колеги запропонували дві вікові групи – 9 та 16 тижнів життя тварин [9, 124]. У віці 9 тижнів науковці пропонують аналізувати динаміку зниження материнських титрів антитіл. Інформація щодо рівня антитіл до ВРРСС у 16-тижневому віці слугує для аналізу епізоотичної ситуації в господарстві загалом. Проте, на нашу думку, даних щодо рівня титрів антитіл за цією схемою буде недостатньо, оскільки цей тип побудови серологічного профілю не надає можливості встановлення технологічних чинників інфікування тварин (переведення тварин з однієї технологічної групи в іншу) та встановлення термінів їх інфікування. Крім того, в дослідженнях не залучені старші вікові групи, що значно зменшує інформативність результатів у розрізі аналізу первинного оцінювання епізоотичної ситуації за ВРРСС у господарстві загалом. Зважаючи на викладене, а також на особливості технології утримання тварин в умовах промислового господарства, для первинного аналізу статусу господарства (наявність/відсутність циркуляції патогену в стаді), на нашу думку, найдоцільніше відбирати зразки сироватки крові від свиней найстаршої вікової групи – 24 тижні життя [158].

Для встановлення можливих термінів інфікування необхідним є оцінювання рівня колостральних антитіл (материнських антитіл) та динаміки його зниження. Думки дослідників щодо цього питання розходяться – одні стверджують, що рівень материнських антитіл знижується впродовж 3 – 5

тижнів життя поросят [121], інші – називають більш пізні терміни зниження рівня колостральних антитіл, а саме, до 9-го тижня [9, 124].

Під час дослідження ми оцінювали рівень колостральних антитіл (материнських антитіл) та динаміку його зниження. У зразках сироватки крові тварин у віці 4 тижнів з 5 різних господарств виявили колостральні антитіла різного рівня, що свідчить про циркуляцію цього вірусу в умовах утримання материнського стада та про контакт свиноматок з ним. Рівень колостральних антитіл у досліджуваних груп тварин різнився за основними показниками (мінімальний, максимальний та середній титри).

Середній титр антитіл (показник групового гуморального імунітету) варіював у межах 529 – 4726 МО/л. Встановлено, що динаміка рівня колостральних антитіл у зразках сироватки крові досліджуваних поросят мала тенденцію до зниження і досягала нульового рівня у віці 4 – 10 тижнів життя залежно від початкового рівня антитіл, що корелює з результатами інших дослідників [158].

Під час моніторингових досліджень вивчали динаміку постінфекційного імунітету. Було виявлено залежність між рівнем колостральних антитіл першого місяця життя тварини та моментом її інфікування. Відтак за відсутності титрів антитіл на 4-ий тиждень життя поросят серологічну конверсію реєстрували, починаючи з 7 тижня, що свідчить про раннє інфікування на фоні відсутності гуморального материнського імунітету та за циркуляції польового вірусу в умовах їх утримання [158]. За низького рівня антитіл у 4-тижневому віці серологічна конверсія виникала у віці 10 тижнів. З огляду на ці данні, можна зробити висновок про інфікування тварин цього господарства приблизно на 6 – 7 тиждень їх життя. Слід згадати, запропоновану Duinhof та співавторами, схему серологічного моніторингу (9 та 16 тижнів життя), за якою в цих клінічних випадках не можливо встановити природу антитіл (колостральні чи постінфекційні) [9, 124].

Високий рівень антитіл у віці 4 тижнів (середній титр 6777 МО/л) досягав нульового рівня у віці 10 тижнів, а сероконверсія внаслідок контакту

з польовим вірусом виникала у віці 15 тижнів. За літературними даними, сероконверсія після інфікування виникає через 10 – 12 днів [9, 124], тому з огляду на отримані результати, можна констатувати пізні інфікування (період відгодівлі). Отже, для встановлення термінів інфікування тварин ВРРСС та відповідно можливості застосування превентивних заходів, для серологічних досліджень доцільно відбирати зразки сироватки крові тварин у віці 4, 7, 10 та 15 тижнів [158].

Під час аналізу зразків сироваток крові тварин у віці 18 та 24 тижнів оцінювали динаміку рівня та однорідності титрів антитіл. В усіх господарствах, де проводили дослідження, спостерігалась динаміка росту рівня постінфекційних антитіл до 24-тижневого віку тварин, що свідчить про інтенсивність інфекційного процесу впродовж вказаного терміну. Слід наголосити, що за наявності високих титрів антитіл до ВРРСС у віці 15 тижнів можливим є виключення з серологічного профілю аналізу зразків сироватки крові від 18-тижневих тварин [158].

Крім того, важливим є аналіз не лише рівня антитіл до ВРРСС, але й ступеню їх однорідності в умовах однієї вікової групи. Однорідність титрів чітко корелює з клінічною стабільністю господарства за ВРРСС.

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 необхідні 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 [158]. 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.

З розвитком молекулярної біології з'явилися діагностичні методи, засновані на виявленні нуклеїнової кислоти вірусу в зразках, зокрема, ЗТ-ПЛР. Даний вид лабораторної діагностики є високочутливим та дозволяє виявити РНК збудника в досліджуваних матеріалах. Для дослідження відбирають кров стабілізовану цитратом натрію або ЕДТА від живих тварин, патматеріал – легені, мигдалики, лімфатичні вузли, тимус, фаренгіальні змиви заморожені до -20 або на льоду – в найкоротші терміни. Для дослідження найкращим матеріалом є зразки від поросят, оскільки період віремії молодих тварин у віці до 6 місяців більший та чутливість до вірусу вища [144, 154, 155].

Крім того метод ЗТ-ПЛР дає змогу виявити вірус в спермі інфікованих хряків, проте в даному випадку необхідно пам'ятати про періодичність виділення вірусу зі спермою інфікованих тварин. Також даним методом можливе виявлення вірусу у тих випадках, коли тварини вже інфіковані, проте сероконверсія не відбулась.

