

мира, в том числе и в России. При этом одним из важных элементов контроля РРСС до сих пор остается профилактическая

вакцинация животных, которая с каждым годом охватывает все большее поголовье свиней.

РЕЗЮМЕ

Проблема репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС) была и остается актуальной в большинстве стран мира, в том числе и в России. В течение последних 5 лет ежегодно более 30 государств являются неблагополучными по этому заболеванию. Одним из важных элементов контроля РРСС до сих пор остается профилактическая вакцинация животных, которая с каждым годом охватывает все большее поголовье свиней.

ABSTRACT

The PRRS was and still remains a burning problem for the most countries of the world including Russia. Within the last 5 years more than 30 countries are affected with the disease every year. One of the most important disease control measures remains the preventive vaccination which increasingly covers the swine population.

Литература

1. А.Л. Семенихин, И.Ф. Вишняков, В.А. Седов и др. Аборты свиноматок невыясненной этиологии в Курской области // Вопр. вет. вирусол., микробиол. и эпизоотол.: матер. науч. конф. ВНИИВВиМ. Покров, 1992. С. 244–246.
2. А.В. Щербakov, В.Ф. Ковалишин, В.А. Пыльнов и др. Генетическое разнообразие вируса РРСС // Актуал. пробл. инфекц. патол. ж-ных: матер. Междунар. науч. конф., посвящен. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». Владимир, 2003. С. 150–155.
3. В.А. Мищенко. Состояние и перспективы исследований по репродуктивно-респираторному синдрому свиней // Акт. вопр. вет. вирусол.: матер. науч.-практ. конф. ВНИИВВиМ «Классическая чума свиней-неотложные проблемы науки и практики» Покров, 1995. С. 148–151.
4. В.А. Мищенко, В.М. Авилов, В.М. Захаров и др. Репродуктивно — респираторный синдром свиней (“синее ухо”) // Ветеринария. 1994. № 9. С. 22–24.
5. И.А. Шевцов. Эпизоотологическая характеристика, диагностика и профилактика репродуктивно-респираторного синдрома свиней в Курской области: Автореф. дис....канд.вет.наук, Курск, 1999. 25 с.
6. Т.З. Байбиков, Н.С. Дудникова, И.Я. Курман и др. Эпизоотология, диагностика и специфическая профилактика репродуктивно-респираторного синдрома свиней // Соврем. аспекты вет. патол. ж-ных: матер. конф., посвящен. 40-летию ВНИИЗЖ. Владимир, 1998. С. 85–92.
7. R. Forsberg, M.B. Oleksiewicz, A.M. Petersen et al. A molecular clock dates the common ancestor of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus at more than 10 years before the emergence of disease // Virology. V. 289. 2001. P. 174–179.
8. S. Carman, S.E. Sanford, S. Dea. Antibodies to PRRS virus in serum banks of Ontario swine (1978–1982) // Proc. 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr. Bologna, Italy, 1996. P. 76.
9. W.T. Christianson H.S. Joo. Porcine reproductive and respiratory syndrome: A review // Swine Health and Production. 1994. V. 2, № 2. P. 10–28.
10. H. Grunert. Long term field evaluation of INGEL-VAC PRSS MLV against respiratory disease in fattening pigs // 3rd Int. Symp. on PRRS and Aujeszky Dis. Ploufragan, France, 1999. P. 265–266.
11. C.J. Nelsen, M.P. Murtaugh, K.S. Faaberg. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents // J.Virol. 1999. V. 73, № 1. P. 270–280.
12. V. Ohlinger. /PRRS / Blue Ear Disease / SIRS monthly newsletter // Pig Dis. Info. Center. Cambridge, 1992.
13. H. Hill, W. Owen, K. Eernisse et al. Prevalence of SIRS in Iowa swine herds // American Assoc. Swine Pract. Newslet. 1992. V. 4, P. 47.
14. S.E. Sanford, B. Nuhn. Reduced morbidity and mortality and improved days-to-market in piglets vaccinated with Ingelvac RespPRRS® in a PRRS endemic herd // Proc. 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr. Bologna, Italy, 1996. P. 77.

