

## ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ЦИРКОВИРУСУ СВИНЕЙ – 2 У СВИНОМАТОК МЕТОДОМ ИММУНОПЕРОКСИДАЗНОГО МОНОСЛОЙНОГО АНАЛИЗА

Корнийчук В.В., Гусев А.А., Савельева Т.А.

РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского НАН Беларуси»

*В данном исследовании определено наличие антител против цирковируса свиней-2 в популяции супоросных ремонтных и основных свиноматок на промышленных комплексах Республики Беларусь. Впервые определение титров антител к возбудителю в образцах патматериала, отобранных в хозяйствах Республики, проводилось методом иммунопероксидазного монослойного анализа – высоко чувствительного, удобного в постановке и интерпретации результатов и относительно дешевого средства серодиагностики.*

*In this investigation the presence of the antibodies against circovirus 2 was studied in population of the pregnant sows and gilts under conditions of the industrial farms of Belarus. Firstly the immunoperoxidase monolayer assay was used for studied samples from Belarus herds.*

**Введение.** Цирковирус тип - 2 (ЦВС-2) - это широко распространенный вирус среди домашнего и дикого свиноголовья [14]. ЦВС-2 с середины 90-х годов ассоциируется с синдромом мультисистемного истощения отъемышей (СМИО). В настоящее время СМИО рассматривается как наиболее экономически значимое в свиноводстве заболевание, ежегодные, прямые и косвенные экономические потери в Европейском Союзе составляют порядка 600 млн. Евро [1]. Помимо этого ЦВС-2 связывают с рядом нарушений, таких как репродуктивные нарушения, дерматит и синдром нефропатии свиней (ДСНП), респираторный симптомокомплекс свиней (РСКС) и пролиферирующая некротизирующая пневмония [14]. Junghyun Kim и др., описали атипичное проявление ЦВС-2 ассоциированного энтерита у поросят отъемного возраста, протекающего без признаков, характерных для СМИО [7]. В иностранной литературе для обозначения всех патологических состояний, связанных с ЦВС-2, используется термин «porcine circovirus diseases (PCVDs)». Предполагается, что для проявления клинических признаков заболеваний, вызываемых ЦВС-2, необходимо наличие множества кофакторов, в том числе других инфекционных агентов [5, 11]. При экспериментальном заражении поросят ЦВС-2 и пестивирусом у некоторых животных наблюдалось проявление признаков поражения нервной системы, в то время как у большинства мультисистемные микроскопические поражения, типичные для PCVDs [8]. Во время исследования в полевых условиях наблюдалась совместная инфекция репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) и ЦВС-2 у поросят весом 10-40 кг, тогда как у поросят весом менее 10 кг основным патогенным фактором оказался в данном случае вирус РРСС [3], что указывает на первичную роль вируса РРСС в создании условий для репликации ЦВС-2.

В лабораторной диагностике PCVDs используются методы: иммуногистохимии для обнаружения антигена, *in situ* гибридизация для обнаружения нуклеотидной кислоты [4]. Количественная ПЦР является мощным молекулярно-биологическим средством для определения вирусной массы в исследуемых образцах [10].

Для серологических исследований используются иммунопероксидазный монослойный анализ (IPMA) и иммуноферментный анализ (ELISA) [2,9,13, 16].

Разработаны и другие методики для определения наличия ЦВС-2, такие как вирусоизоляция и непрямая иммунофлюоресценция, реакция нейтрализации [1,12]. Однако приведенные методы не нашли широкого применения в рутинной диагностике, а, в основном, применяются для проведения научно-исследовательских работ.

Целью данной работы явилось определение наличия антител к цирковирусу свиней тип 2 у супоросных ремонтных и основных свиноматок на промышленных комплексах по производству свинины Республики Беларусь методом иммунопероксидазного монослойного анализа.

**Материалы и методы.** Пробы крови брали от супоросных ремонтных и основных свиноматок, из 15 промышленных комплексов по производству свинины, расположенных в Могилевской, Гомельской и Гродненской областях республики (рисунок 1). В хозяйствах наблюдались проблемы, связанные с репродуктивными нарушениями свиноматок и респираторными заболеваниями поросят. Сыворотку крови получали общепринятым методом. Исследовали индивидуальные и объединенные пробы (по 6-8 сывороток в пуле от животных из одного хозяйства).