Оскільки вірус швидко руйнується після смерті абортіваних плодів, тому виділення вірусу чи спроба виявити його за допомогою ПЛР в абортованому матеріалі часто ускладнюється. Для виявлення вірусу в абортованих плодах рекомендується відбирати тимус та легені. Raymond R.R. Rowland показав, що найвищий титр вірусу при дослідженні тканин плоду спостерігався в тимусі, тоді як в легенях титр вірусу був значно нижчий [23].

При виявленні РНК вірусу в матеріалах методом ЗТ-ПЛР можливе подальше типування виявленого штаму (європейський та північноамериканський генотипи), що необхідно для розробки правильної підбору вакцин та схеми вакцинації.

Найчастіше для виявлення вірусу РРСС, за допомогою ЗТ-ПЛР, ампліфікують частину гену ORF7, що кодує білок нуклеокапсиду (N) [6].

Для гістологічних досліджень відбирають зразки легень, лімфатичних вузлів (перибронхіальних та мезентеріальних), головного мозку, печінки, нирок [156]. Даний метод дослідження використовується як направляюча ланка в діагностиці захворювання. Відомо, що клінічні та патоанатомічні зміни не завжди є показовими для постановки первинного діагнозу, а при інфікуванні варіабельними видами ВРРСС спостерігаються нехарактерні для даного захворювання прояви. Для виокремлення та звуження ряду захворювань, що необхідно виключити, використовують аналіз цитопатичних змін в організмі тварини [156]

Етап мікроскопіювання надає повний аналіз стану тканин органів. При виявленні характерних для ВРРСС гістопатологічних змін можливе встановлення термінів інфікування тварини (з похибкою 2-3 дні). Проте для остаточної постановки діагнозу необхідне підтвердження наявності генетичного матеріалу ВРРСС в тканинах тварини методом ЗТ-ПЛР.

Таким чином, існує багато різних діагностичних методів для встановлення наявності інфікування тварини ВРРСС, але, враховуючи високу варіабельність вірусу РРСС, слід розробляти комплексні підходи у діагностиці захворювання.

Вірус РРСС має складний патогенез і залежно від генотипу та штаму збудника перебіг інфекції, спричиненої ВРРСС, може різнитись. Хіао та співавтори в своїх дослідженнях ідентифікували різний рівень експресії генів протеїнів макрофагів легень, інфікованих атиповим ВРРСС (китайський тип- високопатогенний ВП-ВРРСС) та Півніно-Американським ВРРСС (ПА-ВРРСС), які філогенетично споріднені. Крім того, ідентифіковано 45 протеїнів, які беруть участь в різних біологічних процесах та сигнальних шляхах. Було виділено декілька рівнів взаємодії з клітиною, спричинених ВРРСС в інфікованій клітині: в будові цитоскелета та клітинних взаємодіях, відповідь на стрес, в редокс-реакціях та метаболізмі, регуляції апоптозу та інші [30, 71].

Вхідними воротами для ВРРСС є слизова оболонка дихальних шляхів хазяїна, він має тропізм до макрофагів, саме тому первинна реплікація вірусу відбувається в місцевих макрофагах з наступною віремією та поширенням у регіональні лімфоїдні тканини. Антиген ВРРСС (АГ-ВРРСС) був знайдений в регіональних макрофагах різних тканин, а також в інших типах клітин, включаючи м'язову тканину [30]. АГ-ВРРСС виявлений вже через 12 годин після інфікування в бронхіальних епітеліальних і артеріальних ендотеліальних клітинах, моноцитах та інтерстиціальних макрофагах. На перший, другий та третій дні після інфікування та на п'ятий день після інфікування АГ-ВРРСС можна детектувати в інтерстиціальних та альвеолярних макрофагах. В ендотеліальних клітинах, моноцитах та макрофагах (інтерстиціальних, альвеолярних, інтраваскулярних) було виявлено АГ-ВРРСС на сьомий, чотирнадцятий, двадцять перший дні після інфікування, але інтенсивність забарвлення та розповсюдження в тканинах органів були значно вищими на 14-й та 21-й дні. [11, 30].

Також АГ-ВРРСС виявлений в назальному епітелії слизової в 12 годин після інфікування та знову на 14-й, 21-й день після ураження тварини збудником. Цікавою особливістю є наявність вірусу в ендотелії судин легень, тоді як в ендотеліальних клітинах судин інших органів його не було виявлено. Експериментально встановлено наявність динамічної взаємодії між двома клітинними типами (популяції макрофагів та ендотеліальних клітин судин), що може полегшувати реплікацію ВРРСС. АГ-ВРРСС був виявлений на культурі клітин моноцитів та ендотеліальних клітин артерій, проте не спостерігався в артеріальних ендотеліальних клітинах, що інкубувались без присутності моноцитів. Зафіксована також реплікація ВРРСС в моноцитах *in vitro* [11].

Спочатку вірус проникає до організму чутливої тварини через епітелій верхніх дихальних шляхів. Реплікуючись в макрофагах мигдалин, легень та епітелію бронхів, ВРРСС через 12 годин після інфікування призводить до

віремії і розвитку міокардитів, енцефалітів, васкулітів та некрозу лімфоїдної тканини [11, 30, 42, 144].

З огляду на те, що ВРРСС виявлений в 19 областях України та спостерігається тенденція до його поширення на території України, нами було проведено дослідження для розробки підходів та впровадження методів діагностики цього захворювання. Враховуючи високий рівень варіабельності вірусу та можливість отримання хибно негативних результатів необхідним є комплексний підхід до його діагностики. Одним з методів, який був нами запропонований для встановлення ВРРСС, як першопричини розвитку патології, є гістологічне дослідження тканин органів інфікованих тварин [156].

Беручи до уваги наявність інших збудників захворювань свиней, що спричиняють схожу до РРСС клінічну картину [3], 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, мозку та антиген збудника в тканинах легень, тимусу, лімфатичних вузлів.