УДК 619:578.833.636.4.004.12

В.Л. Гаврилова, И.А. Тетерин, С.А. Кукушкин

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ВИРУСА РРСС

Введение

Репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС) — вирусная болезнь свиней, имеющая широкое распространение в мире и наносящая значительный экономический ущерб свиноводству. В настоящее время болезнь широко распространена на американском континенте, в Европе, в ряде стран Юго-Восточной Азии. В 2004

году появились сообщения о возникновении РРСС в Южной Африке [1, 2, 4, 5, 8, 9].

РРСС впервые был зарегистрирован в 1987 году в США и Канаде и с тех пор изучается учеными многих стран. В июле 1991 года был выделен возбудитель РРСС — РНК-содержащий вирус семейства Arteriviridae, в 1992 году были разработаны методы лабораторной диагностики, включа-

ющие серологические и молекулярно-биологические тесты, а с 1993 года разработаны и широко применяются различные вакцины против РРСС [1, 4, 6, 8].

Большое внимание уделяется выделению и изучению изолятов и штаммов вируса РРСС. Так, уже к 1999 году только в США и Канаде их насчитывалось более 400. Выделение изолятов вируса РРСС чаще проводят на культурах клеток, при этом наиболее чувствительными являются первичная культура альвеолярных макрофагов свиней и перевиваемая культура клеток Marc-145 [2, 8, 10].

Хотя вирус РРСС зарегистрирован в Европе и Северной Америке приблизительно в одно время, европейские и североамериканские изоляты вируса по генетическим и антигенным свойствам отличаются друг от друга и представляют собой генетически отделенные группы одного вируса, при этом идентичность этих групп на нуклеотидном уровне составила 55–70% [1, 10, 11]. Большинство изолятов вируса РРСС, выделенных на территории нашей страны, относятся к европейской геногруппе и уровень нуклеотидных различий между ними не превышает 17% [3].

В отдельных хозяйствах нашей страны были выделены изоляты, принадлежащие к американской генетической группе вируса, что обусловлено, скорее всего, завозом племенных животных из-за рубежа [4].

Целью нашей работы было изучение и сравнение иммунологических свойств известных штаммов «БД» и «КПР-96», принадлежащих к различным генетическим группам вируса РРСС.

Материалы и методы

В опытах использованы штаммы вируса РРСС «БД» 25 пассажа, «КПР-96» 23 пассажа на культуре клеток Marc-145, штамм «NVSL» (США), а также европейский эталонный штамм «Lelystad» (Нидерланды).

Титрование вируса РРСС проводили в пробирках с монослоем культуры клеток Marc-145, расчет титра производили по методу Рида и Менча.

Иммунобиологические свойства штам-

мов изучали на подсвинках 2-4-месячного возраста, массой 15–30 кг.

Сыворотки крови исследовали в иммуноферментном анализе с набором фирмы IDEXX (США) и в дифференцирующем наборе ИФА Ingezim фирмы Ingenasa (Испания), позволяющем различать антитела к европейскому и американскому генотипам вируса РРСС.

Результаты исследования

Культуральные свойства штаммов оценивали по срокам появления и максимального проявления цитопатического действия, а также по титру их инфекционности (табл. 1).

Как видно из табл. 1, штаммы отличаются по срокам проявления ЦПД и по интенсивности накопления вируса. Штамм «БД» вызывал ЦПД уже к концу первых суток после заражения им культуры клеток в виде округления клеток, объединения их в конгломераты, возвышающиеся над монослоем с последующим отслоением от стекла.

Цитопатическое действие штаммов «NVSL» и «Lelystad» наблюдалось на 3–4 сутки после заражения и было представлено наличием конгломератов из округлых и вытянутых в длину клеток. Конгломераты имели вид лучистых тяжей, возвышающихся над монослоем.

Максимальное проявление ЦПД в виде отслоения монослоя от стекла при заражении штаммом «Lelystad» происходило на 4–5 сутки. В культуре клеток, зараженной штаммом «NVSL», через 5–6 суток после внесения вируса наблюдали отслоение лишь отдельных клеток.

