

УДК 636.09:616.98:578.821.83:636.4(477)

Артеменко И.В., аспирант*

Галка И.В., кандидат ветеринарных наук*

Ситюк Н.П., кандидат ветеринарных наук*

Нычик С.А., доктор ветеринарных наук*

Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор**

*Институт ветеринарной медицины НААН Украины, г. Киев

**РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», г. Минск

ИНДИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ

Резюме

В результате исследований выделен и идентифицирован методом полимеразно-цепной реакции в режиме «реального времени» вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней. Обнаружено в ПЦР РНК вируса РРСС из биологического материала и его культивирование на культурах клеток MARC-145, альвеолярных макрофагов свиней (АМС), Vero и на куриных эмбрионах. Установлено, что в результате культивирования *in vitro* вируса РРСС он не культивируется на куриных эмбрионах, а на культуре клеток Vero репродуцируется с низким инфекционным титром.

Summary

As a result of researches the virus of a reproductive and respiratory syndrome of pigs is allocated and identified by a polymerase-chain reaction method in the mode of «real time». It is revealed in virus RRSS PTsR RNA from biological material and its cultivation on cultures of cages of MARC-145, the alveolar macrophages of pigs (AMP), Vero and on chicken embryos. It is established that as a result of cultivation of *in vitro* of virus RRSS it isn't cultivated on chicken embryos, and on culture of cages of Vero is reproduced with a low infectious caption.

Поступила в редакцию 08.10.2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Репродуктивно-респираторный синдром свиней – одно из самых угрожающих инфекционных заболеваний свиней в мире, которое ежегодно вызывает значительные экономические убытки [1, 2]. Проявления заболевания характеризуются нарушением функции воспроизводства у свиноматок, абортами, преждевременными опоросами и рождением мертвых или слабых поросят, пневмонией и диареей молодых поросят и их высокой смертностью [3, 4]. Опасность возбудителя заключается не только в непосредственном влиянии на организм восприимчивых животных, но и в способности поражать иммунокомпетентные клетки, в результате чего развивается состояние иммунодефицита. При таких условиях у животных проявляются вторичные бактериальные

заболевания и усложняется течение других вирусных инфекций [5].

Вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней – это РНК-содержащий энтеровирус из семейства *Arteriviridae*, размером 28,4 нм. Оболочечный вирус имеет сферическую форму. Культивируется вирус в культурах легочных (альвеолярных) макрофагов, полученных от поросят 6–8 недельного возраста [2, 3, 5, 6].

Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, клинических признаков и результатов лабораторных исследований. Первичное распознавание может быть проведено на основе клинических симптомов: преждевременные опоросы или выкидыши на последней стадии супоросности, рождение слабых поросят и нарушения в системе дыхания у животных в разном возрасте. Поскольку эти призна-

ки очень изменчивы, учитывая различную вирулентность полевых штаммов и вторичных бактериальных и вирусных заболеваний, диагноз на РРСС должен быть подтвержден лабораторными методами [7]. Лабораторные исследования основаны на выделении вируса РРСС и выявлении специфических антител в сыворотках крови в реакциях непрямой иммунофлюоресценции и иммуноферментного анализа [9].

Целью наших исследований была индикация, идентификация возбудителя РРСС и изучение его культуральных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные исследования проводились в научно-исследовательском учебном центре диагностики болезней животных, который аккредитован ДСТУ ISO / IEC 17025: 2006. В качестве патологического материала использовали подчелюстные лимфоузлы от абортированных поросят.

В качестве контрольного вируса мы использовали референтный штамм вируса РРСС, полученный из Национального научно-исследовательского ветеринарного института г. Пулавы, Польша.

В работе были использованы культуры клеток: *MARC-145*, *AMC*, *Vero*.

MARC-145 – клон культуры клеток почки макаки-резус *MA-104*, которую поддерживали путем регулярных пересевов с использованием питательной среды Игла МЕМ с 10% сыворотки крупного рогатого скота.

AMC – первичная культура альвеолярных макрофагов свиней, которую получали от клинически здоровых поросят в возрасте 4–6 недель.

Vero – перевиваемая культура клеток почки зеленой африканской макаки.

Возможность репродукции вируса РРСС исследовали на 9–11-дневных куриных СПФ-эмбрионах.

Суспензию из лимфатических узлов готовили на растворе Хенкса, затем ее центрифугировали 25 мин при 4 тысячах

об./мин.

Культуру клеток *MARC-145* выращивали на матрасах объемом 50 см³ в стационарных условиях по следующей схеме:

- культивирование клеток *MARC-145* до образования сплошного монослоя;

- дезагрегацию монослоя клеток проводили с использованием 2,0–5,0 см³ диспергирующей смеси, состоящей из 0,02%-ного раствора Версена и 0,25%-ного раствора трипсина в соотношении 9:1. Полученную смесь вносили на монослой клеток и выдерживали 5–10 минут при температуре 37 °С в термостате;

- отделение монослоя клеток от субстрата; для этого диспергирующую смесь вносили в матрас с 10,0 см³ питательной среды Игла МЕМ и тщательно встряхивали до полной диссоциации клеток;

- полученную клеточную суспензию рассеивали на матрасы с добавлением ростовой среды (10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота).

Первичную культуру альвеолярных макрофагов получали по общепринятой схеме [10].

Вирус в монослое клеток *MARC-145* и *Vero* культивировали двумя методами:

- вирусосодержащий материал вносили на полностью сформированный монослой клеток *MARC-145* в дозе 1 см³, добавляли 2,5 мг трипсина и среды Игла МЕМ, культивировали в СО₂-инкубаторе при температуре 34 °С до 7 дней. После этого матрасы с вирусосодержащим материалом замораживали при температуре минус 20 °С, затем размораживали и использовали для последующего пассажа на сформированном монослое клеток;

- вирусосодержащий материал вносили на полностью сформированный (20–30%) монослой клеток *MARC-145* в дозе 1 см³ и среды Игла МЭМ с добавлением 10 % фетальной сыворотки телят, культивировали в СО₂-инкубаторе при температуре 34⁰С.

Культивирование вируса РРСС на СПФ куриных эмбрионах.

На 9–11 суточных развивающихся куриных СПФ эмбрионах, проводили до 10

пассажей вируса РРСС штамма *Lelystad* и полевых изолятов. В аллантоисную полость вносили по 0,1 см³ вируса РРСС на каждый эмбрион. Перед инфицированием эмбрионы проверяли на жизнеспособность. Куриные эмбрионы инкубировали при температуре + 37 °С и относительной влажности 60–70% в течение 72 часов с ежедневным овоскопированием. Через 72 часа эмбрионы охлаждали и использовали для сбора вирусодержащей экстраэмбриональной (аллантоисной) жидкости, которую затем проверяли на наличие вируса РРСС в различных серологических реакциях.

Определение инфекционного титра вируса РРСС проводили путем его титрования на перевиваемой культуре клеток *MARC-145*. Титрования вируса было основано на учете его цитопатического действия вируса (ЦПД), то есть способности вируса вызывать деструкцию клеток монослоя (проявлять цитопатический эффект). Непосредственно перед титрованием вирус освобождали от клеточного детрита

методом низкого центрифугирования [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Индикация и идентификация вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней было осуществлено методом ПЦР в режиме «реального времени» из биологического материала от абортированных поросят в количестве 5 проб.

Метод определения РНК вируса РРСС, включая экстракцию РНК из биологического материала вместе с РНК экзогенного неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКС), проведение обратной транскрипции, полученной РНК, амплификации, полученной к ДНК и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации в режиме «реального времени». Результат амплификации экзогенного ВКС на канале *FAM / Green* (рисунок 1, 2, 5, 6), а результат амплификации к ДНК вируса РРСС регистрировали на канале *JOE/Yellow* (рисунок 3, 4, 7, 8).

