

**КЫРГЫЗСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА**

КЫРГЫЗСКО-ТУРЕЦКИЙ УНИВЕРСИТЕТ «МАНАС»

Диссертационный совет Д.06.22.649

На правах рукописи
УДК:619:578.822

Камарли Айтакин Алий-Сааб кызы

**Эпидемиология парвовирусного энтерита собак,
его диагностика**

06.02.02 – инфекционные и инвазионные болезни, вирусология,
микробиология и иммунология животных по ветеринарным наукам

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Бишкек – 2024

Работа выполнена в лаборатории болезней домашних животных Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева.

Научный руководитель:

Нургазиев Рысбек Зарылдыкович
доктор ветеринарных наук, профессор,
академик Национальной академии наук
Кыргызской Республики, Кыргызский
национальный аграрный университет
им. К.И. Скрябина, ректор

Официальные оппоненты:

Тулобаев Аскарбек Зарлыкович
доктор ветеринарных наук, профессор,
Кыргызско-Турецкий университет
«Манас»

Темирова Джузум Нарбековна,
кандидат ветеринарных наук, Институт
биотехнологии Национальной академии
наук Кыргызской Республики, ведущий
научный сотрудник

Ведущая (оппонирующая) организация: Таджикский аграрный университет им. Ш. Шотемура, кафедра микробиологии и эпизоотологии, 734003, Таджикистан, г. Душанбе, пр. Рудаки, 146.

Защита диссертации состоится 8 мая 2024 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета Д.06.22.649 по защите диссертации на соискание ученой степени кандидата (доктора) ветеринарных (биологических) наук при Кыргызском национальном аграрном университете им. К.И. Скрябина и Кыргызско-Турецком университете «Манас» по адресу: 720005, Бишкек, ул. Медерова, 68; в конференц зале. Ссылка доступна к видеоконференции защиты диссертации https://vc.vac.kg/b/d_0-c2m-p6r-8by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеках: Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина по адресу: ул. Медерова, 68, 720005, Бишкек, на сайте knau.kg и на сайте www.vak.kg.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук

Крутская Е.Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Селекция, разведение собак является одной из неотъемлемых отраслей социально-бытовой, экономической и политической жизни человечества. Потребность людей в этом виде животных совершенно очевидна, независимо от уровня развития общества [Максимов Н.А., 1989; Чижов В.А., 1995]. Принимая во внимание занимаемое положение собак в человеческом обществе, необходимо отметить, что эти животные, особенно дорогостоящие и высокопородные, наряду с другими видами животных подвержены различным заразным заболеваниям. В большинстве случаев наиболее распространенным из них является парвовирусный энтерит собак [Сюрин В.Н., 1998].

Парвовирусный энтерит собак (лат. – Parvovirus enteritis canum; англ. – Minute virus infection of dogs, вирусный энтерит собак, «олимпийка») – это высококонтагиозное и быстропротекающее инфекционное заболевание. Часто приводит к смертельному исходу, особенно щенков моложе 6-месячного возраста. У больных животных происходит поражение желудочно-кишечного тракта, обезвоживание организма из-за диареи, рвоты, что приводит к ослаблению деятельности сердечной мышцы [Parish C.R., 1988].

В Кыргызской Республике сфера использования собак очень разнообразна и вовлекает широкий круг людей, занимающихся разведением собак различных пород, ввоз щенков из зарубежных стран. Важным условием поддержания экологической и эпидемиологической безопасности является контроль и предупреждение гибели инфекционных и инвазионных болезней домашних животных. Успех борьбы с болезнями животных во многом зависит от производимых ветеринарной наукой высокоэффективных профилактических и лечебных средств и их широкого применения.

Связь темы диссертации с приоритетными научными направлениями, крупными научными программами (проектами), основными научно-исследовательскими работами, проводимыми образовательными и научными учреждениями. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева: «Эпизоотологический мониторинг вирусных болезней домашних животных и разработка стратегии борьбы с ними» (2015-2018), номер госрегистрации 0007145; «Эпизоотологический мониторинг по инфекционным болезням плотоядных на территории Кыргызской Республики и совершенствование методов их профилактики» (2019-2021), номер госрегистрации 0007811.

Цель исследования. Проведение эпидемиологического мониторинга по парвовирусному энтериту среди собак, диагностика на основе изучения клинических признаков, макроскопии внутренних органов и тканей, выявление антигенных типов парвовирусного энтерита собак (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c) с применением молекулярно-биологических методов (полимеразной цепной реакции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени) с разработкой общего праймера CPV-VP2.

Для достижения указанной цели предстояло решить следующие задачи:

1. Провести отбор проб биологического материала для проведения эпидемиологического мониторинга по распространению парвовирусного энтерита среди собак в г. Бишкек (по заболеваемости, сезонности, полу, возрасту, породе и иммунного статуса заболевших собак).

2. Провести макроскопические исследования внутренних органов при заболевании их парвовирусным энтеритом собак.

3. Разработать общий праймер и провести выявление возбудителя парвовирусного энтерита собак с применением полимеразной цепной реакции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

4. Выявить антигенные типы парвовирусного энтерита собак CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c с применением полимеразной цепной реакции.

5. Разработать методические рекомендации по эпидемиологии, терапии и лабораторной диагностике парвовирусного энтерита собак.

Научная новизна полученных результатов. Впервые среди домашних собак г. Бишкек проведен эпидемиологический мониторинг распространения парвовирусного энтерита и его лабораторная диагностика молекулярно-биологическим методом. Проведено комплексное изучение клинических особенностей и макроскопических изменений внутренних органов у собак, больных парвовирусным энтеритом. Разработан и оптимизирован общий праймер для выявления вируса парвовирусного энтерита собак. Оптимизирована методика постановки диагностических реакций и выявлены разнообразия антигенных типов вируса парвовирусного энтерита среди собак (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c) в г. Бишкек.