У нашому дослідженні цитопатичні зміни, спричинені ВРРСС, були зафіксовані в легнях та лімфатичних вузлах тварин. Слід зазначити, що одержані нами дані підтвердили раніше опубліковані результати [68, 73]. Rossow та співавтори на третій день після інфікування ВРРСС в каудальній частині легень спостерігали незначне збільшення кількості макрофагів і поодинокі альвеоли, заповнені клітинним детритом та білковим ексудатом. На п'ятий день після інфікування з'явилися зміни в усіх частинах легень, проте найбільше уражалась їх краніальна частина [68, 73]. Так, у нашому дослідженні в зразках тканини легень були виявлені різного ступеня ураження інтерстиції з характерними макрофагальними інфільтратами, заповненням просвіту альвеол клітинним детритом, білковим ексудатом та

макрофагами [156]. Характер поширення патогістологічних змін у паренхімі легень досліджуваних зразків повністю відповідає раніше опублікованим результатам.

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 [159]. Слід зазначити, що збільшена кількість гіпертрофованих пневмоцитів другого порядку є ще однією ознакою ВРРСС-індукованої інфекції. [68, 73].

Rossow та співавтори у своїх дослідженнях зазначали, що мікроскопічні зміни в тканині легень на п'ятий день після інфікування характеризуються альвеолами, заповненими клітинним детритом та білковим ексудатом, потужним збільшенням кількості альвеолярних макрофагів, незначним потовщенням інтерстиції за рахунок інфільтрації макрофагами (тільки в краніальній зоні), наявністю незначної кількості (один-два в полі зору при збільшенні 400) альвеолярних синцитій, та збільшенням кількості гіпертрофованих пневмоцитів другого порядку. На сьомий, 14-ий та 21-ий день після інфікування у всіх частках легень наявні аналогічні зміни, проте у більш інтенсивній та поширеній формі. Значним збільшенням кількості синцитій-подібних характеризувались 14-ий та 21-ий день після інфікування [73]. У досліджених нами зразках легень від тварин, інфікованих ВРРСС, не було виявлено ознак наявності/формування синцитій. Ці розбіжності в результатах можуть пояснюватись різницею патогенезу штамів, які циркулюють в західній та східній Європі [152], або ж все ж таки утворення синцитій не є специфічною ознакою, яку можна використовувати у діагностиці ВРРСС гістологічним методом. Загалом інтерстиціальна пневмонія вперше може фіксуватись на п'ятий день, на 14-ий день після інфікування припадає пік розвитку захворювання та близько 35-ого дня після

інфікування спостерігається початковий етап відновлення нормальної структури органа [68].

Необхідно наголосити на тому, що в наших дослідженнях характерних ознак розвитку міокардитів виявлено не було, хоча Rossow та співавтори відзначали наявність змін в серцевому м'язі. Автори статті вказували, що на 14-ий день після інфікування у серцевій тканині можуть з'являтися зони некрозу зі значною кількістю макрофагів і меншою кількістю лімфоцитів у субендокарді, міокарді та периваскулярних ділянках. Інколи може спостерігатись фібриноїдний некроз ендотелію судин органів. На 21-й та 35-й дні після інфікування спостерігали потужні лімфоцитарні інфільтрації субендокардіальних, міокардіальних та периваскулярних ділянок [68, 73]. Можливою причиною відсутності цих змін у міокарді та субендокарді могли бути терміни відбору зразків тканин органів після інфікування ВРСС, оскільки вони в серцевому м'язі зазвичай є досить пізньою ознакою інфікування тварини ВРСС [75]. Іншою можливою причиною відмінності отриманих результатів від результатів Rossow та співавторів, могла бути генетична відмінність вірусу РСС, що циркулює в Україні, від раніше досліджених.

При дослідженні тканин мозку лише в одному зразку виявили зміни, характерні для ураження тварини вірусом РСС, а саме периваскулярні лімфоцитарні інфільтрати. Раніше опубліковані дані свідчать про можливість формування лімфоцитарно-гістіоцитарних інфільтрацій в мозку інфікованих тварин на пізніх етапах захворювання [68, 73, 75]. На 21-й день після інфікування можна зафіксувати мікроскопічні зміни, серед яких виділяють інфільтрацію лімфоцитами та плазматичними клітинами [75]. Слід наголосити на тому, що жодних з вище перерахованих змін, окрім периваскулярних лімфоцитарних інфільтратів в мозку, не було виявлено [159].

Раніше опубліковані дані про специфіку патогістологічних змін при інфікуванні ВРСС та характер виявлених нами у зразках легень змін

свідчить про те, що лише у 23% випадків ВРРСС був причиною розвитку патологій репродуктивного та респіраторного тракту. Локалізація патогістологічних змін та їх характер вказує на те, що матеріал був відібраний на ранніх термінах інфікування тварини ВРРСС.

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 абортіваних плодів у найбільшій кількості виявлявся в тканині тимусу, поодинокі в легенях. У випадку респіраторного прояву РРСС, найбільшу кількість антигену детектували в легенях та трахіобронхіальних лімфатичних вузлах.

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 патоморфологічних 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 [156]. Враховуючи це, необхідним є виключення наявності молекулярно-біологічних аспектів різності патогенезу ВРРСС, що циркулює в Україні, з раніше дослідженими штамами.

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 Україні 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 підбрано пару праймерів PRRSVp1_Nfor, PRRSVp2_Nrev. Оптимізовано умови проведення ЗТ-ПЛР: найбільша специфічність реакції спостерігається за температури гібридизації 58°C та концентрації 2,5 мМ магнію сульфату в межах 0,75 мкл.
 6. Для проведення філогенетичного аналізу ВРРСС до варіабельного фрагменту ORF5 геному вірусу підбрані 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°C 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 штамми з Білорусії, Іспанії та Італії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) – specific mAbs: supporting diagnostics and providing new insights into the antigenic properties of the virus / [W. Van Breedam, S. Costers, M. Vanhee et. al.] // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2011. – P.1-12.
2. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe / [T. Stadejek, M. B. Oleksiewicz, A.V. Scherbakov et al.] // *Arch.Virol*. – 2008. – Vol. 153. – P. 1479-1488.
3. Recombination analyses between two strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vivo / [D. Liu, R. Zhou, J. Zhang et. al.] // *Virus Research*. – 2011. – Vol. 155. – P. 473-486.
4. One year study of dynamic and evolution of types I and II PRRSV in a swine farm / [H. K. Kim, S. J. Park, S. M. Rho et. al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2011. – P.1-9.
5. Report of the OIE AD HOC group on reproductive and respiratory syndrome // World organization for modern health. PRRS: the disease, its diagnosis, prevention and control . – Paris. – 2004.
6. Report of the OIE AD HOC group on reproductive and respiratory syndrome // World organization for modern health. PRRS: the disease, its diagnosis, prevention and control – Paris. – 2004.
7. Lipej Z. An overview about PRRSS in Croatia / Z.Lipej, D.Novosel // *The Balkan meeting on PRRS diagnostic: conference proceedings*. – Hrvatska, 2011.
8. Genetic diversity of European genotype PRRS in Central an Eastern Europe – an update // [Stadejek T., Balka G., Chabros K., et al.] // 21st international pig veterinary society congress : proceedings. – Vancouver, 2010.

9. Detection of PRRSV circulation in herds without clinical signs of PRRSV: Comparison of five age groups to assess the preferred age group and sample size / [Duinhof T.F., van Schaik G., van Esch E.J.B. et. al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2011. – Vol. 150. – P.180-184.
10. Animal Health Australia. Disease strategy porcine reproductive and respiratory syndrome. Australian Veterinary Emergency Plan. – Australian, 2006. – P.1-52.
11. Rossow K.D. Porcine reproductive and respiratory syndrome. Review article / K.D. Rossow // *Veterinary Pathology*. – 1998. – Vol. 35. – P. 1-20.
12. Comparative analysis of complete nucleotide sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome Virus (PRRSV) isolates in Thailand (US and EU genotypes) / [A. Amonsing, R. Kedkovid, S. Puranaveja et al.] // *Virology Journal*. – 2009. – Vol. 6. – P. 280-289.
13. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses : eight report of the International Committee of Viruses, [ed. by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger]. – Oxford: Elsevier Academic Press, 2005.
14. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in homogeneous subpopulation of MA-104 cell line / [H.S. Kim, J. Kwang, I. J. Yoon, et al.] // *Archive Virology*. – 1993. – P. 477-483.
15. NSP2 gene variation of the North American genotype of the Thailand PRRSV in central Thailand / R. Kedkovid et. al. // *Virology Journal*. – 2010. – Vol. 7. – P. 340-352.
16. Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV types I and II / [E. Brown, S. Lawson, C. Welbon et al.] // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2009. – Vol. 16. – № 5. – P. 628-635.
17. Genetic analysis of ORF5 of recent Korean porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSVs) in viremic sera collected from MLV-

- vaccinating or non-vaccinating farms / [H. K. Kim, J. S. Yang, H. J. Moon et al.] // *Journal of Veterinary Science*. – 2009. – Vol. 10. – P. 121-133.
18. Persistence of European and American type PRRSV strains within Lithuanian pig herd / [A. Stankevicius, R. Cepulis, H. Zilinskas, et al.] // *Bulletin Veterinary Institute Pulavy*. – 2008. – Vol. 52. – P. 319-323.
 19. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / [Murtaugh M.P., Stadejek T., Abrahante J.E. et al.] // *Virus Research*. – 2010. – Vol. 154. – P. 18-30.
 20. Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate / [Karniychuk U.U., Geldhof M., Vanhee M., et al.] // *BMC Veterinary Research*. – 2010. – Vol. 6. – P. 30.
 21. Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective / [Shi M., Lam T.T.Y., Hon C-C., et al.] // *Virus Research*. – 2010. – Vol. 154. – P. 7-17.
 22. Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia / [R. Drolet, R. Larochelle, M. Morin, et al.] // *Vet. Pathol*. – 2003. – Vol.40. – P.143-148.
 23. Rowland R.R.R. The interaction between PRRSV and the late gestation pig fetus / R. R. R. Rowland // *Virus Research* – 2010. – Vol. 154. – P.114-122.
 24. Lipej Z. An overview about PRRSS in Croatia / Lipej Z., Novosel D. // *The Balkan meeting on PRRS diagnostic*. – Hrvatska, 2011.
 25. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in Eastern Europe support the definition of new genetic subtypes / Stadejek T., Oleksiewicz M.B., Potapchuk B., Podgorska K. // *Journal of Genetic Virology*. – 2006 – Vol. 87. – P. 1835-1841.
 26. A molecular analysis of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in south Korea / [Kim S.H., Roh I.S., Choi E.J. et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2010. – Vol. 143. – P. 394-400.

27. Emergence of fetal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark / [Tian K., Yu X., Zhao T. et al.] – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [10.1371/journal.pone.0000526](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000526)
28. Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist / [Chen Z., Lawson S., Sun Z. et al.]// *Virology*. – 2010. – Vol. 398. – P.87-97.
29. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1 beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation / [Beura L.K., Sarkar S.N., Know B., et al.] // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84. – P. 1574-1584.
30. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) could be sensed by professional beta interferon-producing system and had mechanism to inhibit this action in MARC-145 cells / [Shi X., Wang L., Zhi Y., et al.] – 2010. – Vol. 153. – P.151-156.
31. Antibody response of nonstructural proteins: implication for diagnostic detection and differentiation of PRRSV type 1 and type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus / [E. Brown, S. Lawson, C. Wellbon et al.] // *Clinical Vaccine Immunology*. – 2009. – Vol. 16. – P. 628-635.
32. Identification of nonessential regions of the nsp2 replicase protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain VR-2332 for replication in cell culture / J. Han, G. Liu, Y. Wang, K. S. Faaberg // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol.81. – P.9878-9890.
33. Han J. The porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp2 cysteine protease domain possesses both trans- and cis-cleavage activities / J. Han, M.S. Rutherford, K.S. Faaberg // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83. – P. 9449-9463.