Штамм «КПР-96» на 4–5 сутки после заражения вызывал ЦПД, сходное с таковым у штаммов «NVSL» и «Lelystad». На 5–6 сутки после заражения происходило отслоение монослоя от стекла.

Штаммы американской генетической группы «NVSL» и «БД» имели титр вируса в культуре клеток Marc-145 6–7 lg ТЦД₅₀/мл что как минимум на 1.0 lg ТЦД₅₀/мл выше, чем у европейских штаммов «Lelystad» и «КПР-96».

Таблица 1

Культуральные свойства некоторых штаммов вируса РРСС

Генетическая группа	Штамм вируса	Сроки появления ЦПД, сутки	Максимальное проявление ЦПД, сутки	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /мл
Американская	NVSL	3-4	5-6	6,0±0,17
	БД	1-2	3-4	7,0±0,22
Европейская	Lelystad	3-4	4-5	5,0±0,1
	КПР-96	4-5	5-6	5,25±0,15

Таблица 2

Результаты экспериментального заражения поросят штаммами «Lelystad», «БД» и «КПР-96»

Штамм вируса	Характеристика вируса	№ животного	Повышение температуры тела		Клин. признаки			Пало
			сутки	гипертермия, °С	Ц	К.к.	К	
БД	культуральная суспензия с титром 10 ^{7,0} ТЦД ₅₀ /мл	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-
		4	-	-	-	-	-	-
		5	-	-	-	-	-	-
КПР-96	культуральная суспензия с титром 10 ^{5,25} ТЦД ₅₀ /мл	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-
		4	-	-	-	-	-	-
		5	2	40,5	-	-	-	-
		6	2-4	40,7	-	-	-	-
Lelystad	культуральная суспензия с титром 10 ^{5,0} ТЦД ₅₀ /мл	1	2	42,0	+	+	+	-
		2	2-3	41,4	+	+	+	-
		3	1	41,2	+	+	-	+
		4	2	41,6	+	+	+	+
		5	2-3	41,8	-	+	+	-
		6	1	40,5	-	+	-	-

Примечания: Ц — цианоз кожных покровов; К.к. — конъюнктивит; К — кашель; + регистрировали признак; - не наблюдали признак

Сравнительное изучение иммунологических свойств проводили на 17 серонегативных в отношении РРСС подсвинках. Штаммы «БД», «КПР-96» и «Lelystad» в виде культуральной суспензии животным вводили интраназально в объеме 10 см³. За животными вели ежедневное наблюдение с измерением температуры тела. Данные наблюдений представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, у поросят, зараженных штаммом «БД», гипертермию и клиническую картину болезни, характерную для РРСС, не регистрировали.

В результате введения штамма «КПР-96» вируса РРСС подсвинкам, у трех из шести животных наблюдали незначительное повышение температуры тела до 40,2–40,7° С на 2–4 сутки после заражения. Других клинических признаков болезни не наблюдали.

После заражения штаммом «Lelystad» через сутки у двух подсвинков регистрировали подъем температуры тела до 40,5–41,2° С, а на вторые сутки уже у четырех — до 41,2–42,0° С. У животных наблюдали синюшность ушей, подгрудка, серозно-катаральный конъюнктивит, кашель, при этом два подсвинка пали. На 5–6 сутки после заражения состояние четырех выживших животных нормализовалось.

Клиническое проявление болезни у подсвинков после заражения штаммом «КПР-96» проявлялось лишь незначительным повышением температуры тела у отдельных животных по сравнению со штаммом «Lelystad», что свидетельствует о слабой вирулентности этого штамма.

После заражения подсвинков штаммом «БД» клинических признаков болезни не наблюдали, а температура тела животных была в пределах физиологической нормы, что свидетельствует об авирулентности данного штамма.

Сравнение антигенной активности штаммов «БД», «КПР-96» и «Lelystad» проводили на 15 серонегативных в отношении РРСС подсвинках. Животных разделили на 4 группы по 3–6 голов и заражали внутримышечно или интраназально. От животных отбирали пробы крови до и спустя 14 и 21 сутки после заражения. Сыворотки крови исследовали в ИФА (IDEXX) (табл. 3).