Практическая значимость полученных результатов. Полученные данные подтверждают широкое распространение парвовирусного энтерита собак по г. Бишкек и выявлены разнообразия антигенных типов вируса (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c). Зараженность парвовирусной инфекцией имеет сезонные колебания и породную восприимчивость, а также зависит от возраста и иммунного статуса собак. Разработан и предложен для лабораторной диагностики общий праймер CPV-VP2.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- эпидемиологический мониторинг парвовирусного энтерита собак в г. Бишкек за 2015-2021 гг.;
- клинические признаки болезни и макроскопические изменения внутренних органов при парвовирусном энтерите собак;
- разработан и оптимизирован общий праймер для выявления вируса CPV-VP2 методом полимеразной цепной реакции;
- антигенные типы парвовирусного энтерита собак (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c).

Личный вклад соискателя. Все разделы диссертационной работы выполнены при личном участии автора. Отдельные этапы работы исследований по проведению исследовательских работ проведены совместно под руководством научного руководителя доктора ветеринарных наук, профессора, академика НАН КР Нургазиева Р.З.

Апробации результатов исследований. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Международной научно-практической конференции «Интеграция науки и практики в обеспечении ветеринарного благополучия», посвященной 110-летию Казахского научно-исследовательского ветеринарного института (Алматы, 2015); на Международной научно-практической конференции «Сохранение и развитие собак породы казахские тазы и тобет», в Республиканском государственном предприятии «Институте зоологии» (Алматы, 2016); на Международной научно-практической конференции молодых ученых «Научный взгляд молодых: поиски, инновации в агропромышленном комплексе» (Алматы, 2017).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ в изданиях, утвержденных президиумом НАК КР, в том числе две статьи в журналах РИНЦ с импакт фактором 0,394 и 0,484 и в электронном журнале НАК КР. Разработаны две методические рекомендации.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 132 страницах и включает: введение, обзор литературы, методологию и методы исследований, собственные исследования и их обсуждение, заключение, практические рекомендации. Работа иллюстрирована 43 рисунками, 13 таблицами. Список использованной литературы включает 163 наименований. В приложениях представлены документы, подтверждающие достоверность проведенных исследований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность исследований парвовирусного энтерита собак, как высококонтагиозное заболевание среди чистопородных собак. В настоящее время сложная эпидемиологическая ситуация по парвовирусной инфекции среди домашних животных сохраняется в нашей республике повсеместно.

Глава 1. Обзор литературы. Изложены данные ведущих отечественных и зарубежных ученых, которые непосредственно занимались исследованиями по молекулярной диагностике, клинического проявления и макроскопии заболевания, его профилактики и лечения парвовирусного энтерита собак в вирусологии и молекулярной биологии.

Глава 2. Методология и методы исследования. Описываются объекты исследования, раскрывается методический подход к выполнению исследований.

Объект исследования: восприимчивые животные (собаки), патологический материал (смывы, тонкий и толстый отдел кишечника).

Предмет исследования: клиническая картина, макроскопические изменения органов, выявление вируса парвовирусного энтерита собак.

Методы исследования: клинические, макроскопические и молекулярно-биологические.

Глава 3. Результаты собственных исследований.

3.1. Эпидемиологическая характеристика парвовирусного энтерита собак по г. Бишкек. В этом разделе представлены следующие данные: указано динамика численности популяции собак за 2015-2021 гг. по всей республике и по г. Бишкек, представлены данные о заболеваемости и смертности собак, был проведен анализ в зависимости от сезона, пола, возраста, породной принадлежности и статуса вакцинации.

За 2015-2021 гг. было обследовано 180 собак разного пола, возраста и породы. От 180 больных собак по клиническим признакам отобрали 160 проб биологического материала (смывы).

С помощью твердофазного иммунохроматографического экспресс-теста для качественного обнаружения антигенов Canine Parvovirus, Canine Coronavirus, Giardia из отобранных 160 образцов было получено 112 (70,0%) положительных случаев инфицирования CPV (рисунок 3.3).



Рисунок 3.3 – Экспресс-тест для качественного обнаружения Ag CPV, CCV, GIA

С применением классического метода ПЦР горизонтального типа из 160 образцов положительный результат выявили в 117 образцах, что составило 73,1%. Результаты положительных образцов методом ИХА дали в 117 образцах, что составило 100%. С применением классического метода ПЦР из 160 образцов положительный результат выявили в 117 образцах, что составило 73,1%.

Самый высокий уровень зараженности был зарегистрирован в 2017 году, а самый низкий – в 2019 году (рисунок 3.4).

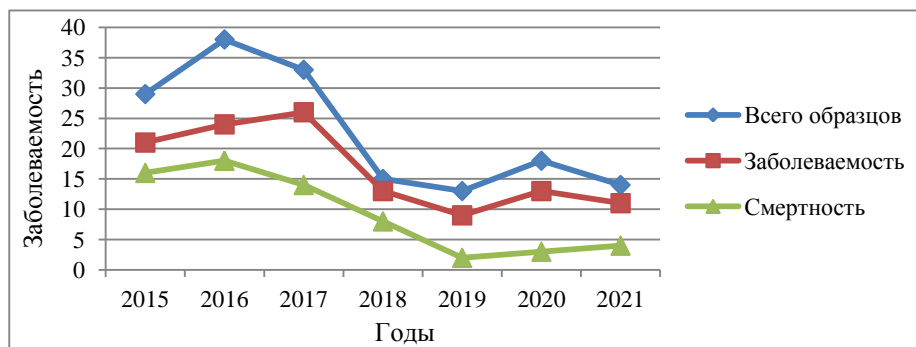


Рисунок 3.4 – Заболееваемость и смертность собак парвовирусным энтеритом собак по г. Бишкек

Регистрация больных животных и собственные наблюдения показали, что заболевание не имело характерную сезонность, но наблюдался определенный подъём и спад инфекции. Максимальный подъём заболеваемости наблюдали в весенне-осенний период, сезонная заболеваемость колебалась от 13,6% (16/117) до 35,0% (41/117) с пиком в весенний период.