34. The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 2 possesses deubiquitinating and interferon antagonism functions / Z.Sun, Z. Chen, S.R. Lawson, Y. Fang // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84. – P. 7832-7846.
35. Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / De Lima M., A.K. Pattnaik, E.F. Flores, F.A. Osorio // *Virology*. – 2010. – Vol. 353. – P. 410-421.
36. Antigen-specific B-cell responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection / [P. Mulupuri, J.J. Zimmermen, J. Hermann, et al.] // *Journal of Virology*. – 2008. – Vol. 82. – P.385-392.
37. Immunodominant epitopes in nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are dispensable for replication, but play an important role in modulation of the host immune response / [Chen Z., Zhou X., Lunney J.K., et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2010. – Vol. 91. – P. 410-421.
38. Endoribonuclease activities of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp11 was essential for nsp11 to inhibit IFN- β induction / [Shi X., Wang L., Li X., Zhang G., et al.] // *Molecular Immunology*. – 2011. – Vol. 31. – P. 310-321.
39. Glycosilation of minor envelope glycoproteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infectious virus recovery, receptor interaction, and immune response / [B.Das Phani, L.X. Vu Hiep, X. Dinh Phat et al.] // *Virology*. – 2011. – Vol. 410. – P. 385-394.
40. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1 beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation / [L.K. Beura, S.N. Sarkar, B. Kwon et al.] // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84. – P. 1574-1584.
41. Function of PRRSV GP5 envelope protein by using pseudotyped virus / [Xia P., Dang Z., Qiu H., et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2009. – Vol. 138. – P. 297-303.

42. Profiling of cellular proteins in porcine reproductive and respiratory syndrome virus virions by proteomic analysis / [Chengwen Zhang, Chunyi Xue, Yan Li et al.] // *Virology Journal*. – 2010. – Vol.7. – P. 320-334.
43. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment is mediated by N-terminal domain of the sialoadhesin receptor / [An T-Q., Tian Z-J., He Y-X., Xiao Y., et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2010. – Vol. 143. – P. 371-378.
44. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses / [Calvert J.G., Slade D.E., Shields S.L., et al.] // *J. Virol.* – 2007. – Vol. 81. – P. 7371-7379.
45. Delputte P.L. Analysis porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin / Delputte P.L., Costers S., Nauwynck H.J. // *J. Gen. Virol.* – 2008. – Vol.86. – P.1441-1445.
46. MicroRNA 181 suppresses porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection by targeting PRRSV receptor CD163 / [L. Gao, [X. Guo, L. Wang, Q. Zhang, et al.] // *Journal of virology*. – 2013. – Vol.87. – P.8808-8812.
47. Increase of CD163 but not sialoadhesin on cultured peripheral blood monocytes is coordinated with enhanced susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection / [L. Wang, H. Zhang, X. Suo, et al.] // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2011. – Vol.141. – P.209-220.
48. Shanmukhappa K. Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection / K.Shanmukhappa, J.-K Kim., S.Kapil // *Virology Journal*. 2007. – Vol.4. – P.168-175.
49. The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses / [Hana K., Suzuki Y., Nakane T., et al.] // *Mol. Boil. Evol.* – 2005. – Vol. 22. – P. 1024-1031.
50. Forsberg R. Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes / R. Forsberg // *Mol. Boil. Evol.* – 2005. – Vol 2. – P. 2131-2134.

51. Prevalence and phylogenetic analysis of the isolated type I porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 2007 to 2008 in Korea / [Lee C., Kim H., Kang B., et al.] // *Virus genes*. – 2010. – Vol. 40. – P. 225-230.
52. Recombination in vaccine and circulating strains of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses / [Li B., Fang L., Xu Z., et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 15. – P. 2032-2035.
53. Genetic variation analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in China from 2002 to 2007 based on ORF5 / [Li Y., Wang X., Jiang P., et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2009. – Vol. 138. – P.152-160.
54. The genomic diversity of Chinese porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from 1996 to 2009 / [Li. B., Fang L., Liu S., et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2010. – P. 226-237.
55. Han. J. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / Han. J., Wang Y., Faaberg K.S. // *Virus Res.* – 2005. – Vol.122. – 175-182.
56. Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in the United States / [Fang Y., Kim D.Y., Ropp S., et al.] // *Virus Res.* – 2004. – Vol. 100. – P. 38-47.
57. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe / [Stadejek T., Oleksiewicz M.B., Scherbakov A.V., et al.] // *Arch. Virol.* – 2008. – Vol.153. – P.1479-1488.
58. Genetic variation and geographic distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan / [Yoshii M., Kaku Y., Murakami Y., et al.] // *Archives of Virology* – 2005. – Vol. 150. – P. 2313-2324.
59. Antibody response of nonstructural proteins: implication for diagnostic detection and differentiation of PRRSV type 1 and type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus / [Brown E., Lawson S.,

- Wellbon C. et al.] // *Clinical Vaccine Immunology* – 2009. – Vol. 16. – P. 628-635.
60. Tong G.-Z., Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome / Tong G.-Z., Zhou Y.-J., Hao X.-F. // *China Emerging Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 13. – № 9. – P. 1434-1435.
61. Genetic diversity of PRRS virus collected from air samples in four different regions of concentrated swine production during a high incidence season / [B. Brito, S. Dee, S. Wayne, et al.] // *Viruses*. – 2014. – Vol.6. – P. 4424-4436.
62. Impact of genetic variation and geographic distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on infectivity and pig growth / [B. Badaoui, R. Grande, S. Calza, et al.] // *BMC Vet. Res.* – 2013. – Vol. 9. – P. 58.
63. Bayesian analysis of risk factors for infection with a genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Ontario swine herds using monitoring data / G. P. S. Kwong, Z. Poljak, R. Deardon, C. E. Dewey // *Prev. Vet. Med.* – 2013. – Vol. 110. – P. 405-417.
64. Spatial and temporal patterns of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) genotypes in Ontario, Canada, 2004-2007 / [T. Rosendal, C. Dewey, R. Friendship, et al.] // *BMC Vet. Res.* – 2014. – Vol. 10. – P. 83.
65. Efficacy of an attenuated European subtype 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs upon challenge with the East European subtype 3 PRRSV strain Lena / I. Trus, C. Bonckaert, K. van der Meulen, H. J. Nauwynck // *Vaccine*. – 2014. – Vol.8. – P.768-781.
66. Development of a heteroduplex mobility assay to identify field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with nucleotide sequences closely related to those of modified live-attenuated vaccines / [K. F. Key, D. K. Guenette, K.-J. Yoon, et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2003. – Vol.41 – P.2433-2439.

