

УДК 619:616.98:578.831.31:636.4

*Т. А. САВЕЛЬЕВА***, *Е. Л. КРАСНИКОВА**, *А. Ю. ФИНОГЕНОВ**

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ОРГАНИЗМА

**Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеселеского»,*

***Институт мясо-молочной промышленности*

(Поступила в редакцию 28.04.2011)

Введение. Репродуктивно-респираторный (РРСС) синдром – специфическое вирусное заболевание свиней, характеризующееся поражением всего свиноголовья и протекающее с серьезными нарушениями со стороны репродуктивной и респираторной систем. Вирус, вызывающий РРСС, вариабелен и представлен тремя основными генетическими группами: североамериканский, западноевропейский типы и изоляты, персистирующие на территории Республики Беларусь.

Данное заболевание входит в список заболеваний группы Б Международного эпизоотического бюро (МЭБ) и официально зарегистрировано на территории Республики Беларусь с 1997 г. [1, 2].

Мониторинговые исследования, проведенные в 2004–2010 гг., показали, что в отдельных хозяйствах республики количество серопозитивных животных достигает 100%, а в среднем по республике колеблется от 40 до 60% [2, 3].

Возникновение РРСС приносит значительный экономический ущерб из-за выбытия и падежа поросят, который может достигать 20–30%, а также абортос и прохолостов у свиноматок. Этот вирус быстро распространяется среди интактных животных, поражая репродуктивную часть стада и молодняк, обладает иммуносупрессирующим действием, что приводит к возникновению смешанных инфекций.

Быстрая постановка диагноза в случае возникновения болезни является основополагающим фактором, обеспечивающим проведение в сжатые сроки соответствующих мероприятий по ее ликвидации.

Диагноз на заболевание РРСС ставится с учетом эпизоотологических и клинико-патолого-анатомических данных. При этом необходимо, чтобы клинический диагноз был подтвержден лабораторными исследованиями, так как заболевание имеет разнообразную клиническую картину и обычно осложняется секундарной инфекцией [3–5].

В окружающую среду вирус РРСС выделяется со слюной, мочой, пометом, молоком, а также спермой инфицированных животных. Начинается этот процесс со 2-го дня заражения и может продолжаться месяцами.

Для лабораторной диагностики РРСС в республике используют современные методы исследований: иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Вместе с тем существует еще один официально зарегистрированный МЭБ (метод прижизненной диагностики репродуктивно-респираторного синдрома свиней) – иммунопероксидазный монослойный анализ (IPMA), который позволяет не только выявлять серопозитивных животных, но и обнаружить вирус в биологических жидкостях организма [6]. Данный метод апробирован нами для обнаружения вируса в крови, слюне и моче поросят.

Цель настоящих исследований – изучение возможности применения IPMA для прижизненной диагностики вируса РРСС, а также подбор экспериментальной модели клеточных культур для удешевления постановки реакции и обеспечения достоверности результатов.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили в Институте экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского в 2009–2010 гг., отбор проб проводили от экспериментально зараженных поросят и от животных из хозяйств с неблагополучной по РРСС ситуацией.

В документах МЭБ описана методика постановки IPMA с целью диагностики РРСС, однако недостатком ее является использование в качестве клеточного субстрата альвеолярных макрофагов свиней, что делает сам метод трудоемким и дорогостоящим [5, 6].

Наиболее чувствительной лабораторной системой для выявления вируса РРСС признана перививаемая культура клеток MARC-145, поэтому в исследованиях по подбору оптимальной клеточной модели в качестве клеточного субстрата нами в первую очередь апробирована данная культура клеток.

В качестве сенсibiliзирующего антигена брали музейный штамм вируса РРСС *Lelystad* с инфекционным титром $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$, а также изоляты и биологические жидкости (слюну, кровь, мочу), выделенные от поросят из неблагополучных хозяйств.

Исследования проводили на 96-луночных панелях (компания Starsted) в несколько этапов, отработывая оптимальные концентрации клеточного субстрата, инфицирующего агента, параметры проведения реакции и ее компоненты.