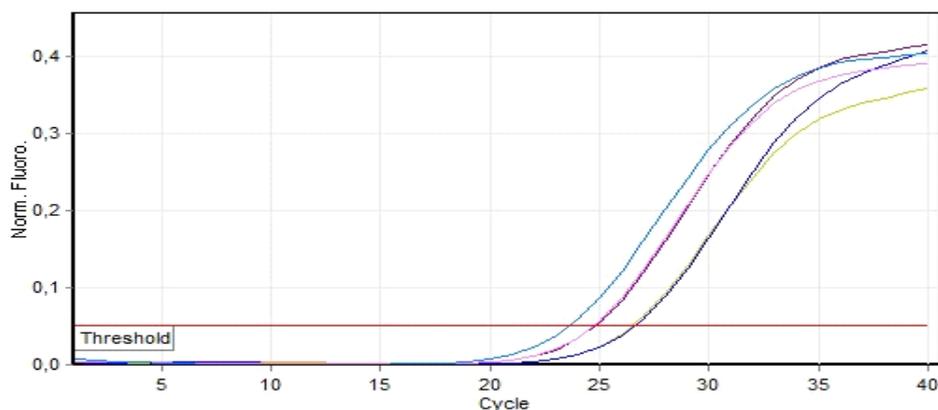


Рисунок 1 – График результатов амплификации ВКС по каналу *FAM / Green*

No	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	%Var
1	■	К-	Negative Control				
2	■	К+	Positive Control	26,53			
3	■	ВК-	NTC	26,64			
4	■	1	Unknown	24,85			
5	■	2	Unknown	24,76			
6	■	3	Unknown	23,68			

Рисунок 2 – Показатели порогового цикла (Ct) при амплификации ВКС по каналу *FAM / Green*

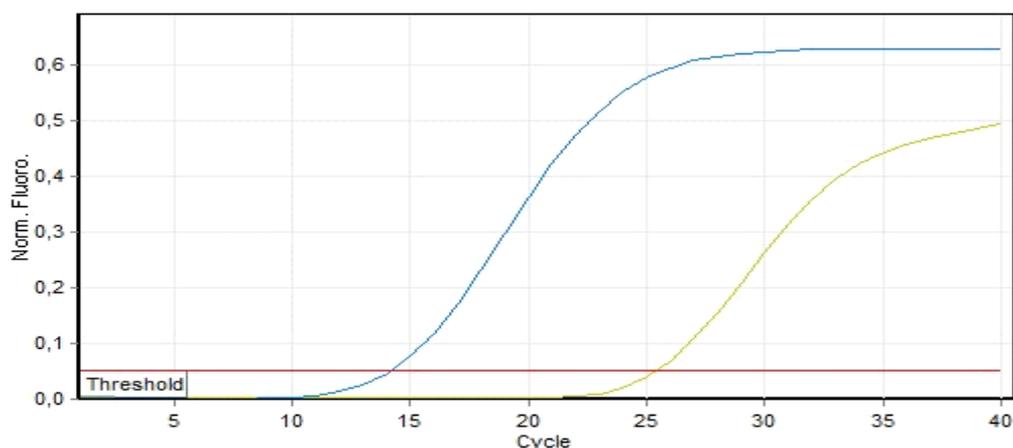


Рисунок 3 – График результатов амплификации специфического участка к ДНК вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней по каналу *JOE / Yellow*

No	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1	Red	K-	Negative Control				
2	Yellow	K+	Positive Control	25,42			
3	Blue	BK-	NTC				
4	Purple	1	Unknown				
5	Pink	2	Unknown				
6	Blue	3	Unknown	14,15			

Рисунок 4 – Показатели порогового цикла (Ct) при амплификации специфического участка к ДНК вируса РРСС по каналу *JOE / Yellow*