Данные табл. 3 свидетельствуют, что на 14 сутки после внутримышечного введения штамма «БД» средний уровень антител в сыровотке крови поросят составил s/p 0,69±0,37 и к 21 дню возрос примерно вдвое и находился на уровне 1,2±0,25. При аналогичном способе введения штамма «КПР-96» средний уровень антител был выше и

Результаты изучения антигенной активности штаммов «БД» и «КПР-96» по сравнению с эталонным штаммом «Lelystad» вируса РРСС после иммунизации подсвинков

Штамм вируса	Метод и доза заражения	№ животного	Уровень антител в ИФА (IDEXX), s/p		
			до иммунизации	после иммунизации, сут.	
				14	21
БД	Внутримышечно, 5 мл с титром $10^{7,0}$ ТЦД ₅₀ /см ³	1	0,01	0,63	1,5
		2	0,02	0,29	0,8
		3	0,05	1,11	1,3
		4	0,08	0,48	1,0
		5	0,07	0,47	1,32
		6	0,06	1,2	1,19
	Среднее значение, М±S		0,05±0,02	0,69±0,37	1,2±0,25
КПР-96	Интраназально, 10 мл с титром $10^{5,25}$ ТЦД ₅₀ /см ³	10	0,07	0,44	1,5
		11	0,08	0,31	1,2
		12	0,09	0,6	1,8
	Среднее значение, М±S		0,08±0,01	0,45±0,14	1,5±0,24
	Внутримышечно, 5 мл с титром $10^{5,25}$ ТЦД ₅₀ /см ³	13	0,01	1,95	2,6
		14	0,03	1,71	1,9
		15	0,04	1,94	2,2
	Среднее значение, М±S		0,03±0,01	1,87±0,14	2,2±0,28
Lelystad	Интраназально, 10 мл с титром $10^{5,0}$ ТЦД ₅₀ /см ³	7	0,03	0,6	0,98
		8	0,05	0,4	0,78
		9	0,01	0,46	0,46
	Среднее значение, М±S		0,03±0,02	0,49±0,10	0,74±0,21

Примечание: значение ИФА (набор фирмы IDEXX) $\geq 0,4$ – положительная сыворотка

на 14 сутки составил $1,87 \pm 0,14$, а на 21 сутки достиг $2,2 \pm 0,28$. На 14 сутки после интраназального введения штамма «Lelystad» уровень антител у животных составлял $0,49 \pm 0,10$, а к 21 дню после инокуляции возрос до $0,74 \pm 0,21$.

Таким образом, штаммы «БД» и «КПР-96» обладают достаточной антигенной активностью независимо от пути введения вируса, по сравнению с эталонным штаммом вируса РРСС «Lelystad».

Генетическую принадлежность штаммов «БД» и «КПР-96» устанавливали исследованием сывороток крови после иммунизации подсвинков этими штаммами с помощью дифференцирующего набора ИФА Ingestim, фирмы Ingenasa (Испания), позволяющего различать антитела к европейскому и американскому типам вируса РРСС.

Для этого 8 серонегативных подсвинков разделили на две равные группы и внутримышечно иммунизировали культуральной суспензией штаммов «БД» и «КПР-96». Результаты исследований пред-

ставлены на рисунке.

Как видно из рисунка, у подсвинков, иммунизированных штаммом «БД», в первую очередь наблюдали прирост антител к американскому типу вируса РРСС, который составил на 14 день после иммунизации 0,49, на 21 день — 0,7 и к 35 дню достиг 1,0. Однако наряду с этим происходило постепенное увеличение уровня антител и к европейскому типу вируса, который был значительно ниже, но к 35 дню все животные были сероположительными к обоим типам вируса.

С другой стороны, после иммунизации подсвинков штаммом «КПР-96», показатель уровня антител к вирусу РРСС европейского генотипа уже через 21 день после вакцинации составил 0,74 и далее постепенно увеличивался.

