

УДК 619:616.98:578.831.31:616-074

**В.Л. Гаврилова, Т.З. Байбиков**

*Федеральное государственное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Россия*

## **ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИГЕНА ВИРУСА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ С ПОМОЩЬЮ НЕПРЯМОЙ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ**

### **Введение**

Репродуктивно-респираторный синдром свиней причиняет значительный экономический ущерб свиноводству многих стран мира, поэтому, возникает необходимость своевременной постановки диагноза и проведения плановых мероприятий по профилактике и ликвидации очагов острых вспышек заболевания [3, 4, 5].

Диагностика РРСС основывается на анализе эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных и результатах лабораторных исследований [1, 2, 4].

Антиген вируса РРСС выявляют в зафиксированных в формалине срезах тканей органов при помощи НРИФ и других тестов, геном вируса – в ПЦР [7, 8].

НРИФ является экспрессметодом в диагностике РРСС и обладает большой чувствительностью и специфичностью. Выявление вируса РРСС при помощи НРИФ в патологических материалах с использованием перевиваемой культуры клеток позволяет протестировать большое количество проб, значительно сократить срок получения результатов, а также заметно снизить трудоемкость процесса и расход используемых компонентов реакции.

Целью нашей работы явилось изучение возможности выявления вируса РРСС в полевых образцах методом НРИФ в культуре клеток MARC-145.

### **Материалы и методы**

В качестве патологического материала использовали пробы внутренних органов, полученных от экспериментально инфицированных вирусом РРСС подсвинков в период с 1994 по 2006 гг. из хозяйств Российской Федерации различных регионов России: Белгородской, Владимирской, Вологодской, Воронежской, Ивановской, Калужской, Кемеровской, Кировской, Костромской, Курской, Нижегородской, Новгородской, Новосибирской, Омской, Оренбургской, Пензенской, Пермской, Рязанской, Саратовской, Свердловской, Смолен-

ской, Тульской, Тюменской, Ульяновской и Челябинской областей, Краснодарского и Ставропольского краев.

При постановке НРИФ использовали коммерческие антивидовые конъюгаты, выпускаемые на предприятии по производству бакпрепаратов при НИИЭМ им. Н.Ф.

Гамалеи, представляющие собой глобулиновую фракцию, выделенную из антисыворотки, полученной иммунизацией кроликов иммуноглобулинами свиньи, меченную ФИТЦ, а также антивидовой кроличий иммунофлюоресцирующий конъюгат против IgG свиней производства фирмы «SIGMA» (США).

В работе была использована перевиваемая культура клеток MARC-145 (клон культуры клеток почки макаки-резус МА-104), которую поддерживали путем регулярных пересевов с использованием питательной среды Игла с 10% сыворотки КРС.

Вначале отработали постановку реакции в монослой клеток MARC-145, выращенном в пенициллиновых флаконах. Постановка реакции включала следующие этапы:

- получение монослоя клеток MARC-145: засевали пенициллиновые флаконы клеточной суспензией с посевной концентрацией 150 тыс. кл/см<sup>3</sup> по 1 см<sup>3</sup> и инкубировали при +37° С в термостате в течение 48-72 часов;

- инфицирование монослоя клеток: на монослой наносили исследуемую суспензию в объеме 0,5 см<sup>3</sup> и выдерживали в течение 2 часов при температуре 37° С в термостате.

Затем заливали в пенициллиновые флаконы поддерживающую питательную среду Игла в объеме 2 см<sup>3</sup> и инкубировали в течение 24-48 часов;

- получение препаратов из инфицированной вирусом и интактной культуры клеток. С этой целью вносили во флаконы по 0,2 см<sup>3</sup> смеси версена и трипсина и выдерживали в термостате в течение 10-15

**Результаты обнаружения вируса РРСС в органах экспериментальных подсвинков, n=5**

№ п/п	Исследуемый материал	Результаты исследований в НРИФ органов поросят	
		инфицированных	не инфицированных
1	сгусток крови	+	-
2	сыворотка крови	+	-
3	легкие	+	-
4	макрофаги	+	-
5	миндалины	+	-
6	лимфатические узлы	+	-
7	селезенка	+	-

минут до начала дезагрегации клеток. Затем клетки диспергировали пипетированием и раскапывали на предметные стекла (по 3-4 капли с концентрацией  $10^6$  кл/см<sup>3</sup>) с помощью микродозатора;

- фиксация препаратов охлажденным при -20° С ацетоном, который дважды, с интервалом 5 минут, наносили на препараты, затем высушивали их на воздухе;

- взаимодействие антигена с антителами, для этого настилали на препараты гипериммунную к вирусу РРСС сыворотку крови свиней в разведении 1:80, выдерживали на контакте 30 минут, промывали водопроводной водой и высушивали препараты;

