

формой устанавливали путем сравнения профилей амплифицированных ПЦР-продуктов. Синтезированные в процессе исследования Semi-RAPD праймеры могут быть рекомендованы для генотипирования выделенных и идентифицированных клонов.

УДК 619:616.9-636.1

**Шалгынбаев Э.К., Коспанова М. Н., Рябинникова А.И.,
Омарова З.Д., Орынбаев М.Б.**

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК

МОНИТОРИНГ, ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ГЕРПЕСВИРУСА ЛОШАДЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Аннотация

В работе представлены результаты исследований биологических проб, отобранных от больных лошадей с признаками респираторного заболевания, а так же результаты выделения герпесвируса лошадей и изучения культуральных свойств выделенного вируса. Установлено, что заболевание животных в хозяйствах Т. Рыскуловского и Кордайского районов Жамбылской области вызвано герпесвирусом лошадей. Выделен эпидемиологически актуальный для территории РК изолят герпесвируса лошадей 4 серотипа. Отработаны оптимальные условия культивирования герпесвируса лошадей 4 серотипа, позволяющие нарабатывать вирусную массу для приготовления диагностических и профилактических препаратов.

Ключевые слова: ринопневмония, мониторинг, серотип, культивирования, цитопатическое действие, электронная микроскопия.

Введение

К одним из широко распространенных вирусных заболеваний относятся герпесвирусные инфекции лошадей. В настоящее время известны герпесвирусы лошадей 9 типов, представленные альфа – и гаммагерпесвирусами. Из герпесвирусных болезней лошадей наибольшее экономическое значение имеют инфекции, возбудителями которых являются ВГЛ-1, вызывающий массовые аборты у кобыл, патологию органов дыхания у жеребят, спорадические случаи миелоэнцефалопатии у лошадей, независимо от возраста и физиологических особенностей; ВГЛ-4 – возбудитель ринопневмонии и спорадических абортов; ВГЛ-3 – возбудитель коитальной экзантемы лошадей, острого контагиозного заболевания, при котором поражается эпителий влагалища у кобыл и полового члена у жеребцов; ВГЛ-9 – возбудитель миелоэнцефалопатии лошадей и других гетерогенных хозяев: газелей, зебр, антилоп - часто с летальным исходом. Вирусы 2 и 5 типов (гаммагерпесвирусы) вызывают латентную инфекцию, а также участвуют в развитии респираторных поражений у жеребят. Наиболее значимые для коневодства заболевания вызывают вирусы 1-го (вирусный аборт) и 4-го (ринопневмония) типов [1, 2].

Ринопневмония - это вирусная инфекция лошадей, которая может проявляться поражением органов дыхания, абортами, пневмонией новорожденных жеребят или миелоэнцефалитами. Ранее заболевание было описано разными названиями: вирусный аборт кобыл, половая экзантема лошадей, катаральная инфлюэнца, герпес, ринотрахеит лошадей [1-3].

В естественных условиях болеют лошади, пони, ослы и мулы всех возрастов и пород независимо от пола. Более чувствительны чистокровные породы и молодняк до 1 года.

Различные штаммы вируса ринопневмонии размножаются в первичных культурах и субкультурах почек лошадей, пони, свиньи, теленка, овцы, тестикуллов, легких и селезенки лошади, а также в перевиваемых линиях клеток ВНК-21, AND, HeLa, RK-13. Размножение вируса в чувствительных культурах клеток сопровождается развитием цитопатических изменений характерных для вирусов группы герпес. Штаммы вируса, адаптированные к культурам клеток, оказывают более выраженный цитопатический эффект и накапливаются в высоких титрах. Цитопатогенное действие адаптированных штаммов наступает через 24-48 часов, а неадаптированных через 3-5 суток. Первым признаком цитопатических изменений служит появление отдельных округленных светлых клеток через 24-36 часов после заражения. В менее чувствительной к вирусу перевиваемой линии клеток почки теленка цитопатическое изменения в первые 2-3 суток имеют очаговый характер, затем они постепенно распространяются по всему монослою клеток. Пораженные клетки округляются и отделяются от стекла, в них образуются внутриядерные эозинофильные тельца-включения [4].