Уровень антител к вирусу РРСС американского генотипа до 21 дня составлял 0,11 и не достигал положительного порога (s/p 0,37). Через 28 дней после иммунизации антитела были обнаружены у одного животного из четырех, при этом уровень антител составлял 0,47. На 35 день после иммуни-

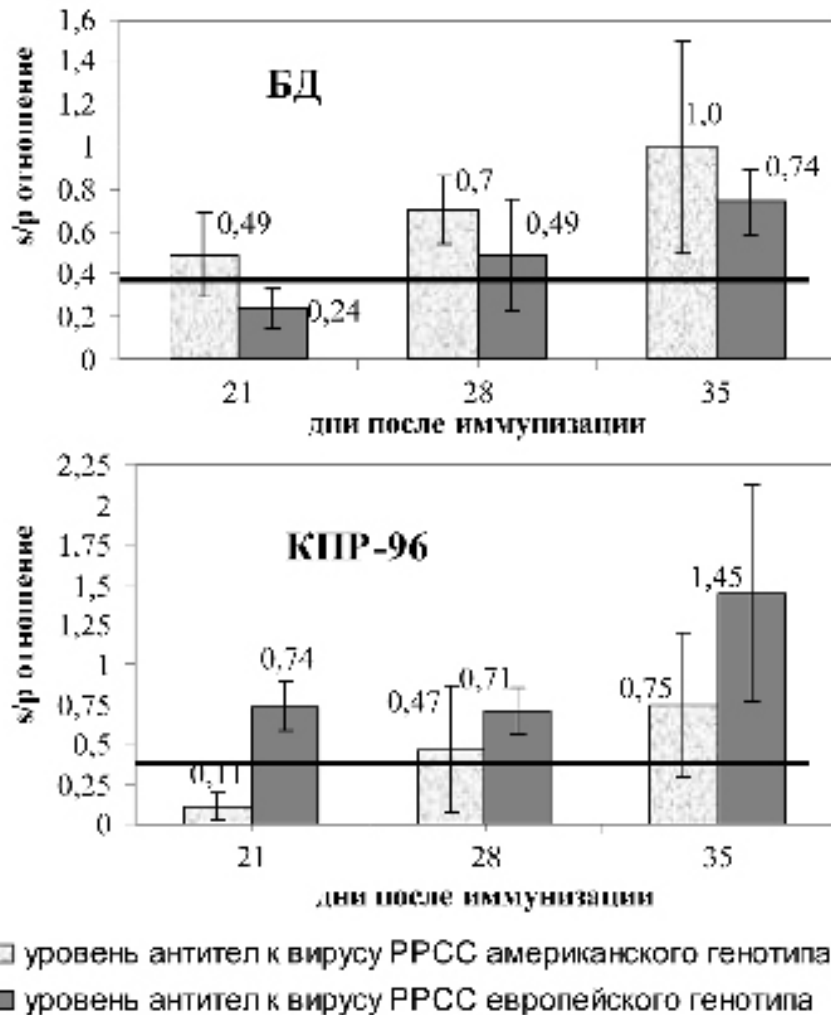


Рисунок. Динамика накопления антител к разным генотипам вируса PPRC после иммунизации поросят штаммами «БД» и «КПР-96»

зации повышение уровня антител наблюдали уже к обоим типам вируса, при этом средний показатель уровня антител к американскому генотипу составил 0,75.

Заключение

Штаммы вируса PPRC «БД» и «КПР-96» различаются между собой по культуральным свойствам, таким как сроки проявления ЦПД и титр накопления вируса в культуре клеток, а также по вирулентности для восприимчивых животных.

РЕЗЮМЕ

В статье приведены результаты сравнительного изучения иммунобиологических свойств штаммов вируса PPRC «БД» и «КПР-96». Полученные данные свидетельствуют о различии их по культуральным свойствам, степени вирулентности для восприимчивых животных, а также по уровню антител к разным генотипам вируса PPRC.

ABSTRACT

The data on comparative studies of the immunobiological properties of the "BD" and "KPR-96" PRRSV strains are demonstrated. The obtained results indicate their difference in cultural characteristics, virulence degree for the susceptible animals and in the antibody level against different PRRSV genotypes.

