

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. Щербаков, 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 агробиологической 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,

используемых в ветеринарии и животноводстве (ФГУ ВГНКИ) под регистрационным номером «Ленинградский-ВНИИЗЖ-ДЕП», титр вируса 10^8 ТЦД₅₀/мл;

- аттенуированный культуральный штамм «Краснодонский» вируса ТГЭС, депонированный во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве (ФГУ ВГНКИ) под регистрационным номером «Краснодонский-ВНИИЗЖ-ДЕП», титр вируса 10^8 ТЦД₅₀/мл;

- производственный модифицированный культуральный штамм «КР-47» ротавируса свиней, депонированный во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве (ФГУ ВГНКИ) под регистрационным номером «КР-47-ВНИИЗЖ-ДЕП», титр вируса 10^8 ТЦД₅₀/мл.

Суммарную РНК из культуральной вирусодержащей суспензии и патологического материала от животных проводили по методу Грибанова О.Г. с соавт. [4].

Обратную транскрипцию проводили в течение 30 мин при 42° С в объеме 25 мкл, содержащем 3 мкл раствора РНК, по 10 пмоль праймеров (ЗАО «Синтол», Москва), 5 мкл 5х буфера («Promega», США), по 1мМ каждого dNTP, 1,25 ед. обратной транскриптазы из вируса миелобластоза птиц и деионизированную воду до конечного объема.

Первый этап ПЦР (амплификацию) осуществляли в реакционной смеси следующего состава: 3мкл кДНК, по 10 пмоль праймеров, 3 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого dNTP, 1,25 ед. Taq ДНК-полимеразы, 2,5 мкл 10х буфера для Taq-полимеразы и деионизированную воду до объема 25 мкл. Тридцать циклов амплификации проводили при следующих температурных режимах: 30 сек при 94° С, 30 сек при 60° С и 1 мин при 72° С с конечной элонгацией в течение 2 мин при 72° С.

Продукты амплификации (по 3 мкл) использовали в качестве матрицы для второго этапа ПЦР (реамплификации). Реакционная смесь имела тот же состав. Двадцать пять циклов реамплификации проводили при следующих температурных режимах: 30 сек при 94° С, 30 сек при 60° С и 30 сек при 72° С с конечной элонгацией в течение 2 мин при 72° С.

Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Результаты и обсуждение

Вирус ТГЭС относится к семейству ко-

ронавирусов, поэтому при разработке метода его идентификации необходимо было провести сравнительный анализ генома вируса ТГЭС и других представителей данного семейства, способных инфицировать свиней, во избежание появления неспецифических реакций.

Прежде всего, вирус ТГЭС проявляет близкое антигенное и генетическое родство с РКВС, который является природным мутантом вируса ТГЭС с делецией в гене S (размер делеции 673–682 нуклеотида). Сообщения о нем появились в 1983–1984 гг. в Европе и в 1988 г. — в США [7]. Вирус РК-ВС реплицируется в эпителии как респираторного, так и пищеварительного тракта и вызывает респираторные инфекции в легкой или субклинической форме. Считается, что благодаря РКВС значительно сократились вспышки ТГЭС в европейских странах в конце 80-х годов XX века [5]. Этот вариант вируса ТГЭС стали использовать в некоторых странах для иммунизации свиней против ТГЭС [6]. Кроме того, к семейству коронавирусов относится также вирус ЭДС, который вызывает клиническую картину, сходную с заболеванием, обусловленным вирусом ТГЭС. В геноме этих вирусов имеются участки с высокой гомологией. Поэтому необходимо было также проанализировать последовательности генома вируса ЭДС во избежание ложноположительных результатов.

Поскольку геномы вирусов ТГЭС и РКВС отличаются в основном делецией 673-682 нуклеотидов в 5'-области гена S, решено было для подбора праймеров использовать участки, фланкирующие данную делецию. Сюда входят 3'-область гена P₀ и 5'-область гена S. Всего было проанализировано 30 последовательностей штаммов вируса ТГЭС, 17 последовательностей штаммов РКВС и 5 последовательностей штаммов вируса ЭДС. Выбор праймеров был основан на принципе наибольшей комплементарности консервативным участкам генома вирусов ТГЭС и РКВС и, одновременно, наименьшей комплементарности аналогичным участкам генома вируса ЭДС.

В результате анализа было выбрано и синтезировано 6 праймеров, специфичных для вируса ТГЭС и РКВС (табл. 1, рис. 1).