Половой предрасположенности собак к заражению парвовирусным энтеритом не установлено. Не выявлено существенной разницы в уровне заболеваемости между самцами 52,9% (62/117) и самками собак 47,0% (55/117) соответственно.

Возрастная восприимчивость собак к парвовирусному энтериту приведена на рисунке 3.7.

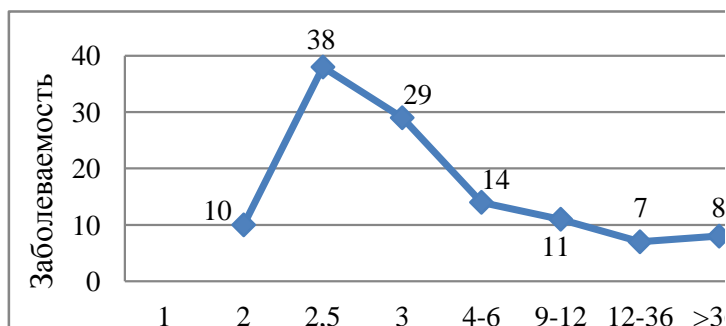


Рисунок 3.7 – Заболеваемость собак парвовирусным энтеритом собак в зависимости от возраста животного

Частота диагностирования парвовирусного энтерита впервые 6 месяцев жизни составляла 77,7% от общего количества положительных случаев инфекции (91/117). Реже и в более легкой форме болели парвовирусом взрослые собаки в возрасте от 9 месяцев до года, что составило 9,4% (11/117). По нашим наблюдениям в категории взрослых собак в возрасте от 1 до 6 лет показатели заболеваемости составили 12,8% или 15/117 заболевших особи.

По породной принадлежности из 117 случаев заражения собак парвовирусным энтеритом: 28 – были породы русский спаниель; 18 – немецкой овчарки; 11 – породы шпиц; 15 – голов породы кавказская и среднеазиатская овчарки, французский бульдог, лайка, хаски, боксёры, ротвейлеры и метисы; остальные 45 голов беспородных. Из общего количества собак приводиться процентное соотношение на рисунке 3.8.

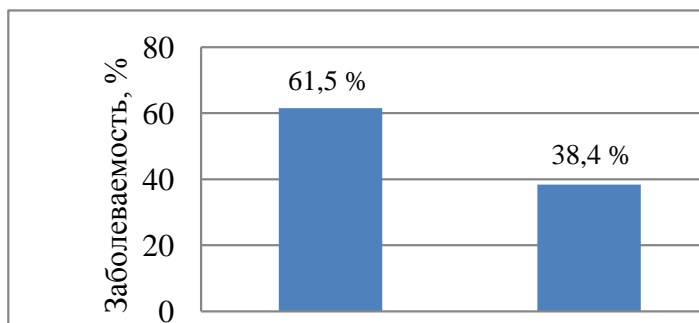


Рисунок 3.8 – Заболеемость парвовирусного энтерита собак в зависимости от породной принадлежности

Частота диагностирования парвовирусного энтерита выше среди чистопородных собак – свыше 72 голов (61,5%) по сравнению с беспородными – 45 голов (38,4%) соответственно.

Высокая зараженность среди не вакцинированных собак составило 109 (93,1%) головы, по сравнению с периодически вакцинированными собаками – 6 голов (5,1%), но значительно по сравнению с полностью вакцинированными собаками 2 головы (1,7%) (рисунок 3.9).

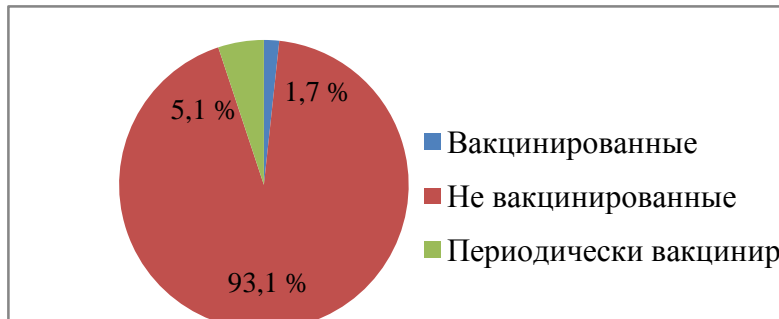


Рисунок 3.9 – Заболеемость парвовирусного энтерита собак в зависимости от статуса вакцинации

3.2. Клиническая и макроскопическая характеристика при парвовирусном энтерите собак. В этом разделе отмечали клинические проявления болезни у собак г. Бишкек. У щенят в возрасте от 2-х до 6 месяцев наблюдали характерное острое, подострое развитие болезни. Несмотря на то, что ПВС рассматривается в ветеринарии, как болезнь щенков, болезнь в субклинической форме встречался и среди взрослых животных от 1 года до 6 лет. При первичном осмотре у щенков температура

тела колебалась в пределах $40,1-40,3^{\circ}\text{C}$. С началом клинических признаков температура тела повышалась до $40,5\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, а спустя 3-е суток от начала болезни температура тела снижалась до $37,3\pm 0,2^{\circ}\text{C}$. критический период температура тела колебалась от $39,3$ до $39,8^{\circ}\text{C}$. Клиническими признаками являлись рвота с ярко выраженным характерным запахом. Диарея желтоватого оттенка со зловонным запахом, в течение 2-3-х дней в фекалиях обнаруживали слизь, а на 3-5-й день прожилки крови. При пальпации в области брюшины наблюдалась болезненность и вздутие живота. Во всех случаях поражения ЖКТ у больных начиналось с отказа от корма и воды, изнуряющая повторяющаяся рвота, наблюдалась сонливость и литаргия.

3.2.1. Особенности макроскопических изменений органов и тканей собак при парвовирусном энтерите собак. Всего макроскопическим методом исследования обследовано 18 павших собак разного возраста и породы с предварительным диагнозом на ПВС. У всех обследованных животных макроскопические изменения проявились в двух формах болезни – кишечной и смешанной.

В большинстве случаев была диагностирована кишечная форма ПВС. Щенки болели от 3 до 7 и более дней. Локализацию патологического процесса при кишечной форме наблюдали в тонком и толстом отделах кишечника. Он проявлялся серозно-геморрагическим, серозно-катаральным и фибринозным воспалением (рисунки 3.18, 3.19).



Рисунок 3.18 – Пятнисто-полосчатые кровоизлияния в просвете всего кишечника



Рисунок 3.19 – Геморрагические кровоизлияния в просвете всего кишечника

При кишечной форме ПВС у щенков наблюдали увеличение селезенки, капсула напряжена, края притуплены, паренхима имела темно-вишневого цвета, дряблой консистенции (рисунки 3.21).



Рисунок 3.21 – Селезенка однородного темно-вишневого цвета

При вскрытии щенков немецкой овчарки и беспородных животных обнаруживали взрослых токсокар в просвете кишечника. Признаком вторичной инфекции служила увеличенная в размере селезенка, поверхность имела темно-бардового цвета. Паренхима печени увеличена в объеме, имела мозаичный вид серого и коричневого цвета на красно-коричневом фоне (рисунок 3.22).



Рисунок 3.22 – Зернистая дистрофия печени и гематомы в селезенки

Патологоанатомические изменения тонкого отдела кишечника были обнаружены у павших щенков, больных более 10 дней. По характеру воспаления эти изменения соответствовали серозно-катаральному энтериту. При серозно-катаральном воспалении слизистая оболочка набухшая, отечная и тусклая, с неравномерной гиперемией и складчатостью оболочки. В них содержались сгустки крови красно-черного цвета, они тяжело отделялись от поверхности слизистой (рисунок 3.23).



Рисунок 3.23 – Серозно-катаральное воспаление отделов кишечника, печень светло-коричневого оттенка

Печень у таких щенков была увеличена в объеме неправильной формы, края притуплены, паренхима печени имела светло-коричневый оттенок.

Наиболее выраженные патологии обнаруживались в лимфатических узлах, брыжейке тонкого и толстого отделов кишечника. Серозная оболочка отечна и имела серо-красный оттенок. Брыжеечные лимфатические узлы характеризовались отеком и увеличением брыжеечных кровеносных сосудов, наполненных кровью. Кровеносные сосуды брыжейки и сальника инъецированы (рисунок 3.28).



Рисунок 3.28 – Геморрагический лимфаденит брыжейки. Слизистая отделов кишечника с выраженной гиперемией с изъязвлениями

При смешанной форме щенки болели от 5-8 дней. Локализацию патологического процесса при смешанной форме ПВС наблюдали помимо отделов кишечника, также и в сердце. У щенков с острым сердечным поражением легкие были отечны, видны локальные красно-серые участки, часто расположенные в краниальных и средних долях. Легкие были увеличены в объеме, края заострены и имели пестрый рисунок. У щенков с

острым миокардитом сердце было увеличено в объеме и имело неправильное очертание треугольника с широким основанием, имелись очаги некроза (рисунок 3.29).



Рисунок 3.29 – Миокардит острой сердечной недостаточности

3.3. Конструирование праймеров для определения возбудителя парвовирусного энтерита собак. Проанализировав последние исследования гена VP2, хранящиеся в базах данных, были получены антигенные вариации секвенированных ДНК из NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Набор данных был выровнен с применением метода ClustalW. Праймеры были разработаны с использованием программного обеспечения Primer3 v.0.4.0 (<http://primer3.sourceforge.net/>). Выбранные праймеры были выбраны путем их сопоставления с выравниванием.

Используя программу MultAlin, мы сравнивали секвенированные ДНК последовательности общего типа и его антигенные вариации 2a, 2b и 2c между собой и получили идентичные участки каждого генома. При сборе мы выбирали секвенированные участки генома из расчета, что они должны быть близкими к нашему географическому региону и по подходящему размеру генома. Впервые получили праймер и адаптирована программа его работы для диагностики ПЦР генов парвовирусного энтерита CPV-VP2.

Для дифференциации антигенных типов парвовирусного энтерита использовались праймеры со следующими последовательностями нуклеотидов (табл. 3.2).

Таблица 3.2 – Состав праймеров и размер ампликонов генов CPV

№ п/п	Наименование праймеров	Последовательность праймеров (от 5' к 3')	Продукт ПЦР, п.н.
1	CPV-2a (F) CPV-2a (R)	AGAGCATTGGGCTTACCACC ATCTTCCTGTATCTTGATGTGCT	379
2	CPV-2b (F) CPV-2b (R)	CTT TAA CCT TCC TGT AAC AG CAT AGT TAA ATT GGT TAT CTA C	429
3	CPV-2c (F) CPV-2c (R)	GTGGTTCTGGGGGTGTGG AGCTGCTGGAGTAAATGGCA	470
Конструированная последовательность универсального праймера			
4	CPV-VP2 (F) CPV-VP2 (R)	GAG TGA TGG AGC AGT TCA ACC CGC TCC CCC CCG TCC TGC T	992

Таким образом, мы выбрали идентичные участки для конструирования нового праймера. Данный прямой праймер, как показано, на рисунке 3.31 подходит ко всем типам CPV-VP2. На рисунке 3.32 видно, что и второй обратный праймер идентичен также как и прямой праймер, что доказывает его универсальность для трех типов сразу и дает возможность, получить положительный результат при проведении исследований в биоматериале используя один общий праймер. Таким образом, мы можем отсортировать положительные пробы от отрицательных для дальнейшего глубокого изучения.