Результаты и их обсуждение. Получение биологических жидкостей из организма сопряжено с необходимостью дополнительной обработки с целью удаления неспецифических загрязнителей и предупреждения бактериальной обсемененности клеточного субстрата в дальнейшем, поэтому важной частью нашей работы стала отработка способов отбора, хранения и очистки биологических жидкостей.

В ходе проведенных исследований установлен оптимальный состав сред для хранения и консервации РРСС-вирусодержащих биологических жидкостей. Ими являются раствор ФБР и среда, состоящая из раствора Хенкса (98%) и стерильной эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота для культивирования культур клеток (2%). В данных средах вирус может храниться при температуре -20°C не менее 6 мес (срок наблюдения).

Нами установлено, что оптимальным методом пробоподготовки является обработка материала по следующей схеме: размораживание при 37°C , центрифугирование при 2000 об/мин 10 мин., обработка пенициллином (1000 ЕД/мл), стрептомицином (500 мкг/мл) и амфотерицином (500 мкг/мл) при 37°C . Кроме того, использование стерилизующих одноразовых фильтров, размер пор 0,22 и 0,45 мкм, упрощает метод пробоподготовки.

Для проведения исследований по установлению оптимального объема клеточной суспензии, вносимой в лунку, использовали объемы 25, 50, 100 и 200 мкл. Объемы 25 мкл (недостаточная наполняемость лунки, что отрицательно сказывалось на образовании монослоя) и 200 мкл (отсутствие необходимости в таком большом объеме) были отклонены на первом этапе эксперимента. Установлено, что наиболее оптимальными для работы с культурой клеток на 96-луночных планшетах являются объемы 50 и 100 мкл, но для обеспечения качественного питания клеток более целесообразно использовать объем 100 мкл, поэтому за основу для дальнейших исследований брали 100 мкл клеточной суспензии.

Посевную дозу клеток (тыс. кл/мл) определяли путем разведения маточной суспензии клеток до конечной концентрации (табл. 1). Затем клетки инкубировали при 37°C с содержанием в атмосфере 5% CO_2 . Результаты исследований определяли с учетом скорости образования монослоя и его качества.

Результаты исследований, представленные в табл. 1, показывают, что оптимальная концентрация культуры клеток Marc-145 при посеве в лунку 96-луночной планшеты составляет 200 тыс. кл/мл. Определено, что увеличение концентрации клеток до 300–400 тыс. кл/мл приводит к снижению адсорбции клеток на носителе, формированию неравномерного, переросшего, в несколько слоев, монослоя. Уменьшение концентрации клеток до 50–100 тыс. кл/мл удлиняет сроки образования монослоя в 2–4 раза, тем самым увеличивая количество старых клеток, что также снижает достоверность результатов.

Объем вирусосодержащей суспензии для вируса и для биологических жидкостей определяли аналогично определению объема клеточной суспензии на одну лунку. Для работы брали объемы 25, 50, 100 и 200 мкл. Установлено, что наиболее оптимальный объем вирусосодержащей суспен-

зии – 50 мкл. Данный объем позволяет осуществить заражение 50% клеточного монослоя при выбранной концентрации суспензии и не вызывает неспецифических реакций в виде цитотоксичности содержащимися в суспензии продуктами (антибиотики, частицы биологической жидкости, остатки клеток и т. п.).

Таблица 1. Характеристика монослоя культуры клеток Marc-145 в зависимости от объема и посевной концентрации

Посевная доза тыс. кл/мл	Объем посевного материала, мкл	Время образование монослоя, сут	Характеристика монослоя
50	100	4–5	Монослой полный, без наслоений; клетки шестигранные, с четко выраженными границами; ядро хорошо просматривается; цитоплазма без включений
100	100	3–4	Монослой полный, без наслоений; клетки шестигранные, с четко выраженными границами; ядро хорошо просматривается; цитоплазма без включений
200	100	2	Монослой полный, без наслоений; клетки шестигранные, с четко выраженными границами; ядро хорошо просматривается; цитоплазма без включений
300	100	2	Монослой с большим количеством наслоений; много клеток плавает, не прикрепленных к носителю; отдельные клетки мелкие, четко отграничены друг от друга
400	100	1	Монослой с большим количеством наслоений; много клеток плавает, не прикрепленных к носителю; отдельные клетки плохо просматриваются, мелкие

При изучении инфицирующей дозы вируса экспериментально установлено, что при разведении 1 : 200 вируса РРСС штамм *Lelystad* с инфекционным титром $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ происходит заражение 50% клеточного монослоя. Изучение режимов инокуляции позволило получить следующие результаты (табл. 2).

При инокуляции вирусного агента в клетку в первом режиме (табл. 2) визуально цитопатический эффект определяется только через 48 ч, однако при постановке IPMA уже через 24 ч после инкубации хорошо различима красная окраска цитоплазмы отдельных пораженных клеток.

При инокуляции вируса в клетку во втором режиме визуально цитопатический эффект определяется только через 72 ч, однако при постановке IPMA уже через 24 ч после инкубации в красный цвет окрашивается цитоплазма лишь 1–2 клеток в поле зрения микроскопа. Хорошо различимая красная окраска цитоплазмы отдельных пораженных клеток наблюдается только через 72 ч инкубации, кроме того, значительно увеличивается количество окрашенных клеток (см. табл. 2).

При инокуляции вируса в клетку в третьем режиме в поддерживающей среде различается большое количество «мусора», клетки имеют слабоочерченные границы. При микроскопии (после постановки IPMA) выявляется неспецифическое свечение красного цвета, за счет малого количества клеток на носителе трудно определить наличие окрашивания цитоплазмы (см. табл. 2).

В качестве основного режима инокуляции вирусных агентов в культуру клеток на микропанелях выбрана следующая схема: в течение 1 ч в инкубаторе при 37 °С и содержании CO₂ – 5% с последующим добавлением поддерживающей среды (50–50% после 1 ч инкубации) и инкубацией зараженных клеток в течение 24 ч в инкубаторе при 37 °С с содержанием CO₂ – 5% (табл. 2).

Изучение способов фиксации полученного материала и условий длительного хранения показали, что инфицированная клетка способна сохраняться при температуре –20 °С не менее 6 мес, после предварительного обезвоживания – в течение 1–2 ч при температуре 37 °С.

Отработанная нами схема постановки реакции включала следующие этапы: фиксация панелей 4%-ным формальдегидом в течение 10–15 мин, внесение сыворотки и конъюганта в объеме 50 мкл с последующей инкубацией в термостате при 37 °С в течение 60 мин, внесение субстрата с 10-минутной инкубацией, сливом субстрата и остановкой реакции 0,05М натрий-ацетатным буфером. Учет полученных результатов проводили путем микроскопического определения наличия или отсутствия вируса/антител в исследуемой пробе по красному окрашиванию клетки (рис. 1, темно-серый цвет).

Таблица 2. Режимы инокуляции вирусных агентов и инкубации культуры клеток зараженной суспензией содержащей вирус РРСС

Режим инокуляции / время инкубации, ч	Режим №1	Режим №2	Режим №3
<i>Характеристика цитопатических действий</i>			
24	Видимого цитопатического действия не наблюдается	Видимого цитопатического действия не наблюдается	В поддерживающей среде большое количество «мусора», клетки имеют слабо очерченные границы
48	Отдельные клетки округляются и собираются в гроздь	Видимого цитопатического действия не наблюдается	В поддерживающей среде большое количество округлых клеток, часть клеток собирается в гроздь винограда
72	Округлые клетки сформированы в виде гроздьев винограда, часть клеток плавают в среде	Отдельные клетки округляются и собираются в гроздь	Большинство клеток отделено от носителя, клетки собраны в виде гроздьев винограда
<i>Результаты постановки IPMA</i>			
24	Хорошо различима красная окраска цитоплазмы отдельных пораженных клеток	В красный цвет окрашивается цитоплазма лишь 1–2 клеток в поле зрения микроскопа	При микроскопии выявляется неспецифическое свечение красного цвета, за счет малого количества клеток на носителе трудно определить наличие окрашивания цитоплазмы
48	Хорошо различима красная окраска цитоплазмы отдельных пораженных клеток, количество окрашенных клеток значительно увеличилось	В красный цвет окрашивается цитоплазма лишь 1–2 клеток в поле зрения микроскопа	
72	В микроскопе наблюдается неспецифическое окрашивание клеток наравне со специфическим окрашиванием цитоплазмы, часть клеток отделена от носителя и плавает в поддерживающей среде	Хорошо различима красная окраска цитоплазмы отдельных пораженных клеток, количество окрашенных клеток значительно увеличилось	