Ранее нами было показано, что ГПЛ 1 и 4 серотипов циркулируют в популяциях лошадей в различных регионах РК [5, 6].

Целью настоящей работы было определение эпизоотической ситуации по герпесвирусу лошадей в различных регионах РК, выделение эпидемиологически актуального штамма герпесвируса лошадей циркулирующего на территории РК и изучение культуральных свойств выделенного вируса.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили 114 проб (из них 105 смыва, 9 патологических материалов) от лошадей разных регионов Казахстана.

При постановке ПЦР в качестве положительного контроля использовали ДНК вакцинного штамма СВ/69.

Выделение ДНК из образцов проводили с помощью набора «Viral DNA Mini Kit», фирмы «Qiagen», в соответствии с инструкцией производителя.

Для выявления ГВЛ лошадей использовали праймеры специфические на ГВЛ 1-серотипа BS-1-P1 и gB1-R-2 (1-раунд), BS-1-P3 и gB1-R-a (2-раунд), а также праймеры специфические на ГВЛ 4-серотипа BS-4-P1 BS-4-P2 (1-раунд), BS-4-P3 и BS-4-P4 (2-раунд) [5].

ПЦР проводили с помощью коммерческого набора фирмы «Invitrogen».

Реакционная смесь для постановки реакции состояла из следующих компонентов: вода - 31,5 мкл; 10хбуфер - 5 мкл; dNTPS - 1 мкл; R праймер - 5 мкл; F праймер - 5 мкл; MgCl₂ - 2,5 мкл; TaqDNA polymerase - 0,5 мкл; ДНК - 2 мкл.

Постановку ОТ-ПЦР проводили при следующем температурном режиме: предденатурация – 94 °С - 4 мин; денатурация – 94 °С – 30 сек; отжиг - 60 °С - 30 сек; репликация – 72 °С – 90 сек, пост-репликация – 72 °С – 10 мин.

Аmplификацию проводили на приборе «MasterCycler» фирмы «Eppendorf», в течение 40 циклов.

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 1,5 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

Анализ продуктов амплификации проводили в 1,5 % агарозном геле на ТАЕ буфере. Размер ампликона на 1серотип - 770 п.о., на 4 серотип - 580 п.о.

Электронную микроскопию проводили методом негативного контрастирования с использованием 4 % раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты с рН 6.8. Вирус из органо-тканевого материала выделяли методом ультрацентрифугирования при 35000 об/мин в течение 45 мин из осветленного гомогената. Адсорбцию вируса на сетки с

фарфоровой подложкой напыленной углеродом проводили на капле вирусосодержащей жидкости в лунке тефлоновой пластины. Время адсорбции составляло 10 мин. После адсорбции сетку с образцом контрастировали на капле фосфорно-вольфрамовой кислоты в течение 5 мин и после просушивания исследовали в электронном микроскопе JEM-100 CX II JEOL при ускоряющем напряжении 80 Kv и увеличении 20-40 тысяч.

Культуры клеток выращивали в среде Игла MEM с добавлением 2 mM глутамина, 5 % сыворотки крови КРС для культур клеток, пенициллина по 100 ЕД/мл и стрептомицина по 100 мкг/мл.

Для выделения вируса использовали однодневную диплоидную клеточную культуру почки кролика (RK-13). Для этого с пробирок (матрасов) со сплошным клеточным монослоем сливали ростовую питательную среду, клетки 1 - 2 раза промывали раствором Хенкса для удаления сывороточных антител и ингибиторов. В каждую пробирку (матрас) вносили соответствующее количество вирусосодержащего материала и с помощью покачивания распределяли его равномерно по слою клеток и для адсорбции вируса оставляли в течение 1 - 2 часа при комнатной температуре. После этого вирусосодержащий материал удаляли и добавляли поддерживающую среду (в пробирку 1 - 2 мл, в матрасы около 10% объёма). Инкубировали в термостате при 37 °С. Все пробирки (матрасы) после заражения клеток ежедневно исследовали под малым увеличением микроскопа на наличие цитопатического действия (ЦПД), сравнивая культуры клеток, заражённые вирусом, с контрольными. Титр вируса определяли по инфекционному действию на культуру клеток и оценивали по методу Рида и Менча [7].

Результаты и обсуждение

С целью выяснения эпизоотической ситуации в РК по ринопневмонии лошадей в 2011-2012 гг. нами было проведено обследование хозяйств Жамбылской, Южно-Казахстанской, Алматинской, Костанайской, Северо-Казахстанской областей и собрано 114 проб патологического материала от абортированных плодов лошадей и носоглоточных смывов.

Исследование проб, доставленных из различных регионов РК, на наличие вируса ринопневмонии проводили методом ОТ-ПЦР и электронной микроскопии. Результаты исследования биологических проб в ПЦР представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты ОТ-ПЦР на ГВЛ

№	Место отбора проб	Количество исследованных проб	Количество положительных / процент положительных	
			1 серотип	4 серотип
1	Южно-Казахстанская область, с.Казыгурт, частный сектор	17	0/0	0/0
2	Жамбылская область, Кордайский р/н, с.Отар, частный сектор	20	1/20	-
3	Жамбылская область, Кордайский р/н с.Соганды, частный сектор	8	0/0	0/0
4	Жамбылская область, Кордайский р/н, с.Кордай, частный сектор	5	2/5	3/5
5	Жамбылская область, Т. Рыскулова р/н., ТОО «ЛКЗ»	5	0/0	2/40
6	Алматинская область, Жамбылский р/н, с.Матыбулак	4	0/0	0/0
7	Актюбинская область, Шалкарский район, частный сектор	5	0/0	0/0

8	Костанайская область, Костанайский район, ТОО «ОХ Заречный»	13	0/0	0/0
9	Костанайская область, Костанайский район, ТОО «Казак тулпары»	12	0/0	0/0
10	Северо-Казахстанская область, Кызылжарский, ИП Зарипов	25	0/0	0/0
	Всего:	144	1/2,3	2/4,5

В результате проведенных исследований установлено, что в 1 пробе из 5 доставленных из с. Отар Кордайского района Жамбылской области выявлен ГВЛ серотипа 1, в двух пробах из 5 доставленных из ТОО ЛКЗ Т.Рыскуловского района Жамбылской области выявлен ГВЛ серотипа 4, в пробах доставленных из п.Кордай Кордайского района Жамбылской области выявлен ГВЛ обоих серотипов.

Для выделения вирусов использовали диплоидную клеточную культуру почки кролика RK-13. Материалом для выделения вируса служили 20 % суспензии из паренхиматозных органов (легких, печени, селезенки), содержимое желудка плода и смывы из носовой полости.

В результате проведенных исследований на первом пассажном уровне из материала, доставленного из Т.Рыскуловского района Жамбылской области, был выделен цитопатогенный агент. Специфическое цитопатогенное действие наступало через 24-36 часов, первым признаком цитопатических изменений служило появление отдельных округленных, светлых клеток через 36 часов после заражения, затем они постепенно распространялись на весь клеточный пласт.

ПЦР исследование выделенного возбудителя позволило идентифицировать ГВЛ 4 серотипа.

В результате электронномикроскопических исследований в культуральных пробах был обнаружен вирус, который по морфологии и размерам вириона характерно к ГВЛ. Вирион имеет суперкапсид (наружную оболочку) диаметром 200-210 нм и центральный капсид гексогональной формы диаметром 80-90 нм (рисунок 1).

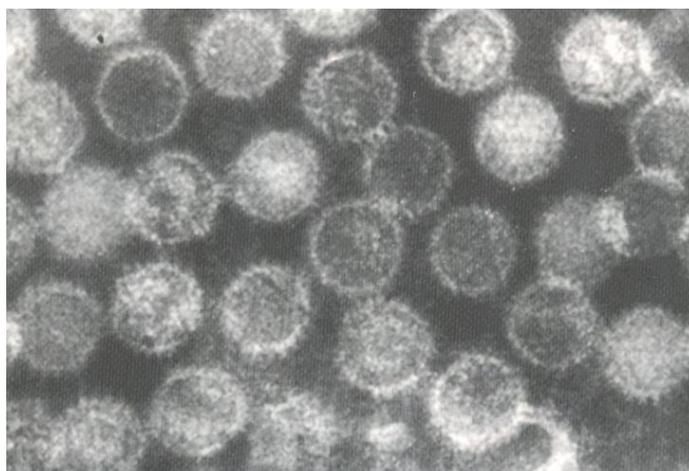


Рисунок 1 – Электронная фотография герпесвируса лошадей (негативное контрастирование 2 % раствором ФВК. *120 000)

С целью изучения культуральных свойств выделенного возбудителя было проведено 3-7 последовательных пассажей с использованием 1-2 суточной культуры клеток Vero, RK-13, ВНК-21, СПЭВ, ПТ-80.

Культивирование проводили в стационарных условиях в матрасах и пробирках в течение 2-10 суток при 37 °С до 70-90 % поражения монослоя клеток. Полученные пробы вирусосодержащего материала каждого пассажного титровали в одноименной культуре клеток с целью определения биологической активности.

Результаты исследований по определению чувствительности различных культур клеток к вирусу ГПЛ представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Чувствительность различных культур клеток к вирусу ринопневмонии лошадей

Культура клеток	Биологическая активность вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³						
	1 пас	2 пас	3 пас	4 пас	5 пас	6 пас	7 пас
РК-13	1,67 ± 0,08	3,25 ± 0,14	6,58 ± 0,08	н/и.	н/и.	н/и.	н/и.
Vero	-	1,83 ± 0,08	2,26 ± 0,07	2,75 ± 0,14	3,25 ± 0,14	4,0 ± 0,14	4,50 ± 0,09
ПТ-80	-	-	1,21 ± 0,31	2,26 ± 0,07	2,75 ± 0,14	2,75 ± 0,14	3,50 ± 0,25
ВНК-21	-	-	-	н/и.	н/и.	н/и.	н/и.
СПЭВ	-	-	-	н/и.	н/и.	н/и.	н/и.
Примечания 1 «-» - отрицательный результат 2 «н/и» - не исследовали							

В результате проведенных исследований было установлено, что наиболее активные вирусные материалы получены в культуре клеток РК-13, на уровне 3-го пассажа титр вируса составлял 6,58 ± 0,08 lg ТЦД₅₀/см³. Цитопатическое действие вируса проявлялось на 1-2 сутки.

Менее чувствительными культурами клеток оказались ПТ-80 и Vero, титр на уровне 7-го пассажа вируса составлял 3,50 ± 0,25 и 4,50 ± 0,09 ТЦД₅₀/см³, соответственно. ЦПД не было отмечено в перевиваемых культурах клеток ВНК-21 и СПЭВ.

В дальнейших исследованиях использовали перевиваемую линию культуры клеток РК-13.

Отработка оптимальных условий культивирования показало, максимальное накопление вируса ГВЛ 4 серотипа в культуре клеток при заражающей дозе от 0,01 до 1,0 ТЦД₅₀/см³ с инкубированием при 37 °С в течение 2-3 суток обеспечивает получение вируса с биологической активностью до 6,58 ± 0,08 lg ТЦД₅₀/см³.

Выводы

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что ГВЛ обоих серотипов циркулирует среди конепоголовья Жамбылской области. В культуре клеток РК-13 выделен изолят ГВЛ 4 серотипа. Отработаны оптимальные условия культивирования ГВЛ 4 серотипа, позволяющие нарабатывать вирусосодержащую суспензию пригодную для приготовления диагностических и профилактических препаратов.