Литература

1. Т.З. Байбиков. Репродуктивно-респираторный синдром свиней // Вет. врач. 2000. № 2. С. 20–24.
2. Н.С. Дудникова, В.А. Пыльнов, Е.В. Гусева и др. Выделение вируса РРСС и его адаптация к перевиваемой линии клеток MARC-145 // Ветеринария. 2002. № 6. С. 23–25.
3. А.В. Щербakov, В.Ф. Ковалишин, В.А. Пыльнов и др. Генетическое разнообразие вируса РРСС // Актуал. пробл. инфекц. Патол. ж-ных: матер. Междунар. науч. конф., посвящен. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». Владимир, 2003. С. 150–155.
4. К.Н. Груздев, Т.З. Байбиков, С.А. Кукушкин. Мониторинг экономически значимых инфекционных болезней свиней в России // Пробл. инфекц. патологии свиней: матер. Всерос. вет. Конгр. М., 2006. С. 29–34.
5. И.Я. Курман. Разработка технологии изготовления и контроля ассоциированной инактивированной вакцины против репродуктивно-респираторного синдрома и парвовирусной инфекции свиней: дис. ... канд. вет. наук Владимир, 2001.
6. В.А. Мищенко, Е.В. Гусева. Экологические особенности вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней // Пробл. инфекц. Патол. ж-ных: тез. докл. конф., посвящен. 100-летию открытия вируса ящура. Владимир, 1997. С. 100.
7. В.А. Мищенко, В.М. Захаров, А.А. Гусев и др. Репродуктивно-респираторный синдром свиней — новая болезнь // Курской биофабрике и агро-биологической промышленности-100 лет: тез. докл. Курск, 1996. С. 217.
8. A. Botner. Diagnosis of PRRS // Vet. Microbiol. 1997. V. 55, № 1–4. P. 295–301.
9. <http://www.oie.int>
10. M.P. Murtaugh, K.S. Faaberg. Genetic variation in vaccine and field PRRS virus // 3rd Int. Symp. PRRS and Aujeszky's Dis. Ploufragan, France, 1999. P. 41.
11. R. Forsberg, T. Storgaard, H. Nielsen et al. The genetic diversity of European type PRRSSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe // Virology. 2002. V. 299. P. 38–47.

УДК 619:616.98:578.835.1:616-079.4

Н.С. Абид

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ТРАНСМИССИВНОГО ГАСТРОЭНТЕРИТА СВИНЕЙ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Введение

Гастроэнтериты поросят широко распространены в странах с развитым свиноводством. Наибольшее значение в развитии кишечных заболеваний имеют вирусы трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГЭС), эпидемической диареи свиней (ЭДС) и ротавирус свиней (РВС). В силу того, что заболевания, вызываемые данными вирусами, имеют сходные клинические признаки, окончательный диагноз может быть поставлен только на основании лабораторных тестов, позволяющих дифференцировать эти вирусы друг от друга.

Наибольшую актуальность из названной группы вирусов, благодаря его высокой вирулентности, представляет вирус ТГЭС. В естественных и экспериментальных условиях вирусом ТГЭС заражаются свиньи всех возрастных групп. Но наиболее чувствительны к вирусу поросята до 10-дневного возраста [3]. ТГЭС широко распространен в мире. Вспышки заболевания были отмечены в Японии, Канаде и во многих странах Европы, в том числе и в России [1], и во всех случаях был причинен значительный экономический ущерб. Особую проблему данная инфекция создает на

крупных свиноводческих комплексах, где гибель новорожденных поросят может достигать 100% [2]. Поэтому своевременное выявление вируса необходимо для успешной борьбы с заболеванием и профилактики ТГЭС.

Целью исследования явилась разработка метода на основе ПЦР, позволяющего выявлять вирус ТГЭС в материале от свиней.

Материалы и методы

Нуклеотидные последовательности генов вирусов ТГЭС, ЭДС, РВС и респираторного коронавируса свиней (РКВС) были получены из компьютерной базы данных GenBank. Анализ последовательностей и выбор праймеров проводили с помощью пакета программ «BioEdit Sequence Alignment Editor» (Hall T.A., версия 7.0.5.2, 2005) и программы «OLIGO» (версия 4.0).

В работе были использованы 32 образца патологического материала от поросят с признаками диареи из различных хозяйств РФ и следующие штаммы вирусов:

- вирулентный культуральный штамм «Ленинградский» вируса ТГЭС, депонированный во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов,