Для цитирования: Юров, К.П. Коитальная экзантема лошадей: диагностика и идентификация возбудителя / К.П. Юров, С.В. Алексеенкова // Российский ветеринарный журнал. — 2018. — № 6. — С. 5–8. DOI:10.32416/article_5c050ab891e319.94298054
 For citation: Yurov K.P., Alexeyenkova S.V., Coital exanthema of horses: diagnosis and identification of the pathogen, Rossijskij veterinarnyj zhurnal (Russian veterinary journal), 2018, No.6, pp. 5–8. DOI:10.32416/article_5c050ab891e319.94298054

УДК 619: 616.98: 578

Коитальная экзантема лошадей: диагностика и идентификация возбудителя

К.П. Юров, доктор ветеринарных наук, профессор, зав. лабораторией вирусологии (konstyurov@yandex.ru),
С.В. Алексеенкова, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусологии (116176@mail.ru).

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко» Российской академии наук (109428, Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1).

Выполнены комплексные исследования в период острой вспышки заболевания лошадей с симптомами экзантематозного поражения наружных половых органов, зарегистрированной в 2018 г. Поражение наружных половых органов проявлялось в виде отечности преддверия влагалища и вульвы у кобылок и препуция у жеребцов, образования на слизистой оболочке и коже папул, везикул и пустул, в последней стадии — изъязвления и формирования корок на пораженных участках. В соскобах с пораженных участков методами молекулярно-генетического анализа обнаружили фрагмент генома герпесвируса лошадей типа 3 — возбудителя коитальной экзантемы. Результаты определения нуклеотидных последовательностей показали высокую степень филогенетического родства со штаммом «YS-1», выделенным от больных лошадей в Японии в 2017 г. Гомология выравнивания нуклеотидных последовательностей в пределах исследуемого участка генома — фрагмента гена gpG (813...1292 п.о.) — составила 100 %. В 90 % проб, содержащих ДНК вируса коитальной экзантемы, также была найдена ДНК вируса ринопневмонии-вирусного аборта (ГВЛ-1) и только в 10 % случаев наблюдали моноинфекцию ГВЛ-3. Участие в инфекционном процессе ГВЛ-1 было подтверждено ретроспективным серологическим исследованием. В РН антитела к ГВЛ-1 выявляли в титре 1:16...1:32. Сравнительный анализ ретроспективных данных показал, что подобная вспышка коитальной экзантемы, наблюдавшаяся в 1980–81 гг., была обусловлена моноинфекцией ГВЛ-3.

Ключевые слова: коитальная экзантема, ринопневмония, герпесвирус, лошади, полиморфная цепная реакция.

Сокращения: ГВЛ-1 — герпесвирус лошадей типа 1, ГВЛ-3 — герпесвирус лошадей типа 3, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ОРС — открытая рамка считывания, п.о. — пара оснований, ПЦР — полимеразная цепная реакция, РН — реакция нейтрализации, ТЦД — тканевая цитопатогенная доза, gpG — glycoprotein G (гликопротеин G), INSDC — International Nucleotide Sequence Data Collaboration (Международная база данных нуклеотидных последовательностей).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования России по государственному заданию № 0578-2014-0023. Авторы не имеют конфликта интересов.

Введение

Герпесвирусы животных и человека ассоциируются с различной патологией — от неврологического синдрома и эмбриональной смертности до бессимптомной латентной инфекции или локальных поражений кожи и слизистых в виде пустул. Последние названные патологии обуславливает ГВЛ-3 — представитель рода Varicellovirus, семейства Herpesviridae, порядка Herpesvirales — возбудитель коитальной экзантемы лошадей. Вирус вызывает поражения на коже и слизистой оболочке по-

ловых органов кобыл и жеребцов в виде папул, пустул, везикул, язв. При обнюхивании пораженных участков у жеребцов могут наблюдаться пустулезные поражения слизистой оболочки носоглотки и трахеи. У жеребцов с обширными повреждениями отмечают угнетение и потерю охоты [2].

Несмотря на локальный характер поражений, заболевание наносит экономический ущерб в период случной компании, поскольку больные жеребцы и кобылы отказываются от случки. Источником возбудителя инфекции служат лошади — скрытые вирусоносители. Возбудитель передается главным образом при случке, а также ятрогенным путем — через инфицированные резиновые перчатки, ультразвуковой зонд, предметы ухода и др. [4].

ГВЛ-3 инфекция обнаружена в разные годы во многих странах мира: США, Канаде, Великобритании, Норвегии, Дании, Японии, Турции, Бразилии, Австралии. Вирус впервые был изолирован в 1968 г. одновременно в США, Канаде и Австралии. В СССР вспышку коитальной экзантемы на одном из конных заводов Центрального региона России наблюдал К.П. Юров (отчет ВИЭВ, 1981 г.).