Рисунок 3.31 – Сопоставление прямого праймера с общим геномом с его антигенными типами CPV-2a, CPV-2b и CPV-2с капсидного белка VP2

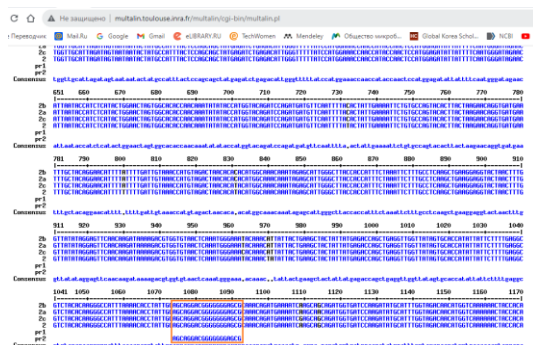


Рисунок 3.32 – Сопоставление обратного праймера с общим геномом и его антигенными типами CPV-2a, CPV-2b и CPV-2с капсидного белка VP2

Выбранный для амплификации участок генома достаточно консервативный и не имеет гомологии с другими типами вирусов возбудителями болезней. Таким образом, был сконструирован общий праймер, специфичный всем типам парвовируса CPV-VP2 (2a, 2b и 2с).

3.4. Молекулярно-биологические исследования ДНК вируса парвовирусного энтерита собак. Отбирали по 200 мкл клинических образцов, которые использовали для приготовления матричной ДНК путем кипячения при 96°C в течение 10 минут. В целях обеспечения оптимальной концентрации несвязанных ионов установили концентрацию ДНК, праймера, dNTP и полимеразы в интервале от 1 до 5 мМ.

Для идентификации вируса CPV-VP2 использовали реакционную смесь конечным объемом (в расчете на 1 пробу) 20 мкл, представленные в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Состав мастер микса для проведения ПЦР, в микролитрах (μl)

Компоненты ПЦР мастер микса	Кол-во в микролитрах, μl
ddH ₂ O	9,2
Буфер 5x	4
MgCl ₂ 25 mM	1,2
dNTP 10x	0,4
Праймер CPV прямой	1
Праймер CPV обратный	1
Taq-полимераза 5 U/мкл	0,2
ДНК вируса CPV	3

Следующим этапом было проведение оптимизации ПЦР-анализа с применением специфических праймеров для идентификации вируса парвовирусного энтерита собак.

3.4.1. Разработка рабочего протокола для проведения амплификации и учет результатов после ПЦР методом электрофореза в агарозном геле. Рабочий протокол с температурными режимами для проведения ПЦР с помощью амплификации исследуемых ДНК продуктов на CPV-VP2 представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Протокол амплификации участков гена вируса CPV-VP2

Этапы амплификации	Температурный режим, °C	Продолжительность, мин., сек.	Количество циклов амплификации
начальная денатурация	94°C	2 мин 30 сек	1
денатурация отжиг праймеров элонгация	94°C 55°C 72°C	40 сек 45 сек 45 сек	36
окончательная элонгация	72°C	5 мин	1

Для проведения отжига праймеров во время амплификации выбирали температурную градацию от 53°C до 59°C. Получены спектры электрофоретических продуктов для амплификации, указывающие, что оптимальная температура отжига для CPV-VP2 составила 55°C.

По завершению электрофореза на агарозном геле положительные ампликоны получили в трех пробах (1, 2 и 3), где длина продукта амплификации составила 992 п.н. фрагмента капсидного белка гена, кодирующего VP2 трех типов CPV-2a, 2b и 2c (рисунок 3.33).

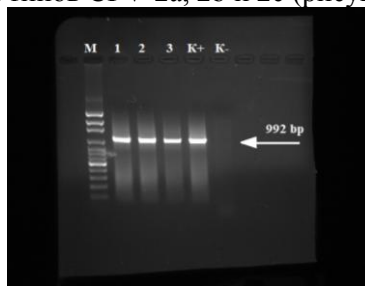


Рисунок 3.33 – Результаты ПЦР с парой разработанных праймеров (CPV-VP2), М – маркер, 1-3 – клинические образцы, К+, К- – контроли

Данная пара праймеров была способна связываться с любым геномом CPV-2a, CPV-2b и CPV2с, давая соответствующий продукт ПЦР ожидаемого размера.

Дифференциальный праймер CPV-2a был использован для выявления из биологического материала участков гена вируса CPV-2a (Mohammed Nayel, 2019). По завершению электрофореза положительные результаты получили во всех девяти пробах, где длина продукта амплификации составила 379 п.н. фрагмента капсидного белка гена, кодирующего VP2 одного типа CPV-2a (рисунок 3.35).

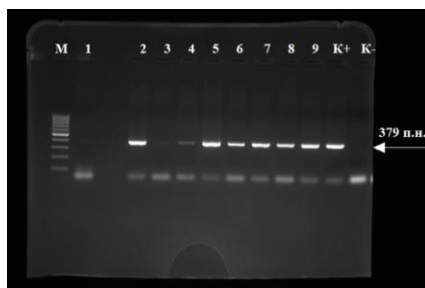


Рисунок 3.35 – Результаты ПЦР с парой универсальных праймеров (CPV-2a), М – маркер, 1-9 – клинические образцы, К+, К- – контроли

Дифференциальный праймер CPV-2b был использован для выявления из биологического материала участков гена вируса CPV-2b (S. Parthiban, 2010). В результате электрофореза положительные результаты получили в восьми пробах (с 1 по 8), где длина продукта амплификации составила 429 п.н. фрагмента капсидного белка гена, кодирующего VP2 одного типа CPV-2b (рисунок 3.36).