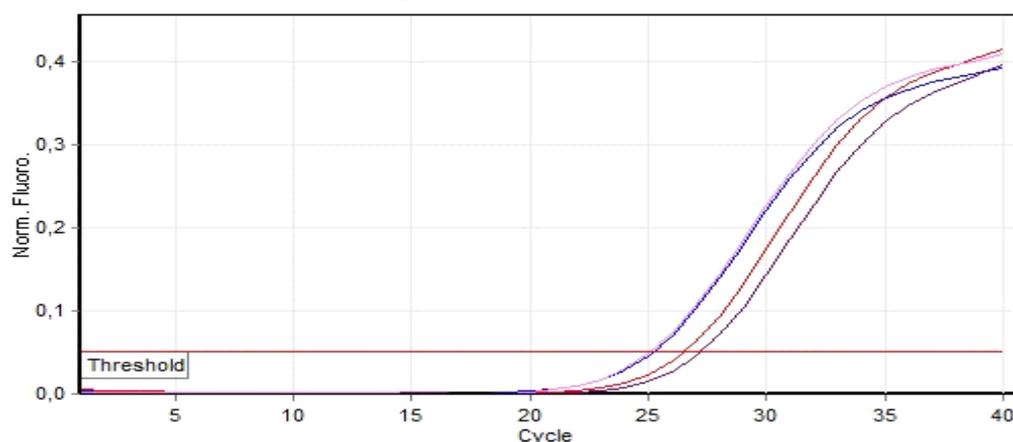


Рисунок 5 – График результатов амплификации ВКС по каналу *FAM / Green*

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1	Red	K+	Positive Control	26,53			
2	Yellow	K-	Negative Control				
3	Blue	B-	NTC	25,24			
4	Purple	1	Unknown	27,23			
5	Pink	2	Unknown	25,07			

Рисунок 6 – Показатели порогового цикла (Ct) при амплификации ВКС по каналу *FAM / Green*

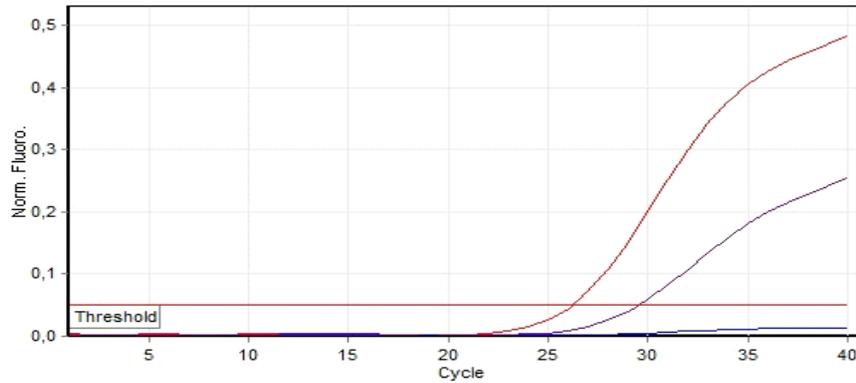


Рисунок 7 – График результатов амплификации специфического участка к ДНК вируса РРСС по каналу JOE / Yellow

No	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1	■	K+	Positive Control	26,25			
2	■	K-	Negative Control				
3	■	B-	NTC				
4	■	1	Unknown	29,54			
5	■	2	Unknown				

Рисунок 8 – Показатели порогового цикла (Ct) при амплификации специфического участка к ДНК вируса РРСС по каналу JOE / Yellow

В результате проведения диагностических исследований выделено РНК вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней в двух образцах биологического материала.

После выделения вируса из биологического материала его вносили в культуры клеток *MARC-145*, АМС, *Vero* и куриных эмбрионов с целью определения культуральных свойств. Одновременно проводили культивирование на биологических объектах референтного штамма вируса РРСС *Lelystad*.

Сначала проявлялись признаки ЦПД вируса РРСС, референтного штамма *Lelystad*, затем спустя 24–36 часов цитопатическое действие отмечали у полевых изолятов, которое наблюдалось в виде сферических образований клеток (конгломератов), возвышающихся над поверхностью монослоя. Утолщение оболочек клеток, образование цитоплазматических выростов на поверхности клетки, потерю клетками части цитоплазматической жидкости и, вследствие этого, сморщивание (пикноз) клеток, слияние в одном направ-

лении от двух до пяти клеток (образованные симпласты) наблюдали 2–3 суток спустя. Нарушение межклеточных связей и дезагрегацию клеток наблюдали на 3–4 сутки после инфицирования. Отслоение клеток от субстрата регистрировали через 4–5 суток, объединения симпластов в сетчатую структуру (псевдо-синтиций) – через 4–7 дней после внесения вируса.