Заболевание причиняет значительный экономический ущерб племенному коневодству. Прямые финансовые потери связаны со снижением числа жеребых кобыл и, следовательно, числа полученных жеребят, затратами на лечение и ограничительные мероприятия [5].

Диагноз устанавливают на основании результатов клинико-эпизоотологических данных и лабораторного исследования — изоляции вируса в культуре клеток, РН, обнаружения вирусной ДНК с помощью ПЦР «классической» или в реальном времени. В последние годы для диагностики коитальной экзантемы используют технологию изолированной изотермической ПЦР (iiPCR), в основе которой лежит принцип конвекции Рэлея–Бенара [8].

Цель исследования

Цель работы — диагностика заболевания лошадей с симптомами экзантематозного поражения наружных половых органов; идентификация и молекулярно-генетическая характеристика возбудителя — ГВЛ-3.

Материалы и методы

Исследование проводили по теме НИР 0578-2014-0023. Финансовая поддержка работы обеспечена Министерством науки и высшего образования России. Работу выполняли в лаборатории вирусологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и в одном из племенных хозяйств Южного федерального округа РФ, неблагополучном по репродуктивным болезням лошадей.

Объектом исследования являлись чистокровные лошади во время вспышки заболевания, характеризовавшегося экзантематозным поражением наружных половых органов. Материалом для исследования служили кровь от больных и переболевших животных, соскобы с пораженных участков кожи и слизистой оболочки половых органов.

ДНК выделяли на спин-колонках с компонентами коммерческого набора «К-Сорб» (ЗАО «Синтол») по протоколу фирмы-изготовителя. Концентрацию и чистоту выделенной ДНК определяли на спектрофотометре. Для исследования отбирали ДНК с чистотой 1,8...1,9 по соотношению A260/A280 в концентрации 500 нг.

Реакцию амплификации для выявления вирусного генома с помощью олигонуклеотидов-праймеров, комплементарных фрагменту гена gpG герпесвируса лошадей типа 3, проводили по методу, предложенному K. Dynon et al. 2001 [3].

Дифференциальную диагностику для обнаружения ГВЛ типов 1, 2, 4, 5 проводили по методикам, описанным ранее [1, 3, 7]. Олигонуклеотиды-праймеры были синтезированы ЗАО «Синтол». Фрагменты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5%-м агарозном геле, содержащем бромид этидия в концентрации 0,5 мкг/мл. Результаты учитывали на среднечастотном трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с длиной волны 312 нм. Нуклеотидные последовательности определял на генетическом анализаторе сотрудник ЗАО «Синтол» О.П. Малюченко.

Множественное выравнивание выполнено с помощью компьютерной программы ClustalΩ (Европейский институт биоинформатики). Для сравнения использовали нуклеотидные последовательности фрагмента гена gpG референтных штаммов и изолятов ГВЛ-3 из базы данных INSDC (GenBank).

Количественное определение вируснейтрализующих антител к ГВЛ-1 выполняли в РН в 96-луночных культуральных планшетах против 100...300 ТЦД_{50/мл} вируса.

Результаты и обсуждение

Во время вспышки заболевания конематок наблюдали поражение половых органов в виде отечности преддверия влагалища и вульвы, затем образование пузырьков и пустул; в последней стадии у части кобыл отмечали изъязвление и корки на пораженных участках. Высыпания обычно имели очаговый характер. Вследствие слияния отдельных эрозий образовывались экссудативные язвенные поражения кожи. В единичных случаях отмечали паховый лимфаденит.

Исследовали пробы сыворотки крови больных и переболевших лошадей и соскобы с пораженных участков слизистой и кожи наружных половых органов. В соскобах с пораженных участков методами молекулярно-генетического анализа обнаружили фрагмент генома ГВЛ-3 — возбудителя коитальной экзантемы.

Результаты определения нуклеотидных последовательностей показали высокую степень филогенетического родства со штаммом «YS-1», выделенным от больных лошадей в Японии в 2017 г. Гомология выравнивания нуклеотидных последовательностей в пределах изучаемого участка генома — фрагмента гена gpG (813...1292 п.о.) — составляла 100 %. Исследуемый участок генома является высококонсервативным. Однако некоторые изоляты и штаммы содержат нуклеотидные замены, например японский штамм «SS-1» имеет 3 замены: C(A) — на позиции 905 п.о., A(C) — 1103 п.о., G(T) — 1264 п.о. В отличие от C(A) и G(T), замена A(C) является нейтральной (сайлент-мутация), но имеется только у некоторых новых вариантов вируса, обнаруженных в 2017–2018 гг., в том числе у российского изолята «VG-1» (рис.).