Для изготовления диагностикумов использовали перевиваемую культуру клеток почки поросенка РК-15. После засева 96-ти луночные панели инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов, до образования монослоя. Затем монослой заражали суспензией, содержащей оптимальный титр ЦВС-2 (штамм Stoon-1010), и панели инкубировали 24 ч. при 37°C. После инкубации панели промывали, высушивали и замораживали при -20°C до использования. После размораживания панелей проводили фиксацию монослоя 4%-м параформальдегидом и метанолом. В лунки добавляли разведения исследуемой сыворотки и панели инкубировали в течение 1 ч при 37°C. В качестве конъюгата использовали поликлональные антитела кролика против свиного IgG свиней, меченные пероксидазой хрена. Для проявления пероксидазы хрена применяли раствор 3-амино-9-этилкарбазола. В качестве положительного контроля использовали сыворотку крови от гипериммунизированных животных. В качестве отрицательного контроля использовали отрицательную сыворотку крови свиней.

Учет результатов проводили при помощи светового микроскопа (объектив x20). Если в клеточном

монослойное наблюдалось специфическое окрашивание, то разведение считалось положительным. Титр менее  $1,7 \log_4$  рассматривался как отрицательный (рисунок 2).

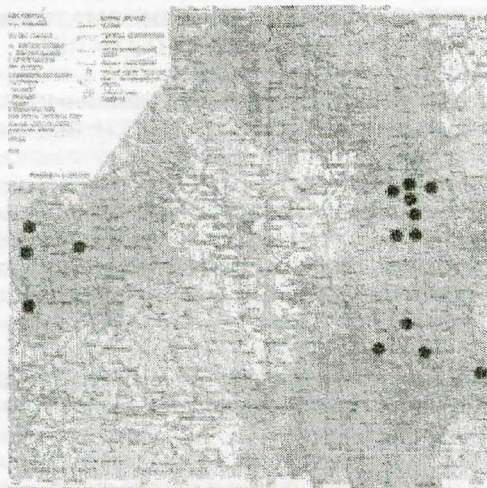


Рисунок 1 – Черными точками обозначены хозяйства, в которых отбирались образцы.



Рисунок 2 – Культура клеток РК-15. Стрелками обозначено специфическое окрашивание антител против ЦВС-2.

**Результаты.** При исследовании на наличие антител к ЦВС-2 образцов сыворотки крови от супоросных ремонтных и основных свиноматок вывелена практически 100%-я серопревалентность, за исключением хозяйства А Могилевской области – одна отрицательная проба (объединенная), и хозяйств М и О Гродненской области – одна и три отрицательных сыворотки соответственно (таблица 1). Титры антител во всех положительных образцах составили  $4,7 \log_4$  (в данном исследовании максимальное разведение сыворотки составляло  $1/640$ , что соответствует титру  $4,7 \log_4$ ).

**Заключение.** В данном исследовании нами впервые применен метод иммунопероксидазного монослойного анализа с целью определения антител к ЦВС-2 у супоросных ремонтных и основных свиноматок на промышленных комплексах по производству свинины в Республике.

Наши результаты подтверждают широкую циркуляцию антител к ЦВС-2 в популяции свиней Республики Беларусь. Одновременное наличие как серопозитивных, так и серонегативных животных в хозяйствах А, М и О, по нашему мнению, может указывать на присутствие ранее не встречавшихся с ЦВС-2 восприимчивых животных. Результаты исследований и проявление характерных клинических признаков в ряде свиноводческих хозяйств дают основание предположить наличие патогенных состояний вызванных ЦВС-2. В ходе исследований в одном из хозяйств нами был реизолирован ЦВС-2 из сывороток крови холостых свиноматок. У этих животных наблюдали поражения кожного покрова характерного для дерматита и синдрома нефропатии свиней. Необходимые гистологические исследования и вирусоизоляция из органов больных свиней проводятся.

Само по себе присутствие антител к ЦВС-2 не является диагностическим признаком. Окончательный диагноз на заболевания, вызванные ЦВС-2, считается установленным при наличии ряда признаков. В частности, диагноз на СМАО [14] считается установленным в том случае, если:

Наблюдается хроническое заболевание поросят с характерными клиническими признаками (истощение, желтуха, респираторные нарушения, увеличение паховых лимфоузлов).

Наличие характерной гистопатологической картины (от многоочаговой лимфогистиоцитной до рассеянной гранулематозной интерстициальной пневмонии, лимфоденопатия).

Обнаружение вируса в образцах патматериала (при вирусовыделении из патматериала, титр не менее  $10^{4,5}$  ЦПД<sub>50</sub>/1гр ткани).

Segales [14] определил критерии при проведении диагностики СМИО на стадном уровне:

Клиническое проявление на стадном уровне. Возникновение СМИО характеризуется значительным увеличением уровня послеуъемной смертности и признаков истощения по сравнению с ранее наблюдавшимся. В случае отсутствия информации относительно ранее наблюдавшегося уровня данной патологии, таковой считается диагностически значимым при превышении национального или регионального на 50%.

