

УДК 636.1:619

ВИРУСНАЯ РИНОПНЕВМОНИЯ ЛОШАДЕЙ И МЕТОДЫ ЕЕ ДИАГНОСТИКИ

Кадыков Р.Т., Кагермазов Ц.Б., Пежева М.Х.

ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный аграрный университет им. В.М. Кокова»,
Нальчик, e-mail: mpiezhieva@mail.ru

Коневодческая отрасль, вместе с молочным и мясным скотоводством, является одним из приоритетных направлений развития животноводства в Кабардино-Балкарской Республике, где довольно продолжительное время занимаются разведением не только кабардинской породы лошадей, но и чистокровной верховой и арабской пород. Основой для этого являются исторические предпосылки и особые природно-климатические условия в республике с ее богатейшими высокогорными альпийскими пастбищами. Инфекционные болезни лошадей наносят существенный ущерб коневодству и особенно племенному коннозаводству вследствие снижения племенной и спортивной ценности переболевших лошадей, затрат на лечение, карантинных мероприятий, срыва планов спортивных соревнований и других экономически значимых причин. Вирусная ринопневмония лошадей, относящаяся к герпесвирусной инфекции лошадей и самостоятельная в иммуногенном отношении, встречается в коневодческих хозяйствах Кабардино-Балкарии. Лабораторные методы ее диагностики имеют определенные недостатки и сложности. Предлагается более специфичный и чувствительный метод для диагностики вирусной ринопневмонии лошадей – метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на многократной репликации специфического участка нуклеотидной последовательности, катализируемый термостабильной ДНК-полимеразой. Приводятся результаты лабораторных исследований для обнаружения вируса ринопневмонии в пробах из органов взрослых лошадей, жеребят и абортированных плодов с подозрением на вирусную ринопневмонию лошадей на перевиваемых клетках МДВК, ПЭКр и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Ключевые слова: вирусная ринопневмония лошадей, метод полимеразной цепной реакции, герпесвирусные инфекции лошадей, ДНК вируса, Tag-полимераза, амплификация, праймер

VIRAL RHINOPNEUMONITIS HORSES AND METHODS OF ITS DIAGNOSTICS

Kadykoev R.T., Kagermazov Ts.B., Pezheva M.Kh.

Kabardino-Balkarian State Agrarian University named after V.M. Kokov, Nalchik,
e-mail: mpiezhieva@mail.ru

The horse breeding industry, together with dairy and meat cattle breeding, is one of the priority directions of livestock development in the Kabardino-Balkarian Republic and for quite a long time are engaged in breeding not only the Kabardian breed of horses, but also thoroughbred horse and Arab breeds. The basis for this is the historical prerequisites and special natural and climatic conditions in the republic with its richest high-altitude alpine pastures. Infectious diseases of horses cause significant damage to horse breeding and, especially, pedigree horse breeding due to the decrease in the pedigree and sports value of sickly horses, the cost of treatment, quarantine measures, disruption of sports competitions and other economically important reasons. Viral rhinopneumonia of horses, related to herpesvirus infection of horses and independent in immunogenic relation, occurs in horse farms of Kabardino-Balkaria. Laboratory methods for its diagnosis have certain disadvantages and difficulties. A more specific and sensitive method for the diagnosis of viral rhinopneumonia in horses is proposed, the polymerase chain reaction (PCR) method based on multiple replication of a specific region of the nucleotide sequence catalyzed by a thermostable DNA polymerase. The results of laboratory tests for the detection of the rhinopneumonia virus in samples from the organs of adult horses, foals and aborted fetuses with suspicion of viral rhinopneumonia of horses on transduced cells of MDVK, PEKCR, and polymerase chain reaction (PCR) are presented.

Keywords: viral rhinopneumonia of horses, polymerase chain reaction method, herpesvirus infections of horses, DNA of virus, Tag-polymerase, amplification, primer

Коневодческая отрасль, вместе с молочным и мясным скотоводством, является одним из приоритетных направлений развития животноводства в Кабардино-Балкарской Республике. Основой для этого являются исторические предпосылки и особые природно-климатические условия в республике с ее богатейшими высокогорными альпийскими пастбищами.