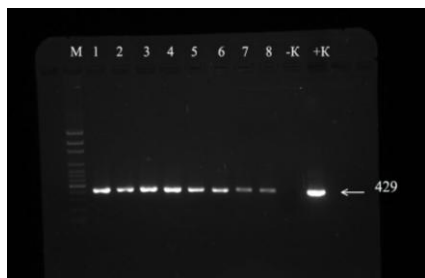


Рисунок 3.36 – Результаты ПЦР с парой универсальных праймеров (CPV-2b), М – маркер, 1-8 – клинические образцы, -К, +К – контроли

Дифференциальный праймер CPV-2с был использован для выявления из биологического материала участков гена вируса CPV-2с (Mohammed Nayel, 2019). В результате электрофореза положительные результаты получили в семи пробах (2, 4 по 9), где длина продукта амплификации составила 470 п.н. фрагмента капсидного белка гена, кодирующего VP2 одного типа CPV-2с (рисунок 3.37).

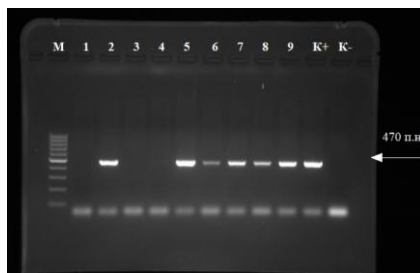


Рисунок 3.37 – Результаты ПЦР с парой универсальных праймеров (CPV-2с), М – маркер, 1-9 – клинические образцы, К+, К- –контроли

Размер ПЦР-продукта после амплификации составил 379 п.н. для праймеров CPV-2а, 429 п.н. для праймеров CPV-2b, 470 п.н. для праймеров CPV-2с и 992 п.н. для разработанного общего праймера CPV-VP2 (2а, 2b и 2с).

Таким образом, с целью упрощения и сокращения затратности ПЦР-диагностики нами разработан метод обнаружения генома парвовирусного энтерита с использованием одной парой праймеров. Данная методика может быть использована для одновременного скрининга большого числа проб.

3.4.2. Использование метода ПЦР в режиме реального времени для выявления парвовирусного энтерита (CPV). В качестве референсного метода исследования использовали метод ПЦР-РВ. Для последующих исследований мы отобрали сильно положительные и слабо положительные пробы, также отрицательные пробы для проверки на ПЦР-РВ. Из общего количества проб (160) было выявлено положительно 117 пробы классическим методом ПЦР. Из них сильное свечение дали 97 проб, остальные дали среднее свечение. Из 97 проб мы выборочно отобрали с сильным свечением 10 проб, со средним свечением 10 проб и 5 проб давших отрицательный результат.

Результаты проведения парвовирусного энтерита собак методом ПЦР в режиме реального времени (рисунок 3.38).

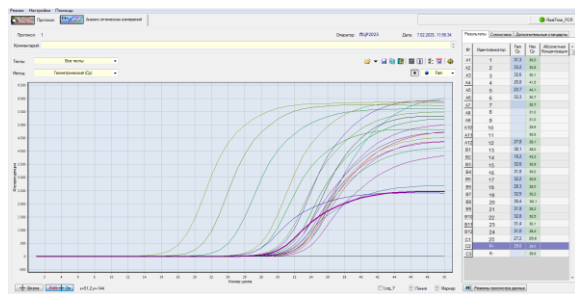


Рисунок 3.38 – Полученные результаты методом ПЦР в режиме реального времени на ПВС

В результате мы получили график результатов роста кривых линий. С сильным свечением дали 8 проб на ранних циклах начиная от 18 до 30 циклов. Остальные положительные пробы дали рост кривых линий начиная от 30 до 33 цикла. По данным производителя положительным считаются те пробы, у которых поднятие кривых линий идет до 37 цикла. Отрицательные пробы дали ожидаемый отрицательный результат. Все контроли сработали, что является показателем успешного проведения анализа.

3.4.3. Отработка праймера CPV-VP2 для выявления парвовирусного энтерита собак

Для более полного представления о практической значимости проведенных исследований приведены результаты применения разработанной тест-системы для выявления возбудителя ПВС.

Всего за 2022 и 2023 гг. отобрано 378 проб от собак во время проведения клинического осмотра с ветеринарными врачами частных клиник г. Бишкек. Для проведения исследований на наличие возбудителя парвовирусного энтерита собак пробы исследовали с помощью разработанного общего праймера CPV-VP2 методом полимеразной цепной реакции. Из общего количества отобранных проб положительные дали 105 проб.

Результаты проведения диагностики парвовирусного энтерита собак методом ПЦР общим праймером CPV-VP2 (рисунок 3.39).

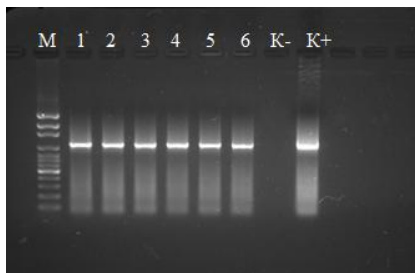


Рисунок 3.39 – Результаты ПЦР с парой разработанных праймеров (CPV-VP2), М – маркер, 1-6 – клинические образцы, К-, К+ – контроли

Полученные результаты подтверждают возможность использования разработанных олигонуклеотидных праймеров для детекции и идентификации возбудителя вируса ПВС в биологическом материале.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. За период 2015-2021 гг. в г. Бишкек зарегистрировано 117 случая заболевания собак парвовирусным энтеритом молекулярно-биологическим методом.