Цитопатическое действие вируса РРСС, штамма *Lelystad*, в культуре АМС проявлялось в виде утолщения макрофагов, склеивания их между собой в конгломераты, образования симпластов из 2–3 слитых клеток, нарушения целостности клеточного монослоя, отделения макрофагов от субстрата и их лизиса в течение 1–4 суток (количество клеток в поле зрения ежедневно резко уменьшалось). Проявление цитопатического действия полевых изолятов ничем не отличалось, только отмечается через 24 часа. Результаты титрования вируса РРСС в перевиваемых линиях культур клеток *MARC-145*, АМС, *Vero* (n = 4), lg ТЦД₅₀/см³ представлены в представлении в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты титрования вируса РРСС в перевиваемых линиях культур клеток *MARC-145*, АМС, *Vero* (n = 4), lg ТЦД_{50/см³}

№ пассажира	<i>MARC-145</i>		АМС		<i>Vero</i>	
	<i>Lelystad</i>	Пол.изол.	<i>Lelystad</i>	Пол.изол.	<i>Lelystad</i>	Пол.изол.
2	2,75±0,25	1,83±0,17	5,50±0,50	2,77±0,07	1,27±0,08	н.д.
3	3,37±0,63	2,77±0,25	5,75±0,25	3,37±0,15	1,30±0,10	н.д.
4	3,56±0,44	3,37±0,13	5,75±0,25	3,72±0,10	1,38±0,10	н.д.
5	4,18±0,32	3,56±0,06	6,25±0,25	4,20±0,15	1,43±0,12	н.д.
6	4,75±0,25	4,16±0,34	6,50±0,50	4,56±0,16	1,79±0,04	1,48 ±0,08
7	5,11±0,39	4,33±0,27	6,0±0,50	5,07±0,07	2,19±0,12	1,64±0,16
8	5,28±0,32	4,56±0,44	6,0±0,50	5,26±0,07	2,43±0,07	1,83±0,17

Примечание – н.д. – не исследовалась

Из таблицы 1 видно, что титр вируса референтного европейского штамма *Lelystad* в культуре клеток *MARC-145* от второго до восьмого последовательного пассажа рос от $2,75 \pm 0,25$ до $5,28 \pm 0,32$ lg ТЦД₅₀ / см³.

Полевые изоляты вируса после проведения 8 пассажей показали меньший титр инфекционной активности от $1,83 \pm 0,17$ до $4,56 \pm 0,44$ lg ТЦД₅₀/см³. Проведение 8 пассажей вируса РРСС, штамма *Lelystad*, на альвеолярных макрофагах свиней существенно не менялся и составлял 5,5–6,5 lg ТЦД₅₀/см³, что значительно отличается от титров вируса РРСС полевых изолятов 3,51–4,25 lg ТЦД₅₀/см³.

После проведения 8 пассажей вируса РРСС на культуре клеток *Vero* можно сделать вывод, что вирус РРСС, адаптированный и размножается в перевиваемых линиях культур клеток *Vero*. Но титры вируса РРСС, штамма *Lelystad*, были несколько выше 2,10–2,43 lg ТЦД₅₀/см³, чем полевых изолятов 1,3–1,8 lg ТЦД₅₀/см³.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания эффективной системы с целью диагностики репродуктивно-респираторного синдрома свиней необходимо подобрать штамм вируса РРСС для дальнейшего использования в целях получения антигена. В связи с этим было про-

ведено сравнительное изучение инфекционной активности полевых штаммов и референтного вируса РРСС, штамма *Lelystad*, на разных культурах клеток. Полученные результаты культивирования и титрования свидетельствуют о том, что выделенные полевые изоляты вируса РРСС репродуцируются на исследуемых культурах клеток. При исследовании было установлено, что высокие титры инфекционной активности референтного штамма вируса *Lelystad* в АМС были выше по сравнению с другими биологическими объектами и, учитывая трудоемкость получения альвеолярных макрофагов свиней, использование штаммов не целесообразно.

ВЫВОДЫ

1 В результате исследований индуцировано и идентифицирован методом ПЦР в режиме «реального времени» вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС).