Литература

1. Юров К.П. Инфекционные болезни лошадей // Изд-во «Грааль». – 2000. – С.19 - 36.

2. OIE - World organization for animal health / World Animal Health Information Database (WAHID) Interface // http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Countryreports

3. Patel J.R., Heldens J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)-epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review // *Vet J.* – 2005. – Vol. 170, №1. – P. 14-23.

4. Татаурова А. В., Юров К. П., Алексеенкова С. В. Нейропатогенные штаммы возбудителя ринопневмонии – вирусного аборта лошадей. // *Ветеринария*, 3,– 23. 2006. – С.20

5. Омарова З., Керимбаев А., Мусаева Г., Орынбаев М.Б. Обнаружение и типирование герпесвируса лошадей методом ПЦР // Сборник материалов международной научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 55-летию НИИПББ. Гвардейск-2013г. С.152-159

6. Шалгынбаев Э., Рябинникова А., Рыстаева Р., Омарова З., Орынбаев М.Б. Выделение и культивирование вируса ринопневмонии лошадей на культуре клеток // Материалы 2-ой международной научно-практической конференции молодых ученых, посвященный дню образования НИИПББ. Гвардейск, август, 2014 г. С.196-200

7. Reed I.J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *Am. J. Hyg.* – 1938. –Vol.27. – P. 493-497.

Шалгынбаев Э.К., Коспанова М. Н., Рябинникова А.И., Омарова З.Д., Орынбаев М.Б.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ АУМАҒЫНДАҒЫ ЖЫЛҚЫ ГЕРПЕСВИРУСЫН БӨЛІП АЛУ, ИДЕНТИФИКАЦИАЛАУ, МОНИТОРИНГЛАУ ЖӘНЕ ӨСІРУ

Бұл ғылыми жұмыста тыныс жолдары ауру белгілері бар жылқылардан алынған биологиялық сынамаларды зерттеу нәтижелері мен жылқының герпесвирусын бөліп алу мен бөлінген вирустың торша өсіндісінде өсу қасиеттерін зерттеу нәтижелері көрсетілген. Жылқылардан алынған биологиялық сынамаларды зерттеу нәтижесінде Жамбыл облысы Т.Рысқұлов ауданы «Азимбек» ЖШС-де «ЛЖЗ» ЖШС-де, Қордай ауданындағы Отар ауылында жылқылар герпес вируспен ауырғаны анықталды. Мақалада ПТР-мен жылқылардың герпес вирусын анықтау мүмкіндігі және ауру жылқылардан алынған биологиялық сынамалардан Қазақстан Республикасы аумағы үшін көкейкесті аурулардың бірі - жылқы герпесвирусының 4 серотипті штамы бөлініп алынды. Аурудың алдын-алу және балау шараларына арналған препараттар жасау үшін жылқы герпесвирусының 4 серотипті штамын өсірудің үйлесімді жағдайлары мен оның вирустық массасын жинақтау әдістері анықталды.

Shalgybayev E.K., Kospanova M.N., Ryabinnikova A.I., Omarova Z.D.,
Orynbayev M.B.

MONITORING, ISOLATION, IDENTIFICATION AND CULTIVATION OF EQUINE HERPESVIRUS, ISOLATED IN KAZAKHSTAN

The paper presents the results of investigations of biological samples collected from sick horses with signs of respiratory disease, as well as the results of equine herpesvirus isolation and study of cultural properties of the isolated virus. It has been established that the disease of animals in farms of T. Ryskulov and Korday districts of Zhambyl region caused by equine herpesvirus. Epidemiologically relevant for the RK isolate of equine herpesvirus serotype 4 was isolated. The optimal culture conditions of equine herpesvirus serotype 4 were perfected, allowing turning out viral load for the preparation of diagnostic and preventive medications.