Патологический и гистопатологический диагноз. Вскрытие должно производиться не менее чем на пяти животных. Стадо считается неблагополучным по СМИО, если все три вышеперечисленных диагностических признака присутствуют одновременно, по крайней мере, у одного животного.

Однако сывороточные антитела играют важную роль в патогенезе заболевания путем влияния на количество вируса и могут использоваться для прогнозирования последствий ЦВС-2 инфекций. Установлено, что титры в сыворотке крови отъемных поросят с проявлением клинических признаков СМИО выше, чем у таковых без клинических признаков [6]. В связи с этим серологические тесты для определения антител к циркувирусу свиней 2 могут использоваться как вспомогательные при постановке диагноза на синдром мультисистемного истощения отъемшей и незаменимы при проведении фундаментальных исследований.

Результаты наших исследований еще раз подтвердили, что иммунопероксидазный монослойный анализ является чувствительным методом серодиагностики для определения антител против циркувируса свиней 2. В дальнейшем метод может найти широкое применение, при наличии штаммов вирусов соответствующей чувствительной культуры клеток и специфических антител возможна адаптация метода IPMA для определения многих вирусных возбудителей или специфических антител. Использование данного диагностического средства может позволить отечественным исследователям стать независимыми от зарубежных производителей при проведении фундаментальных и прикладных научных изысканий в данном направлении и оказании помощи хозяйствам.

**Выводы.** В Республике Беларусь на промышленных комплексах по производству свинины наблюдается широкая серопревалентность антител к ЦВС-2 в популяции супоросных свиноматок.

Иммунопероксидазный монослойный анализ является высоко чувствительным, удобным и относительно дешевым средством серодиагностики ЦВС-2. Впервые определение титров антител против ЦВС-2 в образцах отобранных в хозяйствах Республики проводилось при помощи иммунопероксидазного монослойного анализа.

В Республике Беларусь необходимо проведение фундаментальных и прикладных исследований по изучению циркувирусных инфекций свиней, которые на данный момент во всем мире рассматриваются как наиболее экономически значимые для свиноводства.

Таблица 1 - Результаты определения антител к ЦВС-2 на промышленных комплексах по производству свинины Республики Беларусь

Хозяйства	Поголовье (голов)	Количество проб	Количество положительных проб	% положительных проб	Титр log <sub>4</sub>	Клиническое проявление патологии
Могилевская область						
A	7000	10	9	90	4,7	р
B	400	10	10	100	4,7	р
C	1000	10	10	100	4,7	р
D	650	11	11	100	4,7	р, рп
E	4 500	8	8	100	4,7	р, рп
F	7 000	8	8	100	4,7	р
G	13 000	7	7	100	4,7	р, рп
Гомельская область						
H	12 000	6	6	100	4,7	р
I	24 000	10	10	100	4,7	р
J	13 000	13	13	100	4,7	р, рп
K	10 000	20	20	100	4,7	р
Гродненская область						
L	8 600	15	15	100	4,7	рп
M	10 500	22	21	95,5	4,7	р, рп
N	12 000	31	31	100	4,7	рп
O	50 000	33	30	91	4,7	р, рп

В данном исследовании максимальное разведение сыворотки составляло 1/640, что соответствует титру 4,7 log<sub>4</sub>. р – респираторные нарушения; рп – репродуктивные нарушения. Жирным шрифтом выделены объединенные пробы (по 6-8 сывороток в пуле).

Литература. 1. Allan, G.M., Ellis, J.A. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest.* 2000; 12: 3-14. 2. Blanchard, P., Mahé, D., Cariolet, R., et al. Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) specific antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) studies. *Proceedings, European Society Veterinary Virology, PMWS 2001*; 104. 3. Bottcher, J., Affy, M., and Alex, M., (2007). Impact of viral co-infections in pigs with Pneumonia. 5. *Int. Symp. on emerging and re-emerging pig diseases.* 24-27.6.2007, Krakow, Poland. 4. Clark E. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proc AASP Ann Meet.* 1997; 499-501. 5. Ellis, J., Clark, E., Haines, D., et al.: 2004, Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet Microbiol* 98:159-163. 6. Enøe, C., Bækbo, P., Vigre, H., Larsen, L.E., Jorsal, S.E., Nielsen E.O., (2007): Serological testing for porcine circovirus type 2 in Danish pig herds with and without PMWS. 5. *Int. Symp. on emerging and re-emerging pig diseases.* 24-27.6.2007, Krakow, Poland. 7. Junghyun Kim, Yooncheol Ha, Kwonil Jung, Changsun Choi, Chanhee Chae, Yooncheol Ha, Kwonil Jung, Changsun Choi, Chanhee Chae, 2004. *The Canadian Journal of Veterinary Research.* 68:218-221. 8. Langohr, I.M., Stevenson, G.W., Nelson, E.A., Wei, H., Pogranichnyi, R.M., (2007): Experimental reproduction of porcine circovirus-2 associated disease by co-infection of germ-free pigs with pestivirus and porcine circovirus-2. 5. *Int. Symp. on emerging and re-emerging pig diseases.* 24-27.6.2007, Krakow, Poland. 9. Nawagitgul, P., Harms, P.A., Morozov, I., et al., 2002. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2 based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9: 33-40. 10. Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., et al., 2003. Application of a newly developed real time pcr for the quantification of Porcine circovirus type 2 in different excretion routes. *Proc. 4th Int Symp Emerg Reemerg Dis, Rome.* 11. Opriessnig, T., Gallup, J.M., et al. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pathol* 2003; 40:521-529. 12. Pogranichnyi, R.M., Yoon, K.J., Harms, P.A., et al. Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol* 2000; 13: 143-153. 13. Rodríguez-Amoia, G.M., Segalés, J., Balasch, M., et al. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 (PCV-1) and type 2 (PCV-2) in pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Rec.* 2000; 146: 762-764. 14. Segales, J., Larsen, L., Wallgren, P., Rose, N., Grau-Roma, L., Sibila, M., Fralle, L., Casal, J., Bækbo, P., (2007): What do we know on epidemiology, control and prevention of porcine circovirus diseases? 5. *Int. Symp. on emerging and re-emerging pig diseases.* 24-27.6.2007, Krakow, Poland. 15. Sorden (2000). *J Swine Health Prod* 8: 133-136. 16. Walker, I.W., Konoby, C.A., Jewhurst, V.A., et al. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus. *J Vet Diagn Invest.* 2000; 12: 400-405.

УДК: 619:616.98:635.5

#### ИММУНОМОРФОГЕНЕЗ У ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА И БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА

Курдеко А.П., Прудников А.В., Прудников В.С.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины, Республика Беларусь

В статье приведены данные исследований по изучению влияния живой ассоциированной вирус-вакцины против ньюкаслской болезни и инфекционного бронхита на иммуноморфогенез у цыплят-бройлеров.

The article features the data on the affected of the live associated virus - vaccine against Newcastle disease and infectious bronchitis on immunomorphogenesis of chickens - broilers.

**Введение.** До настоящего времени для вакцинации птиц против инфекционного бронхита кур и болезни Ньюкасла в Республике Беларусь применяются, в основном, вакцины производства Голландии, Франции, Германии, Израиля, России и других стран, имеющие разную иммуногенность и реактогенность. Их использование, как правило, требует от птицеводческой отрасли огромных материальных затрат. Поэтому исследования, направленные на разработку отечественных ассоциированных вакцин, являются приоритетными. Для экономии валютных средств и сохранения эпизоотического благополучия птицефабрик сотрудниками РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси» была разработана живая ассоциированная вирус-вакцина против болезни Ньюкасла (штамм Ла-Сота) и инфекционного бронхита (штамм Н-120).

Целью наших исследований явилось изучение иммуноморфогенеза у цыплят, вакцинированных отечественной ассоциированной вакциной и ее израильским аналогом. В качестве зарубежного аналога была выбрана израильская сухая живая вакцина фирмы AVIC из штамма V.H. (б. Ньюкасла)+Н-120 (инфекционный бронхит).

**Материал и методы.** Исследования были проведены в клинике кафедры эпизоотологии УО ВГАВМ на 60 цыплятах-бройлерах 1-28-дневного возраста кросса Кобб-500. Птица была разделена на 3 группы, по 20 голов в каждой. Птицу 1-й группы первично вакцинировали в 1-дневном возрасте отечественной вакциной. Цыплят 2-ой группы первично иммунизировали вакциной производства Израиля. Интактные цыплята 3-й группы служили контролем.

На 14-й день после 1-й вакцинации проводили повторную иммунизацию цыплят 1-й и 2-й групп, выпаивая вакцины с водой.

На 7-й день после 1-й и 3-й, 7-й, 14-й после 2-й вакцинации от 5 цыплят каждой группы брали кровь для морфологических исследований и получения сыворотки. После получения, сыворотку направляли в НИ-ИПВМиБ УО ВГАВМ для проведения биохимических исследований. Количество эритроцитов и гемоглобина определяли на фотоэлектрокалориметре [3], тромбоциты и лейкоциты подсчитывали в счетной камере Горяева. Лейкограмму выводили на основании подсчета 100 клеток. Т- и В- лимфоциты дифференцировали с учетом размера клеток, величины их ядра, цитоплазмы и интенсивности окраски. В сыворотке крови опреде-