67. Genome-wide transcriptional response of primary alveolar macrophages following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus / [Genini S., Delputte P.L., Malinverni R. et al.] // *Journal of General Virology*. – 2008. – Vol. 89. – P. 2550-2564.
68. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs / [Rossow K.D., Goyal S.M., Collins J.E. et al.] // *Veth. Pathol.* – 1999. – Vol.32. – P.361-373.
69. Proteome changes of lungs artificially infected with H-PRRSV and N-PRRSV by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis / [Shuqi Xiao, Qiwei Wang, Jianyu Jia et al.] // *Virology Journal*. – 2010. – Vol.7. – P.380-389.
70. W. Kim. Different biological characteristics of wild-type porcine reproductive and respiratory syndrome viruses and vaccine viruses and identification of the corresponding genetic determinants / W. Kim, J. Kim, S. Cha, K. Yoon // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2008. – Vol.46 – P.1758-1768.
71. Profiling of cellular proteins in porcine reproductive and respiratory syndrome virus virions by proteomic analysis / [Chengwen Zhang, Chunyi Xue, Yan Li et al.] // *Virology Journal*. – 2010. – Vol.7. – P. 350-364.
72. Comparison of the pathogenesis of different European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains / Stockhofe-Zurwieden N., Weesendorp E., Morgan S., Rebel A. // *International symposium on emerging and re-emerging pig diseases*, 2011.
73. Chronological Immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs / Rossow K.D., Benfield D.A., Goyal S.M., Collins J.E. // *Veth. Pathol.* – 1999. – Vol. 33. – P. 551-556.
74. Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated swine alveolar macrophages / [Ait-Ali

- T., Wilson A.D., Westcott D.G. et al.] // *Viral Immunology*. – 2007. – Vol. 20. – P. 105–118.
75. Understanding PRRSV infection in porcine lung based on genome-wide transcriptome response identified by deep sequencing / [Shuki Xiao, Jianyu Jia, Delin Mo et al.] // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5. – №6. – P. 145-159.
76. Evans C.M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in GB pig herds: farm characteristics associated with heterogeneity in seroprevalence / Evans C.M., Medley G.F., Green L.E. // *VBMC Veterinary Research*. – 2008. – Vol.4. – P. 165-178.
77. Genetic perspective on Host Responses to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) / [C. R. G. Lewis, T. Ait-Ali, M. Clapperton, et al.] // *Viral Immunology*. – 2007. – Vol.20:3. – P.343-357.
78. Wang R. Antagonizing interferon-mediated immune response by porcine reproductive and respiratory syndrome virus / R. Wang, Y. Zhang // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/315470>
79. P.M. Murtaugh. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection / P.M. Murtaugh // *Viral Immunology*. – 2002. – Vol.82. – P. 1263-1272.
80. Dwivedi V. Evaluation of immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs during early stage of infection under farm conditions / V. Dwivedi // *Virology Journal*. – 2012. – Vol. 9. – P. 45-52.
81. P.L. Deplutte. Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages / P.L. Deplutte // *Vet Immunology and Immunopathology*. – 2004. – Vol. 102. – P. 179-188.
82. Lopez. O.J. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity / OJ. Lopez, FA. Osorio // *Vet Immunology and Immunopathology*. – 2004. – Vol.102. – P.155-163.

83. Molina R.M. Immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus during acute and chronic infection / R.M. Molina // *Vet Immunology and Immunopathology*. – 2008. – Vol.126. – P. 282-292.
84. Bastos R.G. Immune responses of pigs inoculated with *Mycobacterium bovis* BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / R.G. Bastos // *Vaccine*. – 2004. — Vol.22. – P.467-474.
85. Kawai T. Innate immune recognition of viral infection / T. Kawai, S. Akira // *Nature Immunology*. – 2006. – Vol.7. – P.131-137.
86. Differential expression and activity of the porcine type I interferon family / Y. Sang, R. R. R. Rowland, R. A. Hesse, F. Blecha // *Physiological Genomics*. – 2010. – Vol.42. – P.248-258.
87. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection activates chemokine RANTES in MARC-145 cells / [Y. Wang, R. Luo, L. Fang, et al.] // *Molecular Immunology*. – 2011. – Vol.48. – P.586-591.
88. Snijder E. J. Arterivirus molecular biology and pathogenesis / E. J. Snijder, M. Kikkert, and Y. Fang // *Journal of General Virology*. – 2013. –Vol. 94, part 10. – P. 2141-2163.
89. Faaberg K. S. Family arteriviridae / K. S. Faaberg. U. B. R. Balasuriya, M. A. Briton [A. M. Q. King, Ed.] // *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. – London, UK: Elsevier Academic Press, 2011.
90. Takaoka A. Interferon signaling network in innate defense / A. Takaoka, H. Yanai // *Cellular Microbiology*. – 2006. – Vol.8. – P. 907-922.
91. J. Bassagannya-Rierra. Impact of immunizations with porcine reproductive and respiratory syndrome virus on lymphoproliferative recall responses of CD8+T cells / J. Bassagannya-Rierra // *Viral Immunology*. – 2004. – Vol.17. – P. 25-37.
92. Patel D. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits type I interferon signaling by blocking STAT1/STAT2 nuclear translocation /