Примечание: Режим №1 – 1 ч в инкубаторе при 37 °С и содержанием CO₂ 5% с добавлением поддерживающей среды (50–50% после 1 ч инкубации); режим №2 – 1 ч в инкубаторе при 37 °С и содержанием CO₂ 5%, с последующим сливом вирусосодержащей суспензии, однократной промывкой и добавлением поддерживающей среды; режим №3 – без слива суспензии, без последующего добавления поддерживающей среды – сразу в однократном объеме

Нами установлено, что вирус выделяется из организма инфицированных животных со всеми секретами, включая экскременты. Полученные данные подтверждают исследования других авторов [3].

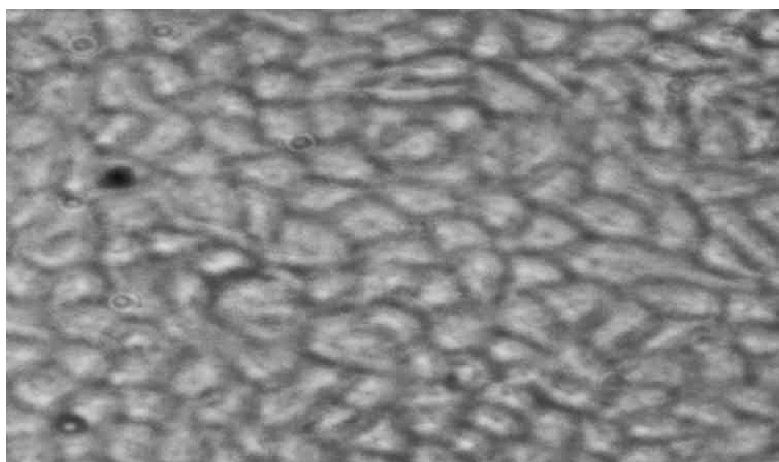


Рис. 1. Выявление окрашиваемой цитоплазмы в положительной пробе

Согласно последним исследованиям, предполагается, что слюна играет определяющую роль в инфицировании свиней в первые 1,5 мес после проникновения вируса в неинфицированное стадо [5]. Нами установлено, что выделение вируса со слюной из организма экспериментально зараженных 20-дневных поросят с наличием остро протекающей специфической для РРСС клинической картиной происходило начиная с 3-х суток после заражения и в течение 30 дней, обнаружение вируса в сыворотке крови происходило на протяжении всего опыта (30 дней), выявление антител – начиная с 7-го дня и на протяжении всего опыта.

Т а б л и ц а 3. **Определение комплекса вирус/антитело в биологических жидкостях организма экспериментально инфицированных поросят методом IPMA**

Вид биологической жидкости организма	Количество дней после заражения			
	3	7	15	30
Слюна	В поле зрения микроскопа отдельные клетки с цитоплазмой, окрашенной в красный цвет	В поле зрения микроскопа поражено до 50% клеток	В поле зрения микроскопа поражено 50% клеток	В поле зрения микроскопа поражено до 50% клеток
Кровь/антиген	В поле зрения микроскопа отдельные клетки с цитоплазмой, окрашенной в красный цвет	В поле зрения микроскопа поражено до 50% клеток	В поле зрения микроскопа поражено более 50% клеток	В поле зрения микроскопа поражено 50% клеток
Кровь/антитело	–	В поле зрения микроскопа отдельные клетки с цитоплазмой, окрашенной в красный цвет	В поле зрения микроскопа поражено 50% клеток	В поле зрения микроскопа поражено более 50% клеток
Моча	–	В поле зрения микроскопа поражено до 30% клеток	В поле зрения микроскопа поражено до 50% клеток	В поле зрения микроскопа поражено 50% клеток
Патматериал (легкие) погибшего поросенка	–	В поле зрения микроскопа поражено более 50% клеток	–	–

Согласно представленным в табл. 3 данным, во всех биологических жидкостях экспериментально зараженных животных вирус выделялся на протяжении всего опыта. Так, вирус в слюне и крови выделялся уже на 2-е сутки, а антитела к вирусу РРСС – только начиная с 7-го дня. Персистенция вируса в организме экспериментально инфицированных животных была подтверждена нами методом полимеразной цепной реакции (набор НПО «Нарвак») (рис. 2) и постановкой IPMA с патологическим материалом от павшего поросенка. Кроме того, полученные нами результаты не противоречат данным, содержащимся в мировой литературе [2, 4, 5].