- взаимодействие комплексов антиген-антитело с антивидовым флюоресцирующим конъюгатом - кроличьими анти-свиными глобулинами, меченными

флюоресцеина-5-изотиоцианатом. Данный конъюгат настилали на препараты в рабочем разведении (1:200), инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре, затем препараты промывали водопроводной водой и высушивали;

- контрастирование препаратов с помощью окрашивания их водным раствором Эванса голубого в разведении 1/10<sup>6</sup> в течение 10 минут при комнатной температуре с последующим промыванием водопроводной водой и высушиванием;

- учет результатов реакции в люминесцентном микроскопе: при регистрации ярко зеленого внутриплазматического свечения клеток в положительном контроле и отсутствии такого свечения в отрицательном контроле переходили к просмотру препаратов с исследуемым материалом.

Затем, методику постановки НРИФ отработали с использованием монослоя клеток MARC-145, выращенного в лун-

ках 96-луночных полистироловых микропланшетов: в лунки 96-луночных микропланшетов вносили по 50 мкл питательной ростовой среды

Игла, затем – по 100 мкл клеточной суспензии MARC-145 с посевной концентрацией 200000 кл/см<sup>3</sup>. Через 24-48 часов инкубирования в СО<sub>2</sub>-инкубаторе с 5% СО<sub>2</sub> при 37° С выросший монослой клеток инфицировали испытуемыми 33%-ными суспензиями патологических материалов, которые вносили по 50 мкл в лунки (по 4 повторности).

В качестве положительного контроля использовали суспензию, полученную из патматериала от экспериментально инфицированного интратрахеально вирусом РРСС, штамма Lelystad, подсвинка. В качестве отрицательного контроля использовали суспензию, полученную из кусочков внутренних органов от клинически здорового подсвинка. Плашки помещали в СО<sub>2</sub>-инкубатор на 24-48 часов при температуре 37° С.

Через 24-48 часов удаляли содержимое лунок, плашку высушивали на воздухе в течение ночи и проводили фиксацию в смеси, состоящей из равных частей дистиллированной воды, спирта и ацетона при комнатной температуре (смесь вносили по 50 мкл в каждую лунку и тот час удаляли), затем, микропланшеты высушивали на воздухе. Потом, в каждую лунку вносили серопозитивную к вирусу РРСС сыворотку крови свиней в рабочем разведении и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре.

Затем, плашки тщательно промывали под слабой струей водопроводной воды, ополаскивали дистиллированной водой и подсушивали на фильтровальной бумаге. После этого, в каждую лунку вносили по

**Результаты исследования на наличие вируса РРСС в НРИФ  
полевых патологических материалов от свиней**

Наименование проб патологических материалов	Количество исследованных проб		
	всего	положительных	%
Внутренние органы	236	142	33,51
Транссудат или экссудат	128	83	64,84
Кровь от домолозивных поросят	33	22	66,67
Кровь от свиноматок	259	185	71,42
Кровь от мертворожденных поросят	13	9	69,23
Кровь от поросят-сосунов	38	26	68,42
Кровь от хряков	7	3	42,85
Молозиво	3	2	66,67
Всего:	717	472	65,83

50 мкл рабочего разведения антивидового флюоресцирующего конъюгата и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем, микропланшеты промывали и высушивали, как было указано выше. С целью повышения контрастности препаратов в каждую лунку вносили по 50 мкл водного раствора Эванса голубого в разведении 1/10<sup>6</sup> и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. По истечении времени плашку промывали дистиллированной водой, затем тщательно высушивали и просматривали под люминесцентным микроскопом.

**Результаты и обсуждения**

При оценке результатов учитывали количество флюоресцирующих клеток и интенсивность свечения цитоплазмы.

На первых этапах работы использовали в качестве испытуемого материала пробы органов и тканей, полученные от экспериментально инфицированных вирусом РРСС, штамма Lelystad, и незараженных подсвинков. Опыты проводили на серонегативных к вирусу РРСС подсвинках с массой тела 20-25 кг. Животных заражали вирусом РРСС, штамма Lelystad, прошедшим 5 пассажей в перевиваемой культуре клеток MARC-145 с титром инфекционности 4.25 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> интратрахеально. На пике температурной реакции (отмечали повышение температуры тела до 40.5-40.9° С) животных убивали и отбирали пробы различных органов и тканей для исследования на наличие вируса в непрямой реакции иммунофлюоресценции. Результаты проведенных исследований

представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, положительные результаты были получены в НРИФ только в тех препаратах, которые были приготовлены из проб органов инфицированных вирусом РРСС свиней. В неинфицированных клетках не наблюдали флюоресцирующего цитоплазматического свечения, что являлось отрицательным результатом.