2. Основные клинические признаки болезни собак являются отказ от корма и воды, повышенная температура тела, угнетенное состояние, рвота и диарея с примесью крови, поражения дыхательной и сердечнососудистой системы, сонливость, литаргия, болезненность в области живота.

3. Основные макроскопические изменения в органах у павших собак являются миокардит, атрофия тимуса, инфаркты селезенки, воспаление тонкого и толстого отделов кишечника и лимфаденит брыжеечных лимфатических узлов.

4. Впервые в Кыргызской Республике разработан и оптимизирован общий праймер, специфичный к циркулирующему генотипу парвовирусного энтерита, отработан его температурный градиент.

5. Впервые проведена антигенная характеристика парвовирусного энтерита (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью предотвращения эпизоотий по ПВС рекомендуется вакцинировать щенков/собак, начиная с 6-недельного возраста, двукратно с последующей ревакцинацией через 21 день. Следующую вакцинацию проводить спустя год после обработки антигельминтозными препаратами.

2. Владельцам больных собак ПВС необходимо своевременно обращаться в специализированные ветеринарные клиники за лечебной помощью для своих питомцев.

3. Разработанный и оптимизированный общий праймер подходит для выявления геномной ДНК вируса CPV-VP2 (2a, 2b и 2c) методом ПЦР.

4. Полученные результаты изложены в рекомендации «Парвовирусный энтерит собак: эпидемиология, диагностика, профилактика и меры борьбы»; в рекомендации «Идентификация вируса парвовирусного энтерита собак с применением полимеразной цепной реакции» и рекомендуются для использования практическими ветеринарными врачами, специалистами ветеринарных лабораторий, в учебном процессе факультета ветеринарной медицины и биотехнологии.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Камарли, А.А. Парвовирусный энтерит плотоядных (статья) / А.А. Камарли // Журнал Вестник сельскохозяйственной науки. Б., 2014. – № 9. – С. 159-162. ISSN: 1694-5975.

2. Камарли, А.А. Изучение некоторых случаев парвовирусного энтерита собак (статья) / А.А. Камарли, Э.К. Акматова, // Вестник КНАУ им. К.И. Скрябина. Б., 2015.– № 1 (33). – С. 50-54. ISSN: 1694-6286. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_25106289_96681802.pdf.

3. Камарли, А.А. Разработка и апробация методики выявления парвовирусного энтерита собак методом полимеразной цепной реакции (статья) / Э.К. Акматова, А.А. Камарли, Г.Ж. Акматбекова, С.А. Джээнбаева // Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева. Б., 2016. – № 3. – С. 38-40. ISSN: 1694-6405. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL: <http://library.kgma.kg/jirbis2/images/vestnik-kgma/vestnik-2016/vestnik-3-2016.pdf>.

4. Камарли, А.А. Диагностика вирусных заболеваний собак (статья) / А.А. Камарли, Э.К. Акматова, Р.Т. Абдылдаева, Ж.А. Атамбекова // «Сохранение и развитие собак породы казахские тазы и тобет». Междун. науч.-практ. конф. 27-28 апреля. Алматы, 2016. – С. 273-279. ISSN: 978-601-80265-9-1.

5. Камарли, А.А. Диагностика чумы и парвовирусного энтерита собак методом ПЦР (статья) / Р.З. Нургазиев, М.К. Исакеев, А.А. Камарли, Э.К. Акматова, Е.Д. Крутская // Журнал Ветеринария. Москва, 2016. – № 8. – С. 33-35. ISSN: 0042-4846. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL: <http://journalveterinariya.ru/soderzhaniye-no8-2016-g>.

6. Камарли, А.А. Эпидемиологический мониторинг инфекционных болезней плотоядных животных [Текст] / А.А. Камарли, Э.К. Акматова, И.У. Сааданов // Вестник Алтайского ГАУ. Россия, 2016. – № 8 (142). – С. 125-129. ISSN: 1996-4277. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL: <http://www.asau.ru/vestnik/2016/8/125-129.pdf>.

7. Камарли, А.А. Усовершенствование молекулярно-биологических методов диагностики парвовирусного энтерита собак (статья) / А.А. Камарли, Э.К. Акматова // Электронный журнал НАК КР. Б., 2020. – № 3. – Часть I. – С. 105-110. ISSN: 1694-7878. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL: <http://journal.vak.kg/category/god-2020/3-kvartal-god-2020/>.

8. Камарли, А.А. Эпизоотологический мониторинг по инфекционным болезням среди плотоядных животных и их диагностика (статья) / А.А. Камарли, Г.Ж. Акматбекова, С.А. Джээнбаева // Вестник Ошского ГУ. г. Ош, 2021. – Т. 2, № 2. – С. 61-67. ISSN: 1694-7452.

9. Kamarli, A.A. Molecular typing of canine parvovirus occurring in Kyrgyzstan by PCR (article) / A.A. Kamarli, R.Z. Nurgaziev // Vestnik KNAU n.a. K.I. Skryabin. B., 2021. – № 5 (59). – P. 82-87. ISSN: 1694-6286. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL: <https://vestnik.knau.kg/index.php/2021/5-59>.

**Камарли Айтакин Алий-Сааб кызынын 06.02.02 – инфекциялык
жана инвазиялык ылаңдары, вирусология, микробиология жана
иммунология адистиги боюнча ветеринария илимдеринин кандидаты
илимий даражасын алуу үчүн “Иттердин парвовирустук энтеритинин
эпидемиологиясы, анын диагностикасы” деген темадагы
диссертациялык ишинин
РЕЗЮМЕСИ**

Түйүндүү сөздөр: эпидемиология, мониторинг, иттердин парвовирус энтерити, полимераздык чынжыр реакциясы, реалдуу убакытта полимераздык чынжыр реакциясы, праймерлер.

Изилдөөнүн объекти: сезгич жаныбарлар (иттер), биологиялык материал (жуу, ичке жана жоон ичеги).