- D. Patel, Y. Nan, M. Shen, et al. // *Journal of virology*. – 2010. – Vol.84. – P.11045-11055.
93. Wang R. Variable interference with interferon signal transduction by different strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / [R. Wang, Y. Nan, Y. Yu, et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2013. – Vol.166. – P.493-503.
94. Targeted mutations in a highly conserved motif of the nspl β protein impair the interferon antagonizing activity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / Li Y., Zhu L., S. R. Lawson, Y. Fang // *Journal of General Virology*. – 2013. – Vol.94. – P. 1972-1983.
95. Chen Z. Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nspl) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nspl function as interferon antagonist / Z. Chen, S. Lawson, Z. Sun // *Virology*. – 2010. – Vol.398. – P. 87-97.
96. Gradual development of interferon- γ responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination / [William A Meier; Judy Galeota; Fernando A Osorio, et al.] // *Virology*. – 2003. – Vol.309. – P.18-31.
97. The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infection in pigs is independent of viral load / [Z. Xiao, L. Batista, S. Dee, et al.] // *Journal of Virology*. – 2004. – Vol.78. – P.5923-5933.
98. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus / [P.A. Harms, S.D. Sorden, P.G. Halbur et al.] // *Veth. Pathol*. – 2001. – Vol.38. – P.528-539.
99. Вербицький П.І. Довідник лікаря ветеринарної медицини / П.І. Вербицький, П.П. Достоевський. – К.: «Урожай», 2004. – 1280с.
100. Changes in the cellular proteins of pulmonary alveolar macrophage infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus by proteomics

- analysis / [Zhang H. Guo K., Ge X., et al.] // J. Proteome. – 2009. – P.390-402.
101. Comparative pathogenecity of type 1 and type 2 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the respiratory model / [Martinez Lobo F.J., Diez Fuertes F., Segales J., et al.] // International symposium on emerging and re-emerging pig diseases, 2011.
102. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States / [Neumann E.J., Kliebenstein J.B., Johnson C.D., et al.] // Journal of American Veterinary Medicine Association – 2005. – Vol. 227. – P.385-392.
103. Инфекционные болезни животных / Б.Ф. Бессарабов, Е.С. Воронин и др.; под ред. А.А. Сидорчука. — М.: Колос, 2007. — 671 с.
104. Рева. О.Н. Филогенетический анализ. Краткий курс лекций / О.Н. Рева. – К.: ВПЦ Київський університет ім. Шевченка. – 2009. – С. 38.
105. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. / [Tamura K., Stecher G., Peterson D., et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2013. – Vol. 30. – P. 2725-2729
106. Пат.2104513,С1, Ru, МПК 6 G01N1/28, G01N33/483. Способ изготовления гистологических срезов: Зубкова Т.В., Тарнопольская О.В., Мармарова Т.Ю. №95103182/14; Заявл. 6.03.1995; Опубл. 10.02.1998. – 4 с.
107. Горальский Л. П. Основи гістологічної техніки у нормі та при патології / Л. П. Горальский, В. Т.Хомич, О. І. Кононський. – Житомир.: Полісся, 2005. – 288 с.
108. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / Рокицкий П. Ф. – Минск: «Вышэйшая школа», 1973.- 316 с.
109. Посібник для лабораторій з валідації методів та пов'язаних питань. – Eurachem, 1998 р., ISBN 0-948926-12-0 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: www.eurachem.ul.pt

110. The IUPAC “Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies”. – Horwitz, 1995.
111. Костюк С. А. Критерии внутрилабораторного контроля качества молекулярно-биологических исследований: презентация доцента / С. А. Костюк. – Білоруська медична академія післядипломного навчання/ – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://urobel.uroweb.ru/article/id-20>.
112. Валидация биоаналитического метода. Методические рекомендации. – Министерство здравоохранения Украины, Киев: ГП «Государственный экспертный центр», 2013, – 35 С.
113. Посібник з питань якості у сфері аналітичної хімії: опомога при акредитації. – Eurachem/CITAC, 2002. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: www.eurachem.ul.pt
114. International Standard (ISO) 17025. 2000. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Organization for Standardization. – Genève, Switzerland.
115. International Standard (ISO) 5725. 1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. – International Organization for Standardization. – Genève, Switzerland.
116. Thompson M. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis / M.Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood. // Pure Appl. Chem. – 2002. – Vol. 74. – P. 835-855.
117. Відповідність аналітичних методів встановленій меті: посібник для лабораторій з валідації методів та пов’язаних питань. – Eurachem, 1998. – ISBN 0-948926-12-0 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: www.eurachem.ul.pt
118. Простежуваність при хімічних вимірюваннях. Посібник з питань досягнення результатів, що підлягають співставленню, при хімічних вимірюваннях. – Eurachem/CITAC, 2003. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: www.eurachem.ul.pt

119. Ретроспективна діагностика репродуктивного та респіраторного синдрому свиней методом імуноферментного аналізу / Гаврасьєва Н.В., Головка А.М., Троценко З.Р., Абрамов А.В // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2007. – Т. 23. – С. 415-419.
120. 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.
121. Comparison of three ELISAs for the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome / [Mattheu E., Tello M., Coll A., et al.] // Vet. Rec. – 2006. – Vol.159. – P.717-718.
122. Identification of nonessential regions of the nsp2 replicase protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain VR-2332 for replication in cell culture / Han J., Liu G., Wang Y., Faaberg K.S. // Journal of Virology – 2007. – Vol.81. – P.9878-9890.
123. A review of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Dutch breeding: population dynamics and clinical relevance / Nodelijk G., Nielen M., De Jong M.C.M., Verheijden J.H.M. // Prev.Vet. Met. – 2003. – Vol. 60. – P. 37-52.
124. O. J. Lopez. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity / O. J. Lopez, F. A. Osorio // Veterinary immunology and immunopathology. – 2004. – Vol.102. – P.155-163.
125. Bayliss S.A. Analysis of ORF 5 porcine reproductive and respiratory virus / S.A.Bayliss, T.Finsterbusch, A.Mankertz // Vaccine. – 2005 – Vol. 29. – P. 690–697.
126. Ivashchenko O.A. The spread of porcine respiratory and reproductive syndrome virus in Ukraine from 2005-July 2012 years / O.A. Ivashchenko // Understanding and combating PRRS in Europe, Будапешт (Угорщина) – 2012. – P. 74-78.