Кабардино-Балкария является одной из республик Северного Кавказа, где много естественных угодий с богатым разнотравьем. Только естественные горные пастбища занимают около 260 тыс. га. Из

них труднодоступных территорий, где нет возможности содержать молочных коров, свыше 200 тыс. га. На этих пастбищах в условиях горного климата и рельефа можно эффективно выпасать в течение длительного периода (с мая по ноябрь) местных, кабардинской породы лошадей [1].

В республике довольно продолжительное время занимаются разведением не только кабардинской породы лошадей, но и чистокровной верховой и арабской пород. Последние используются в спортивных целях, и численность поголовья их постоянно растет. Племенные лошади, предна-

значенные для гладких скачек, сосредоточены в двух конных заводах – Малкинском и Кабардинском, а также у частных конезаводчиков. Большой вклад в развитие отечественного коневодства внесли известные не только в Кабардино-Балкарской Республике, но и во всей Российской Федерации коневладельцы – В.К. Секреков, Р.Б. Фиров, А.З. Дышеков, А.Ж. Бифов, Д.А. Налоев. В целях повышения генетического потенциала племенных и спортивных качеств у них в конюшнях сосредоточены высокоценные скаковые племенные лошади, завезенные в разные годы в Россию из таких стран, как Англия, США, Франция, Аргентина.

Каждый год, в скаковой сезон, спортивных лошадей постоянно вывозят за пределы Кабардино-Балкарии для испытания и участия в скачках. В этих условиях всегда возрастает риск заноса инфекций, а затем и проявления различных заразных заболеваний лошадей. Инфекционные болезни лошадей наносят существенный ущерб коневодству и особенно племенному конезаводству вследствие снижения племенной и спортивной ценности переболевших лошадей, затрат на лечение, карантинных мероприятий, срыва планов спортивных соревнований и других экономически значимых причин. Наибольшую опасность представляют высококонтагиозные массовые заболевания вирусной и бактериальной природы. К таким заболеваниям можно отнести сальмонеллезный аборт, лептоспироз, мыт, грипп, герпесвирусные инфекции лошадей (ГВЛ).

Последние заслуживают особого внимания, так как диагностика и профилактика их имеют определенные сложности. Герпесвирусы лошадей разделяют на три типа, самостоятельные в иммуногенном отношении: 1 – возбудитель ринопневмонии – вирусного аборта лошадей (ГВЛ-1); 2 – латентный вирус лошадей, относящийся ко второму типу (ГВЛ-2); 3 – возбудитель коитальной половой экзантемы (ГВЛ-3). Из трех типов вирусов наибольший ущерб коневодству наносит ГВЛ-1 или ринопневмония. Экономический ущерб, наносимый инфекционной ринопневмонией лошадей, складывается из потери воспроизводительной способности конематок, выбраковки ценных племенных животных, затрат на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий. В естественных условиях вирус поражает лошадей, ослов и мулов независимо от пола, породы и возраста. Чистокровные лошади более восприимчивы к возбудителю, чем полукровки и местные породы. Ринопневмония лошадей, возникнув в коневодческом хозяйстве, принимает характер стационарной

инфекции. Острое течение инфекции чередуется с периодами стертого, атипичного проявления болезни, что крайне осложняет постановку диагноза. [2]. Респираторные штаммы ринопневмонии преимущественно поражают органы дыхания, а фетальные вызывают аборт во второй половине жеребости. Однако в одной популяции лошадей (отдельная конеферма, табун, коневодческое хозяйство) возможно существование и независимое друг от друга воспроизведение обоих типов ГВЛ-1 (респираторного и фетального). Каждый из них обуславливает вспышки заболевания, которые могут накладываться одна на другую [3]. Вирус распространяется аэрогенным или контактным путем.

Фетальные штаммы вируса передаются аэрогенно, контактно, трансплацентарно или при случке через половые органы.