Изилдөөнүн предмети: клиникалык көрүнүшү, органдардагы макроскопиялык өзгөрүүлөр, ит парвовирус энтерит вирусун аныктоо.

Изилдөөнүн максаты: иттер арасында парвовирустук энтериттин эпидемиологиялык мониторингин жүргүзүү, клиникалык белгилерин изилдөөнүн негизинде диагноз коюу, ички органдардын жана ткандардын макроскопиясы, молекулярдык биологиялык ыкмаларды колдонуу менен иттердин парвовирустук энтеритинин антигендик түрлөрүн (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c) аныктоо (полимераздык чынжыр реакциясы жана реалдуу

убакыттагы полимераздык чынжыр реакциясы) CPV-VP2 жалпы праймерин иштеп чыгуу менен.

Изилдөөнүн ыкмалары: клиникалык, макроскопиялык жана молекулярдык биологиялык.

Алынган натыйжалар жана алардын илимий жаңылыгы: Бишкек шаарында биринчи жолу үй иттеринин арасында парвовирустук энтериттин жайылышына эпидемиологиялык мониторинг жана молекулярдык биологиялык ыкма менен лабораториялык диагностика жүргүзүлдү. Парвовирустук энтерит менен ооруган иттердин клиникалык белгилерин жана ички органдарындагы макроскопиялык өзгөрүүлөрдү комплекстүү изилдөө жүргүзүлдү. Иттердин парвовирус энтеритинин вирусун аныктоо үчүн жалпы праймер иштелип чыккан жана оптимизацияланган. Диагностикалык реакцияларды стадиялоо методологиясы оптималдаштырылган жана Бишкек шаарында парвовирустук энтерит вирусунун иттер арасында (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c) антигендик түрлөрүнүн ар түрдүүлүгү аныкталган.

Колдонуу боюнча сунуштар: иттердин парвовирустук энтериттерин өз убагында диагностикалоо үчүн ветеринардык лабораторияларга заманбап изилдөө ыкмаларын киргизүү.

Колдонуу тармагы: вирусология, биотехнология, ветеринария.

РЕЗЮМЕ

диссертационной работы Камарли Айтакин Алий-Сааб кызы на тему «Эпидемиология парвовирусного энтерита собак, его диагностика» на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 06.02.02 – инфекционные и инвазионные болезни, вирусология, микробиология и иммунология животных по ветеринарным наукам

Ключевые слова: эпидемиология, мониторинг, парвовирусный энтерит собак, полимеразная цепная реакция, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, праймеры.

Объект исследования: восприимчивые животные (собаки), биологический материал (смывы, тонкий и толстый отдел кишечника).

Предмет исследования: клиническая картина, макроскопические изменения органов, выявление вируса парвовирусного энтерита собак.

Цель работы: Проведение эпидемиологического мониторинга по парвовирусному энтериту среди собак, диагностика на основе изучения клинических признаков, макроскопии внутренних органов и тканей, выявление антигенных типов парвовирусного энтерита собак (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c) с применением молекулярно-биологических методов

(полимеразной цепной реакции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени) с разработкой общего праймера CPV-VP2.

Методы исследования: клинические, макроскопические и молекулярно-биологические.

Полученные результаты и их новизна: Впервые среди домашних собак г. Бишкек проведен эпидемиологический мониторинг распространения парвовирусного энтерита и его лабораторная диагностика молекулярно-биологическим методом. Проведено комплексное изучение клинических особенностей и макроскопических изменений внутренних органов у собак, больных парвовирусным энтеритом. Разработан и оптимизирован общий праймер для выявления вируса парвовирусного энтерита собак. Оптимизирована методика постановки диагностических реакций и выявлены разнообразия антигенных типов вируса парвовирусного энтерита среди собак (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c) в г. Бишкек.

Рекомендации по использованию: внедрить в ветеринарные лаборатории современные методы исследования для проведения своевременной диагностики парвовирусного энтерита собак.

Область применения: вирусология, биотехнология, ветеринарная медицина.

SUMMARY

dissertation work of Kamarli Aitakin Alii-Saab kyzy on the topic “Epidemiology of canine parvovirus enteritis, its diagnosis” for the academic degree of candidate of veterinary sciences in specialty 06.02.02 - infectious and invasive diseases, virology, microbiology and immunology of animals in veterinary sciences

Keywords: epidemiology, monitoring, canine parvovirus enteritis, polymerase chain reaction, real-time polymerase chain reaction, primers.

Object of research: susceptible animals (dogs), biological material (swabs, small and large intestine).

Subject of research: clinical picture, macroscopic changes in organs, detection of canine parvovirus enteritis virus.


The aim of the work: Conducting epidemiological monitoring of parvovirus enteritis among dogs, diagnosis based on the study of clinical signs, macroscopy of internal organs and tissues, identification of antigenic types of canine parvovirus enteritis (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c) using molecular biological methods (polymerase chain reaction and real-time polymerase chain reaction) with the development of the common primer CPV-VP2.

Research method: clinical, macroscopic and molecular biological.

The obtained results and their novelty: For the first time, epidemiological monitoring of the spread of parvovirus enteritis and its laboratory diagnosis using the molecular biological method were carried out among domestic dogs in Bishkek. A comprehensive study of clinical features and macroscopic changes in internal organs in dogs with parvovirus enteritis was carried out. A general primer has been developed and optimized for the detection of canine parvovirus enteritis virus. The methodology for staging diagnostic reactions has been optimized and the diversity of antigenic types of parvovirus enteritis virus among dogs (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c) in Bishkek has been identified.

Recommendations for use: introduce modern research methods into veterinary laboratories for timely diagnosis of canine parvovirus enteritis.

Field of application: virology, biotechnology, veterinary medicine.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'A. Lopez', is centered on a white rectangular background.