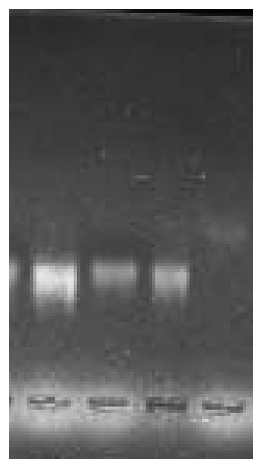


Рис. 2. Результаты ПЦР патологического материала павшего экспериментально зараженного поросенка (слева направо): 1 – положительный контроль, 2 – печень, 3 – легкие, 4 – отрицательный контроль

Заключение. Анализ полученных результатов указывает на возможность использования метода IPMA для прижизненной диагностики репродуктивно-респираторного синдрома свиней.

В качестве клеточного субстрата может быть использована 1–2-суточная перевиваемая культура клеток Magc-145, инфицирующая доза вирусного агента зависит от титра вируса и количества клеточного материала. Зараженный клеточный субстрат способен сохранять свои свойства при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ не менее 6 мес.

Отработанная нами схема постановки реакции включала фиксацию панелей 4%-ным формальдегидом в течение 10–15 мин, внесение сыворотки и конъюгата в объеме 50 мкл с последующей инкубацией в термостате при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 60 мин и внесение субстрата с 10-минутной инкубацией, сливом субстрата и остановкой реакции 0,05М натрий-ацетатным буфером, учет полученных результатов путем микроскопического определения наличия или отсутствия вируса/антител в исследуемой пробе по красному окрашиванию цитоплазмы клетки.

В условиях лаборатории использование данной методики позволит косвенно изучать время заражения поголовья и титр антител в исследуемых сыворотках крови, а также при наличии стандартизированных положительных сывороток РРСС, диагностировать наличие возбудителя в присылаемом материале.

Литература

1. Ястребов, А. С. Эпизоотическая ситуация по вирусным болезням свиней, их диагностика и профилактика в Республике Беларусь / А. С. Ястребов // Современные вопросы патологии с.-х. животных: материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 23–24 окт. 2003 г. / БелНИИЭВ. – Минск, 2003. – С. 307–309.
2. Вопросы диагностики РРСС в свиноводческих хозяйствах / Т. А. Савельева [и др.] // Сб. науч. трудов / РНИУП «Инс. экспер. вет. им. С. Н. Вышелеского НАН Беларуси». – Минск, 2005. – Вып. 37: **Ветеринарная наука – производству**. – С. 164–168.
3. Wenswort, G. Mystery swine disease in the Nitherlands/ G. Wenswort [et. al.] // The VeterinaryQuarterly. – 1991. – Vol. 13, N 3.
4. Pejsak, Z. Losses due to porcine, Microbiology and Infectious Diseases, peproductive and respiratory syndrome in a large swine farm/ Z. Pejsak, I. Markowska-Daniel // Comparative Immunology. – 1997. – Vol. 20, N 4. – P. 345–352.
5. Дрю, Т. Репродуктивный и респираторный синдром свиней / Т. Дрю // Российский ветеринарный конгресс. – М., 2009. – 32 с.
6. Patogenesis and antigenic characterizatijn of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate/ U. U. Karniychuk [et. al.] // BMC Veterinary Research. – 2010, 04 Yun.

T. A. SAVELYEVA, E. L. KRASNIKOVA, A. YU. FINOGENOV, A. A. GUSEV

IDENTIFICATION OF VIRUS OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME IN BODY FLUIDS

Summary

The article describes the study of the possibility of using IPMA to diagnose virus of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome which enables to reveal both antibodies and antigen in body fluids, and also the choice of an experimental model of cell cultures, reducing the price of vaccine and ensuring the accuracy of results.