Немаловажное значение имеет также изучение других видоизмененных штаммов герпесвирусов лошадей. В последнее время появляются новые варианты и штаммы возбудителей известных инфекций. Анализируя заболеваемость лошадей разного возраста, можно предположить, что гаммагерпесвирусы играют существенную роль в патологии респираторных органов этих животных. Гаммагерпесвирус типа 5 лошадей был идентифицирован в Австралии в 1970 г. у жеребят, в СССР он впервые был обнаружен у лошадей в 1974 г. Однако, этиологическая роль их в инфекционной патологии оставалась недостаточно понятной. В последнее время появились доказательства, что гаммагерпесвирус типа 5 часто вызывает поражение нижнего отдела органов дыхания у лошадей разного возраста. В Италии ГВЛ 5 идентифицировали методом ПЦР в носовых смывах у 73% молодых (1–3-летних) лошадей и у 80% старшего возраста [4]. Установлено, что ГВЛ 5 ассоциируется с патологией органов дыхания (хроническая или подострая пневмония), вызывая деструкцию легочной ткани – интерстициальная или фиброзная пневмония преимущественно у лошадей 2–6-летнего возраста [5].

Ранний диагноз, установленный при возникновении первых случаев заболевания, имеет большое значение для своевременной организации мероприятий по борьбе с инфекцией. В настоящее время существуют различные методы лабораторной диагностики вирусной ринопневмонии лошадей: выявление вируса *per se* (электронная микроскопия), выявление и идентификация вирусов посредством взаимодействующих с ним клеток (световая микроскопия, культуральный метод), вирусологические методы (обнаружение антигена вируса с по-

мощью ИФА, МФА и др.), выявление ДНК инфекционного агента (полимеразная цепная реакция, метод дот-гибридизации), серологические методы диагностики (выявление специфических противогерпетических антител). Вместе с тем некоторые из перечисленных методов диагностики данной болезни имеют определенные недостатки. Так, серологические методы не имеют диагностической ценности при исследовании сывороток абортировавших кобыл. Объясняется это тем, что аборт наступает обычно спустя один-три месяца после инфицирования дыхательных путей кобылы и к тому времени титр комплемент-связывающих антител остается примерно на том же уровне. Присутствие вируса в плоде не вызывает у кобылы увеличения количества антител.

Гистологическое исследование наиболее широко используется в практике, однако его ценность относительно ограничена, так как в исследуемом материале не всегда удается обнаружить характерные внутридерные тельца – включения Димока. Чаще всего их обнаруживают в ядрах эпителиальных клеток бронхиол и альвеол, а также клеток печени.

Приведенные причинные факторы, связанные с несовершенством и некоторыми недостатками методов и средств диагностики ринопневмонии лошадей, осложняют проведение эффективных мероприятий по оздоровлению неблагополучных по данному заболеванию коневодческих хозяйств. Вместе с тем предварительная клинико-инструментальная диагностика респираторной формы герпесвирусной инфекции типа ГВЛ-1 также затруднительна, так как симптомы заболевания сходны с клиникой других вирусных болезней, особенно гриппа. Подозрение на ринопневмонию может лишь возникнуть при нарастании случаев абортов во второй половине жеребости.

В последние годы на основе достижений молекулярной биологии ученые интенсивно разрабатывают новые методы диагностики вирусных болезней сельскохозяйственных животных. Для идентификации герпесвирусов животных широко применяют такие высокочувствительные методы исследования генома, как рестрикционный анализ, полимеразную цепную реакцию, секвенирование, молекулярную гибридизацию. Из этих методов в настоящее время широкое распространение в лабораторной диагностике отдельных вирусных болезней получил метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), в основе которой лежит многократная репликация специфического участка нуклеотидной последовательности, катализируемый термостабильной ДНК-полимеразой.