Геном ГВЛ-3 был полностью расшифрован в 2014 г. группой ученых из Аргентины и Бельгии. Инвентарный номер в базе данных GenBank — KM051845. Геном вируса относится к классу D и состоит из длинного и короткого уникальных участков (UL и US), фланкированных инвертированными повторами TRL/IRL и IRS/TRS. Общий размер генома — 151601 п.о. ОРС расположены так же, как и у других альфагерпесвирусов лошадей, кроме ОРС 76, которая находится внутри повтора IRS/TRS и дублируется. Геном ГВЛ-3 содержит 76 различных генов, 4 из которых дублируются (ОРС 64, 65, 66 и 76), то есть всего 80 генов. ГВЛ-3 существенно отличается от ГВЛ других типов (сходство в пределах гомологичных генов 62,1...64,9%), тогда как ГВЛ-1, ГВЛ-4, ГВЛ-8 и ГВЛ-9 идентичны между собой не менее чем на 78,2% [6].

Известно, что герпесвирусы часто подвержены генетической рекомбинации. Возможно, что коинфекция герпесвирусов разных типов приводит к появлению новых вирулентных вариантов, вследствие этого затрудняется выяснение этиологии заболевания. Для уточнения этиологии заболевания с симптомами коитальной экзантемы смывы от больных лошадей дополнительно исследовали в ПЦР, чтобы исключить ГВЛ других типов — 1, 2, 4, 5. В 90 % проб, содержащих ДНК вируса коитальной экзантемы, также была найдена ДНК вируса ринопневмонии-вирусного аборта (ГВЛ-1) и только в 10 % случаев наблюдали моноинфекцию ГВЛ-3. Участие в инфекционном процессе ГВЛ-1 было подтверждено ретроспективным серологическим исследованием. В РН антитела выявляли в титре 1:16...1:32.

VG-1	-----	872
SS-1	-----	872
Australia	-----	872
TR-EHV3-2015	-----	872
Brazil	-----	872
Iwate-1	-----	872
YS-1	ggggccctcaatccctgctcattggcgccctgggacttcgcacatcctgagccagcgctggta *****	872
VG-1	-----	932
SS-1	-----c-----	932
Australia	-----c-----	932
TR-EHV3-2015	-----	932
Brazil	-----	932
Iwate-1	-----	932
YS-1	catgctgccggggcgaaacgtacgaccagctgaggcaaaattccagagggtctgccgcgg *****	932
VG-1	-----	992
SS-1	-----	992
Australia	-----	992
TR-EHV3-2015	-----	993
Brazil	-----	992
Iwate-1	-----	992
YS-1	cgcagacaggggaatccgcggccgacgtaacagaacccgaagaaagccttcggaaaaaac *****	992
VG-1	-----	1052
SS-1	-----	1052
Australia	-----	1052
TR-EHV3-2015	-----	1052
Brazil	-----	1052
Iwate-1	-----	1052
YS-1	ccccgcttctcccaccgatgacgaggagaaagaagaagaggaaaacggggataacgagcc *****	1052
VG-1	-----	1112
SS-1	-----a-----	1112
Australia	-----a-----	1112
TR-EHV3-2015	-----a-----	1112
Brazil	-----a-----	1112
Iwate-1	-----	1112
YS-1	aaccccgagcgccaccggcccggtgacgacgagcaagacgcacctgccgcgggagacgg *****	1112
VG-1	-----	1172
SS-1	-----	1172
Australia	-----	1172
TR-EHV3-2015	-----	1172
Brazil	-----	1172
Iwate-1	-----	1172
YS-1	atctccgtggtacacggcgccattctcgtgtccggctcctgagtgccgacagcagaagg *****	1172
VG-1	-----	1232
SS-1	-----	1232
Australia	-----	1232
TR-EHV3-2015	-----	1232
Brazil	-----	1232
Iwate-1	-----	1232
YS-1	gaccaactacgcggtatcggtttctcatcttgggagtggtctcctcatcgccctcat *****	1232
VG-1	-----	1292
SS-1	-----g-----	1292
Australia	-----	1292
TR-EHV3-2015	-----	1292
Brazil	-----	1292
Iwate-1	-----	1292
YS-1	tgtctacgtttgcgtcctgcggtccagagtcctccgagcgcaagctccacaacagctactc *****	1292

Рис. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена, кодирующего гликопротеин G (gpG) ГВЛ-3, российского изолята «VG-1» и штаммов из базы данных INSDC. Идентичность референтному штамму YS-1 указана пунктиром, замены — буквенным кодом для обозначения нуклеотидов

Fig. Comparative analysis of the nucleotide sequences of the gene fragment encoding the glycoprotein G (gpG) of equine herpesvirus type 3, the Russian isolate «VG-1» and strains from the INSDC database. The identity of the reference strain YS-1 is indicated by a dotted line, the replacement is indicated by the letter code for nucleotides

Вспышку коитальной экзантемы, обусловленную моноинфекцией ГВЛ-3, наблюдали в 1980–1981 гг. (К.П. Юров, неопубликованные данные). Энзоотия возникла вследствие введения в хозяйство нового жеребца. После случки у кобыл на слизистой влажной коже наружных половых органов наблюдали поражения в виде папул, которые затем формировали везикулы и пустулы. В то же время наблюдали заболевание новорожденных жеребят и один случай аборта.

Диагноз был поставлен путем изоляции возбудителя в первичной культуре почки эмбриона лошади. Цитопатические изменения в виде очагов округлившихся клеток, многоядерных клеток и симпластов в зараженной культуре клеток отмечали на вторые-третьи сутки. Инфекционный титр изолятов не превышал $1 \dots 3 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$. При электронной микроскопии методом негативного контрастирования препаратов из культуральной жидкости наблюдали частицы с характерной для герпесвируса морфологией (Г.А. Надточей). В РН сывороткой крови переболевших лошадей и вирусом ринопневмонии (ГВЛ-1) со всеми пробами получили отрицательные результаты.

Коитальная экзантема широко распространена в мире, однако этой проблеме не всегда уделяется должное внимание. Заболевание высококонтагиозное, но в то же время возбудитель является низкоинвазивным. Типичные клинические признаки можно обнаружить только у лошадей при первичном заражении, прежде всего у молодых. Повторная инфекция протекает, как правило, бессимптомно, но лошади остаются скрытыми вирусносителями, поэтому коитальная экзантема часто диагностируется как неинфекционное заболевание. Причиной этого, по-видимому, являются особенности патогенеза инфекции. ГВЛ-3 реплицируется в стратифицированных клетках эпидермиса кожи и эпителия слизистых оболочек, вызывая активную локальную воспалительную реакцию. При этом возбудитель ограничивается репликацией в клетках эпителия и не затрагивает базальную мембрану и собственную пластинку слизистой оболочки (*lamina propria*), а также мононуклеарные лейкоциты, что в корне отличает его от других альфагерпесвирусов: возбудителей болезни Ауески, ринотрахеита крупного рогатого скота, простого герпеса человека, ларинготрахеита кур [4]. Ключевым звеном служит механизм латенции↔реактивации вируса, свойственный герпесвирусным инфекциям. Реактивация вируса не всегда сопровождается манифестацией типичных изменений. Выделение вируса в окружающую среду происходит одновременно с циркуляцией гуморальных антител, титр которых значительно варьирует. Переболевшие лошади становятся скрытыми вирусносителями и представляют угрозу как источник возбудителя инфекции.

Заключение

В весенний период 2018 г. зарегистрирована острая вспышка половой экзантемы лошадей. В соскобах с пораженных участков слизистой оболочки и кожи наружных половых органов конематок и жеребцов методами молекулярно-генетического анализа выявлены фрагменты генома ГВЛ-3. Результаты определения нуклеотидных последовательностей участков генома показали высокую степень филогенетического родства

со штаммом «YS-1», выделенным от больных лошадей в Японии в 2017 г. Гомология выравнивания нуклеотидных последовательностей в пределах исследуемого участка генома — фрагмента гена gpG (813...1292 п.о.) — составляла 100 %. В 90 % проб, содержащих ДНК вируса коитальной экзантемы, также была найдена ДНК вируса ринопневмонии-вирусного аборта (ГВЛ-1) и только в 10 % случаев наблюдали моноинфекцию ГВЛ-3. Участие в инфекционном процессе ГВЛ-1 было подтверждено ретроспективным серологическим исследованием. В РН антитела к ГВЛ-1 выявляли в титре 1:16...1:32. Сравнительный анализ ретроспективных данных показал, что подобная вспышка коитальной экзантемы в 1980–81 гг. была обусловлена моноинфекцией ГВЛ-3.

Библиография

1. Алексеевкова, С.В. Диагностика вирусных болезней лошадей методом ПЦР / С.В. Алексеевкова, Г.К. Юров, К.П. Юров // Российский ветеринарный журнал. — 2011. — № 3. — С. 37–39.
2. Barrandeguy, M. Experimental infection with equid herpesvirus 3 in seronegative and seropositive mares / M. Barrandeguy, A. Vissani, C.G. Olguin, L. Becerra, M.S. Tordoya, S. Miño, E. Thiry // Veterinary Microbiology. — 2012. — Vol. 160. — pp. 319–326. doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.06.024.
3. Dynon, K. Identification of equine herpesvirus 3 (equine coital exanthema virus), equine gammaherpesviruses 2 and 5, equine adenoviruses 1 and 2, equine arteritis virus and equine rhinitis A virus by polymerase chain reaction / K. Dynon, A. Varrasso, N. Ficorilli, S. Holloway, G. Reubel, F. Li, C. Hartley, M. Studdert, H. Drummer // Australian Veterinary Journal. — 2001. — Vol. 79(10). — pp. 695–702.
4. Seki, Y. Replication characteristics of equine herpesvirus 1 and equine herpesvirus 3: comparative analysis using ex vivo tissue cultures / Y. Seki, Y.M. Seimiya, G. Yaegashi, S. Kumagai, H. Sentsui, H. Negussie, Y. Li, T. Sisay Tessema and H.J. Nauwynck // Veterinary Research. — 2016. — Vol. 47. — pp. 19. DOI 10.1186/s13567-016-0305-5.
5. Nishimori, T. Occurrence of Equine Coital Exanthema in Pastured Draft Horses and Isolation of Equine Herpesvirus 3 from Progenital Lesions / T. Nishimori, R. Ishihara // Journal of Veterinary Medical Science. — 2004. — Vol. 66 (12). — pp. 1503–1508.
6. Sijmons, S. Complete Genome Sequence of Equid Herpesvirus 3 / S. Sijmons, A. Vissani, M.S. Tordoya, B. Muykens, E. Thiry, P. Maes, J. Matthijssens, M. Barrandeguy, M. Van Ransta // Genome Announcements. — 2014. — Vol. 2(5). — pp. e00797-14. doi:10.1128/genome.A.00797-14.
7. Varrasso, A. Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction / A. Varrasso, K. Dynon, N. Ficorilli, C.A. Hartley, M.J. Studdert, H.E. Drummer // Australian Veterinary Journal. — 2001. — Vol. 79(8). — pp. 563–569.
8. Vissani, M.A. On-site detection of equid alphaherpesvirus 3 in perineal and genital swabs of mares and stallions / M.A. Vissani, M.S. Tordoya, Y.L. Tsai, P.Y.A. Lee, Y.H. Shen, F.C. Lee, H.T.T. Wang, V. Parreño, M. Barrandeguy // Journal of Virological Methods. — 2018. — Vol. 257. — pp. 29–32. doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.04.002.

References см. на сайте издательства logospres.ru

ABSTRACT

K.P. Yurov, D.Sc, Ph.D in Veterinary, professor, Head of Laboratory of Virology, **S.V. Alexeyenkova** Ph.D in Biology, leading researcher of Laboratory of Virology.

Federal Research Center — All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Skryabin and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences (24-1, Ryazanskij prospect str., Moscow, 109428).

Coital exanthema of horses: diagnosis and identification of the pathogen. Comprehensive studies were performed during an acute outbreak of horses with symptoms of exanthematous lesions of the external genitalia, observed in 2018. The lesion of the external genital organs was observed in the form of puffiness of the vestibule of the vagina and vulva in mares and prepulse in stallions, formation on the mucous membrane and skin of papules, vesicles and pustules, in the last stage — ulceration and crusts on the affected areas. A fragment of the genome of equine herpesvirus type 3, the causative agent of coital exanthema, was found in scrapings from the affected areas using the methods of molecular genetic analysis. The results of the determination of nucleotide sequences showed a high degree of phylogenetic relationship with the strain «YS-1» isolated from sick horses in Japan in 2017. The homology of alignment of nucleotide sequences within the studied region of the genome — a fragment of the gpG gene (813...1292 bp) — was 100 %. In 90 % of the samples containing the DNA of the coital exanthema virus, DNA of the virus of rhinopneumonia-viral abortion (equine herpesvirus type 1) was also found, and only in 10 % of cases mono-infection of EHV-3 was observed. Participation in the EHV-1 infectious process was confirmed by a retrospective serological study. In NT, antibodies to EHV-1 were detected in a titer of 1: 16...1: 32. A comparative analysis of retrospective data showed that a similar outbreak of coital exanthema observed in 1980–81 was due to EHV-3 mono-infection.

Keywords: coital exanthema, rhinopneumonitis, herpesvirus, horses, polymerase chain reaction (PCR).

DOI:10.32416/article_5c050ab891e319.94298054