127. 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.
128. Porcine reproductive end respiratory syndrome virus (porcine arterivirus) / [Zimmerman J.J., Benfield D.A., Murtaugh M.P., et al.] In: Diseases of swine / Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Tailor D.J. (Eds.); 9th ed.. – 2006. – P. 401.
129. Tomasz Stadejek The complex epidemiology of PRRSV in Europe / Stadejek Tomasz // EuroPRRSV. – 2010.
130. Б. Г. Орлянкин. Инфекционные респираторные болезни свиней / Б. Г. Орлянкин, Т. И. Алипер, Е. А. Непоклонов // Ветеринария. – 2005. – № 11. – С. 3 – 6.
131. Б. Г. Орлянкин. Инфекционные респираторные болезни свиней: этиология, диагностика и профилактика. // Б. Г. Орлянкин, Т. И. Алипер, А. М. Мишин / Ветеринария Кубани [Электронный ресурс]. – 2010. – №3. – Режим доступа: http://www.kubanvet.ru/journal_n3_20102.html.
132. Ребенко Г. І. Етіологія та епізоотологія інфекційних хвороб респіраторного тракту свиней / Г. І. Ребенко // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія : Ветеринарна медицина. – 2014. – Вип.1 – С. 114–121.
133. Леонець І. Л. Епізоотологічні особливості перебігу інфекційних хвороб свиней з ураженням репродуктивної системи / І. Л. Леонець, В. В. Недосєков // «Наукові праці ПФ НУБіП України «КАТУ». Серія «Ветеринарні науки». – Випуск 148.
134. Орлянкин Б. Г. Инфекционные респираторные болезни свиней: этиология, диагностика и профилактика. // Б. Г. Орлянкин, Т. И. Алипер, А. М. Мишин / Ветеринария Кубани [Электронный

- ресурс]. – 2010. – №3. – Режим доступа: http://www.kubanvet.ru/journal_n3_20102.html.
135. Прудников С. И. Факторные инфекционные болезни свиней и их профилактика / С. И. Прудников. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.alekris.ru/2011/10/>
136. Саркисян Х. В.. Проявление репродуктивно-респираторного синдрома свиней в Армении / Х. В. Саркисян, А. С. Оганян, Т. Э. Гаспарян // Актуальные проблемы инфекции патологии животных: материалы Международной научной конференции, посвященной 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2003. – С. 92-94.
137. M. P. Murtaugh. PRRS immunology: what are we missing? / M. P. Murtaugh // American Association Of Swine Veterinarians. – 2004. – P.359-367.
138. Краснобаева О. Е. Ассоциированные вирусные инфекции при патологии воспроизводства свиней / О. Е. Краснобаева, Е. А. Краснобаев, Е. Г. Павлов // Проблемы и перспективы паразитоценологии: матер. 5 межсъезд. конф. паразитоценологов Украины. – Харьков – Луганск, 1997. – С. 24-26.
139. Ситюк М. П. Серопревалентність популяції диких кабанів на території України до вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней / М. П. Ситюк // Вісник Житомирського національного агроекологічного університету. – 2014. – № 1(1) – С. 136–145.
140. Коломыцев А. А. Заболевание свиней с репродуктивно-респираторным синдромом в хозяйствах смоленской области и вакцинации свиней / А. А. Коломыцев, А. А. Стрижаков, В. А. Мищенко // Курской биофабрике и агробиологической промышленности – 100 лет: тез. докл. – Курск, 1996. – С. 153–155.
141. Кукушкин С. А. Эпизоотология и меры борьбы с репродуктивно-респираторным синдромом свиней в мире и Российской Федерации / С. А. Кукушкин // Ветеринарная патология. – 2006. – №4. – С. 89–95.

142. Байбиков Т. З. Репродуктивно-респираторный синдромом свиней / Т. З. Байбиков, А. А. Гусев, Н. А. Яременко // Ветеринария. – 2001. – №3. – С. 18–24.
143. Неволько О. М. Результаты серологических мониторинговых исследований свиней на территории Украины щодо репродуктивно-респираторного синдрому за період 2008-2012 роки /О. М. Неволько, М. П. Ситюк // Ветеринарна біотехнологія. – 2013. – №23. – С. 327–335.
144. Evans C.M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in GB pig herds: farm characteristics associated with heterogeneity in seroprevalence / Evans C.M., Medley G.F., Green L.E. // BMC Vet. Res. – 2008. – Vol. 4 (48).-P. 48-54.
145. Ситюк М. П. Імунопероксидазний тест для вірусологічної та серологічної діагностики репродуктивно-респираторного синдрому та цирковірусної інфекції свиней / М. П. Ситюк // Вісник аграрної науки. – 2014. – №5. – С. 27–31.
146. Comparative infection efficiency of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates on MA104 cells and porcine alveolar macrophages / [M. Fuentes de Abin, G. Spronk, M. Wagner, et al.] // The Canadian Journal of Veterinary Research. – 2009. – Vol.73. – P. 200-204.
147. M. Xu. Secondary infection with Streptococcus suis serotype 7 increases the virulence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs / [M. Xu, S. Wang, L. Li, et al.] // Virology Journal. – 2010. – Vol.7:184. – P.2-9.
148. Сюрин В. Н. Репродуктивный и респираторный синдромом свиней / В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьев, Н. В. Фомина // Вирусные болезни животных. – М. : ВНИТИБП, 1998. – С. 552–558.
149. Гребенникова Т. В. Средства лабораторной диагностики репродуктивного и респираторного синдрома свиней / Т. В. Гребенникова, А. Д. Забережный, Е. А. Непоклонов // Ветеринария. – 2005. – №10. – С. 24–26.

150. Саркисян Х. В. Проявление репродуктивно-респираторного синдрома свиней в Армении / Х. В. Саркисян, А. С. Оганян, Т. Э. Гаспарян // Актуальные проблемы инфекции патологии животных: материалы Международной научной конференции, посвященной 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2003. – С. 92-94.
151. Pitkin A. Further assessment of fomites and personnel as vehicles for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / A. Pitkin, J. Deen, S. Dee // The Canadian Journal of Veterinary Research. – 2009. – Vol.73. – P. 298-302.
152. Genetic diversity of European genotype PRRS in Central and Eastern Europe – an update / [Stadejek T., Balka G., Chabros K., et al.] // 21st international pig veterinary society congress: congress proceedings. – Vancouver, 2010.
153. 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.
154. 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.
155. 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 // Агроєкологічний журнал. – К. –2014. –№3. – С. 32-35.
156. 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