ПЦР-селективная амплификация (фактически клонирование) некоего фрагмента ДНК *in vitro*. Являясь самым чувствительным на сегодняшний день методом обнаружения инфекционных агентов, ПЦР не требует иммунологического ответа на проникновение возбудителя в организм хозяина, что позволяет установить заболевание на ранних стадиях. Специфичность ПЦР и количество амплифицируемой ДНК, которое определяет чувствительность, могут значительно варьировать в зависимости от концентрации и качества 5 основных компонентов реакционной смеси (ДНК-матрицы, Таг-полимеразы, праймеров, dNTP и ионов Mg) и температурного режима ПЦР. Неспецифичность ПЦР-амплификации повышается при снижении температуры отжига ниже оптимальной, а также при увеличении концентраций праймеров и dNTP, температуры отжига (уменьшается выход специфической амплифицируемой ДНК вплоть до ее полного исчезновения) выше оптимальных значений. Подбор праймеров – ключевое звено ПЦР, именно они определяют амплификацию и выявляют нужную последовательность, а также чрезвычайную гибкость метода. Для разработки праймеров требуется подобрать такой фрагмент молекулы ДНК, который отличался бы генетической консервативностью и присутствовал только у интересующего вида микроорганизмов или в исследуемом гене [6]. Высокая специфичность метода полимеразной цепной реакции обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов, в отличие от других методов лабораторной диагностики, в частности метода иммуноферментного анализа, где нередки ошибки в связи с перекрестнореагирующими антигенами. В связи с этим на основе рестрикционного анализа генома референс-штамма Кентуки-Д вируса ринопневмонии лошадей разработан набор препаратов для проведения полимеразной цепной реакции при идентификации вируса ринопневмонии лошадей [2].

Цель данной работы – выявление вируса ринопневмонии лошадей с диагностической целью на перевиваемых культурах клеток МДВК путем культивирования и пассирования и ДНК вируса методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в пробах патологических материалов, взятых от павших жеребят, вынужденно забитых лошадей и абортированных плодов с подозрением на ринопневмонию.

**Результативность выявления ДНК вируса ринопневмонии
при исследовании проб органов лошадей**

Животные	Пробы органов	Иссл. проб	Культура клеток МДВК	ПЦР			
				Д1 + Д2		Д3 + Д4	
				пробы	%	пробы	%
Взрослые лошади	Головной мозг	8	8/0	8/0	0	8/3	37,5
	Лимфатические узлы	8	8/0	8/0	0	8/2	25,0
Всего		16	16/0	16/0	0	16/5	31,2
Павшие жеребят	Головной мозг	11	11/0	11/2	18,2	11/5	45,4
	Лимфатические узлы	11	11/0	11/3	27,3	11/4	36,3
	Легкие	11	11/0	11/3	27,3	11/4	36,3
	Селезенка	11	11/0	11/2	18,2	11/5	45,4
Всего		44	44/0	44/10	22,7	44/18	40,9
Абортированные плоды	Головной мозг	12	12/0	12/2	16,6	12/4	33,3
	Лимфатические узлы	12	12/0	12/3	25,0	12/3	25,0
	Легкие	12	12/0	12/4	33,3	12/2	16,6
	Селезенка	12	12/0	12/2	16,6	12/4	33,3
Всего		48	48/0	48/11	22,9	48/13	27,1

Пр и м е ч а н и е . Числитель – количество исследованных проб; знаменатель – положительных проб.

Материалы и методы исследования

Патологический материал для проведения лабораторных исследований взяли от павших жеребят, вынужденно забитых лошадей и абортированных плодов с подозрением на ринопневмонию в двух конезаводах Чегемского района Кабардино-Балкарии.

Исследование на выявление вируса ринопневмонии лошадей проводили на перевиваемых культурах клеток МДВК, ПЭКр путем культивирования и пассирования. Для обнаружения ДНК вируса ринопневмонии лошадей в пробах патологического материала использовали специальный набор препаратов для проведения полимеразной цепной реакции при идентификации вируса ринопневмонии лошадей, разработанный на основе рестрикционного анализа генома референс-штамма Кентукки-Д вируса ринопневмонии лошадей.

С целью выделения ДНК к 0,1–0,5 мл вирус-содержащей суспензии в буфере ТЕ (20 мМ Трис-НСІ, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0) добавляли протеиназу К (100 мкг/мл), раствор саркозината натрия (0,5%) и 30 мин инкубировали при температуре 56 °С. После двукратной экстракции фенолом ДНК из водной фазы осаждали 2,5 объемами перегнанного этанола. Полученные таким образом препараты ДНК хранили при температуре минус 20 °С.