Следовательно, данная методика позволяет специфично обнаруживать антиген вируса РРСС в исследуемом патологическом материале, полученном от больных РРСС животных, и может быть использована в специализированных ветеринарных лабораториях страны.

На втором этапе исследования разработанную методику по выявлению вируса РРСС при помощи НРИФ апробировали при тестировании проб патологических материалов, полученных из различных хозяйств РФ. Результаты данных исследований представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 видно, что в НРИФ на наличие вируса РРСС было исследовано 717 проб патологических материалов, из них выявлено положительных – 472 (65,82%). Результаты проведенных исследований свидетельствовали о широком распространении РРСС в свиноводческих хозяйствах России.

В дальнейшем, пробы патологического материала, в которых при помощи НРИФ был выявлен вирус РРСС, использовали для выделения и адаптации изолятов к перевиваемой культуре клеток MARC-145 с целью дальнейшего изуче-

ния и оценки их пригодности в качестве производственных штаммов.

#### **Выводы**

Результаты проведенных исследований показывают, что использование метода иммунофлюоресценции в культуре клеток

MARC-145, выращенной в микропланшетах, позволяет специфично выявлять наличие вируса РРСС в пробах патологического материала, одновременно исследовать большое количество проб и экономно расходовать все компоненты реакции.

#### **РЕЗЮМЕ**

**В статье приведены результаты выявления вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) в пробах суспензий патологических материалов, отобранных от экспериментально инфицированных свиней или полученных из различных свиноводческих хозяйств Российской Федерации, при помощи непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ) с использованием монослоя переливаемой культуры клеток MARC-145.**

#### **SUMMARY**

**Possibility of indication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pathological materials by indirect immunofluorescence method is shown. Indication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in microplates not only gains time, but also economize all components of essay.**

#### **Литература**

1. Байбиков, Т.З. Репродуктивно-респираторный синдром свиней / Т.З. Байбиков // Вет. врач. 2000. №2. С. 20-24.
2. Использование реакции непряой иммунофлюоресценции для обнаружения антител к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) / В.В. Куриннов, И.Ф. Вишняков, Е.А. Балашова [и др.] // Актуал. вопр. вет. вирусол.: матер. науч.-практ. конф. ВНИИВВиМ «Классическая чума свиней - неотложные проблемы науки и практики». Покров, 1995. С. 151-152.
3. Кукушкин, С.А. Особенности течения и вакцинопрофилактика репродуктивно-респираторного синдрома свиней в Российской Федерации: дис. ... канд. вет. наук / Кукушкин Сергей Анатольевич. Владимир, 2000. 176 с.
4. Кукушкин, С.А. Репродуктивно-респираторный синдром свиней (эпизоотология, диагностика, специфическая профилактика) / С.А. Кукушкин // Пром. и племенное свиноводство. 2006. №3. С. 60-61.
5. Мищенко, В.А. Состояние и перспективы исследований по репродуктивно-респираторному синдрому свиней / В.А. Мищенко // Актуал. вопр. вет. вирусол.: матер. науч.-практ. конф. ВНИИВВиМ «Классическая чума свиней - неотложные проблемы науки и практики». Покров, 1995. С. 148-151.
6. Суханова, О.В. Разработка средств и методов лабораторной диагностики репродуктивно-респираторного синдрома свиней: дис. ... канд. вет. наук. / Суханова Ольга Валентиновна. Покров, 1997.
8. A sensitive fluorescence in situ hybridization technique for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus / L.L. Chueh, K.H. Lee, C.R. Jeng, V.F. Pang // J. Virol. Methods. 1999. V.79, №2. P. 133-40.

**Т.Ю. Дегтяревская, Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова**

**К.Л. Мальцев, Научно-внедренческий центр Агроветзащита**

## **ПАТОМОРФОЛОГИЯ ЛЕГКИХ И ПЕЧЕНИ ПРИ ДИКТИОКАУЛЕЗЕ ОВЕЦ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ГЕЛЬМИЦИДОМ**

#### **Введение**

В последние годы созданы новые простые и общедоступные в применении лекарственные средства, обладающие широким спектром действия против гельминтов, со слабо выраженным побочным влиянием на организм животного. Гельминцид – новый препарат, произведенный «Научно-внедренческим центром Агроветзащита», разработанный на основе альбендазола и оксиклозанида. Это антигельминтик широкого спектра действия, активен в отношении половозрелых и не-

половозрелых нематод желудочно-кишечного тракта и легких, цестод. Препарат обладает выраженным трематодоцидным действием, губительно действует на все фазы развития *Fasciola* spp., *Paramphistomum* spp. и *Dicrocoelium lanceatum*. Обладая овоцидным действием, снижает зараженность пастбищных животных гельминтами.

Целью нашей работы явилось изучение микроморфологических изменений в органах мелкого рогатого скота после действия гельминцида.