2 Выделены изоляты вируса РРСС и исследованы их культуральные свойства. Установлено, что в результате культивирования *in vitro* вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней есть особенности. Вирус не культивируется в линии клеток *Vero*, вирус РРСС не культивируется на куриных эмбрионах, но

культивируется в линии клеток *MARC-145*, АМС. В дальнейших исследованиях будет использоваться культура клеток *MARC-145* и референтный штамм вируса РРСС.

3 В результате пассирования референтного штамма вируса РРСС и выделенных полевых изолятов установлено, что титр вируса референтного европейского штамма *Lelystad* в культуре клеток *MARC-145* от второго до восьмого последова-

тельного пассажа рос от $2,75 \pm 0,25$ до $5,28 \pm 0,32$ lg ТЦД₅₀/см³. Полевые изоляты вируса от $1,83 \pm 0,17$ до $4,56 \pm 0,44$ lg ТЦД₅₀/см³. На АМС инфекционная активность составляет референтного штамма $5,5-6,5$ lg ТЦД₅₀/см³, полевых изолятов $3,51-4,25$ lg ТЦД₅₀/см³. На культуре клеток *Vero* титры вируса РРСС штамма *Lelystad* составляли $2,10-2,43$ lg ТЦД₅₀/см³ и были выше, чем у полевых изолятов на $1,3-1,8$ lg ТЦД₅₀/см³.

ЛИТЕРАТУРА

1 Бусол, В. О. Репродуктивний і респіраторний синдром свиней – загроза свиноводству України / В. О. Бусол, М.В. Бакін, В. О. Міщенко // Збереженість молодняка / г тварин – запорука розвитку тваринництва України : зб. Стат. Наук.-практ. Конф. – Х., 1994. – С. 102 – 104.

2 Выделение и культивирование вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней для изготовления диагностических и вакцинных препаратов : дис. на соиск. учен. степ. канд. ветеринар. наук : специальность 16.00.03 «Вирусология» / В. Л. Гаврилова. – Владимир, 2007. – 168с.

3 Классификация и номенклатура вирусов позвоночных: метод. пособие / сост. Б. Г. Орлянкин. – Москва, 1998. – 64с.

4 Методичні рекомендації застосування імунопероксидазного тесту для вірусологічної та серологічної діагностики репродуктивно-респіраторного синдрому свиней / М. П. Ситюк [та ін.]. – Ніжин: ПП Лисенко М. М., 2014. – 36 с.

5 Репродуктивно-респираторный синдром свиней / Т. З. Байбиков [и др.] // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – № 12. – 2006. – С. 9–13.

6 Репродуктивный и респираторный синдром свиней // Вирусные болезни животных / В. Н. Сюрин [и др.]. – Москва : ВНИТИБП, 1998. – С. 552–558.

7 Пейсак З. Болезни свиней / Зигмунт Пейсак; пер. с польск. Д. В. Потапчука. – Брест : ОАО «Брестская типография», 2008. – 424 с.

8 Cho J. G. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus / J.G. Cho, S.A. Dee // Theriogenology. – 2006. – Vol. 66. – P.655–662.

9 Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad / G. Wensvoort, E.P. de Kluiver, J.M.A. Pol [et al.] // Vet. Microbiol. – 1992. – Vol. 33. – P. 185–193.

10 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus) / J. Zimmerman [et al.] // Diseases of Swine. – 9th ed. – Ames, Iowa : Blackwell Publishing, 2006. – P. 387–417.



Вакцина «ПНЕВМОБАКТ» инактивированная эмульгированная против пневмонии телят

- ◆ вакцина включает штаммы бактерий, циркулирующие на территории Республики Беларусь;
- ◆ безопасна и иммуногенна;
- ◆ иммунитет развивается через 14 дней после вакцинации и сохраняется в течение 6 месяцев;
- ◆ обладает лечебным эффектом.

Изготовитель: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского» 220003, г. Минск, ул. Брикета, 28, тел./факс (+37517) 5088131

По вопросам приобретения препарата Вы можете обратиться в отдел снабжения и сбыта, тел. (017) 508-81-35 E-mail: bievvm@tut.by