Для постановки полимеразной цепной реакции пробу исследуемой ДНК в объеме 5 мкл амплифицировали в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 10 нМ каждого праймера, 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 10 мМ трис-НСІ, рН 8,3, 50 мМ КСІ, 3,0 мМ MgСІ₂ и 2,5 ед. Таг-полимеразы. В качестве праймеров использовали нуклеотидную последовательность гена гликопротеина В штамма Кентукки-Д вируса ринопневмонии лошадей. Для амплификации в ПЦР фрагментов ДНК вируса ринопневмонии использовали две пары праймеров «внешние» (Д1+Д2, размер 602 п.о.) и «внутренние» (Д3+Д4, размер 472 п.о.) Амплификацию проводили в термоциклере «Touch Down», Hybaid (Англия) по

следующей программе: денатурация при 94 °С в течение 30 с, отжиг при 55 °С – 30 с, синтез при 72 °С – 50 с. Всего провели 35 циклов. Аликвоты ПЦР продуктов объемом 5–10 мкл анализировали в 2,0%-ном агарозном геле.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты проведенных исследований представлены в таблице.

Для обнаружения вируса ринопневмонии лошадей в исследуемых патологических материалах взяли кусочки из разных органов массой 100–150 мг, затем их гомогенизировали и разводили в буфере ТЕ (2,0% вес/об). Наличие вируса в полученной таким образом суспензии проверяли пассированием на перевиваемых культурах клеток МДВК и ПЭКр. После пяти последовательных пассажей на перевиваемых культурах клеток МДВК и ПЭКр, инфекционный вирус ринопневмонии лошадей не выявили.

Результаты дальнейших исследований также показали, что ДНК вируса ринопневмонии лошадей обнаружены в 7 пробах (селезенка, лимфатические узлы, легкие, головной мозг) павших жеребят из 11 проб. В органах вынужденно убитых лошадей с подозрением на ринопневмонию ДНК вируса выявили только после второй амплификации с гнездовыми параметрами Д3 + Д4, результативность обнаружения ДНК составила 37,5%. Наибольшее количество положительно реагирующих проб выявлено в пробах патологического материала, взятых с органов павших жеребят и составил 28 проб или 63,6%. При этом после первого цикла амплификации

с праймерами Д1 + Д2 составило 22,7%, после второго цикла амплификации с праймерами Д3 + Д4 выявление ДНК вируса в пробах головного мозга, средостенных лимфатических узлов, легких и селезенки – 40,9%.

В пробах абортированных плодов при исследовании методом полимеразной цепной реакции с применением двух пар праймеров, обнаружение ДНК вируса ринопневмонии составило 22,9% и 27,1% соответственно.

Выводы

1. Эпизоотические вспышки разной интенсивности вирусной ринопневмонии наряду с гриппом лошадей проявляются в коневодческих хозяйствах КБР.

2. Проведенные исследования показывают, что для диагностики вирусной ринопневмонии у лошадей определенные преимущества имеет метод полимеразной цепной реакции.

3. Данный метод является более практичным, специфичным и чувствительным для определения ДНК вируса ринопневмо-

нии лошадей в клинических образцах от инфицированных животных и абортированных плодов и позволяет установить диагноз в течение нескольких часов по сравнению с другими известными лабораторными методами.

Список литературы

1. Кагермазов Ц.Б., Кадыкоев Р.Т. Сохранение и развитие кабардинской лошади // Коневодство и конный спорт. – 2006. – № 2. – С. 2–4.
2. Цыбанов С.Ж., Цыбанова Л.Я., Кадыкоев Р.Т. Калабеков М.И. Идентификация вируса ринопневмонии лошадей с помощью ПЦР // Ветеринария. – 2000. – № 4. – С. 20–23.
3. Юров К.П., Заблоцкий В.Т., Косминков Н.Е. Вирусные болезни лошадей. – М.: Зоомедлит, 2010. – 256 с.
4. Юров К.П., Алексеенкова С.В. Выявление новых и нетипичных штаммов вирусов при респираторных болезнях крупного рогатого скота и лошадей // Ветеринария. – 2014. – № 12. – С. 8–12.
5. Юров К.П., Алексеенкова С.В., Юров Г.К. Герпесвирус лошадей 5 – возбудитель фиброза легких // Ветеринария. – 2013. – № 3. – С. 17–21.
6. Тупота Н.Л., Тупота С.Г., Донченко Н.А. Методы молекулярной биологии и их использование в диагностике туберкулеза животных // Ветеринария. – 2012. – № 3. – С. 26–30.