Для оптимизации методики были использованы штаммы вируса ТГЭС «Ленинградский» и «Краснодонский», выделенные во время вспышек ТГЭС в хозяйствах Ленинградской и Краснодарской областей, соответственно. Были проверены различ-

Нуклеотидные последовательности праймеров

Наименование праймеров	Первичная структура праймеров	Локализация праймеров*
S3420298	5' -AGGGTAAGTTGCTCATTAGAAATAATGGTAAGTT-3'	20298-20331
S321782	5' -СТААТТТАССАСТААССААССГТГГАГСТАТА-3'	21216-21247
S31935	5' -АААААТТАТТТГТГГТТТТГГТТГТААТГСС-3'	20369-20399
S341693	5' -GTGTAGTAAAAACATTAGCCACATAACTAGCACA-3'	21127-21160
S3320180	5' -GCTCTATCACATAACTCAGTCCTAGACACTCCT-3'	20180-20212
S311829	5' -СТАГГГАСТГСССАТААГСААТТААСТААТА-3'	21263-21293

*: соответствует нуклеотидной последовательности штамма вируса ТГЭС Purdue (номер доступа в GenBank NC_0023 06)

ные комбинации праймеров для обратной транскрипции, амплификации и реамплификации. Две комбинации, позволяющие получить наиболее специфичные фрагменты, в дальнейшем использовались в методике. Для обратной транскрипции и амплификации наиболее удачной оказалась комбинация праймеров S3420298 и S321782, а для реамплификации — S31935 и S341693. Ожидаемая длина фрагментов продукта амплификации составила 950 п.н. для вируса ТГЭС и 235–244 п.н. для РКВС. В реамплификации ожидаемая длина фрагментов составила 792 п.н. для вируса ТГЭС и 104–113 п.н. для РКВС. Таким образом, благодаря тому, что праймеры были подобраны к участкам, ограничивающим область делеции, имеется потенциальная возможность дифференцировать вирусы ТГЭС и РКВС по длине амплифицируемого фрагмента.

Размеры продуктов, полученных в ходе ПЦР штаммов вируса ТГЭС «Ленинградский» и «Краснодонский», соответствовали расчетным для вируса ТГЭС.

В серии экспериментов были оптимизированы условия реакций: концентрация

ионов магния, концентрация праймеров, температурные режимы ПЦР.

Для подтверждения специфичности разработанной методики, ее проверили на материалах, содержащих гетерологичные вирусы — ротавирус свиней (штамм «КР-47») или вирус эпидемической диареи свиней (в патологическом материале от поросят с диареей). При этом ложноположительных результатов не наблюдалось, что подтверждает специфичность методики.

Аналитическую чувствительность метода определяли, используя последовательные десятикратные разведения препаратов, содержащих штаммы вируса ТГЭС «Ленинградский» и «Краснодонский» с известным исходным титром. Согласно проведенным измерениям, метод был способен выявлять вирус ТГЭС с титром 2,0 lg ТЦД₅₀/мл (для штамма «Ленинградский») и 3,0 lg ТЦД₅₀/мл (для штамма «Краснодонский»).

С использованием разработанного метода было исследовано 32 образца патологического материала от поросят с признаками диареи. Однако ни в одном случае вируса ТГЭС выявлено не было. Следует от-

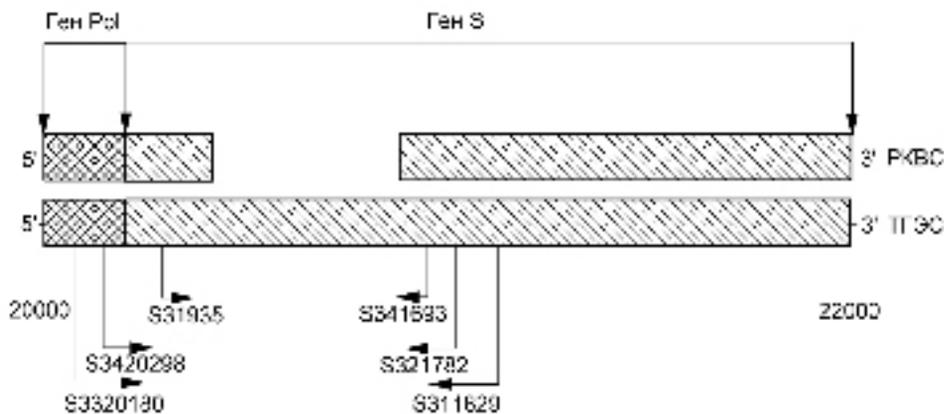


Рисунок 1. Расположение праймеров на геноме вирусов РКВС и ТГЭС.

Нумерация нуклеотидов соответствует нуклеотидно последовательности штамма вируса ТГЭС Purdue

метить, что инфекция, вызываемая вирусом трансмиссивного гастроэнтерита, в России имеет ограниченный характер в отличие от, например, ротавирусной инфекции свиней, которая широко распространена в хозяйствах страны. Кроме того, на присутствие ТГЭС было исследовано относительно небольшое количество образцов.

В настоящее время мы не имеем возможности проверить данную методику для выявления респираторного коронавируса свиней, однако достаточно большое количество проанализированных последовательностей генома РКВС позволяет надеяться, что разработанный метод будет успешно выявлять и этот вирус и дифферен-

РЕЗЮМЕ

Разработан метод выявления вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней на основе полимеразной цепной реакции. Метод позволяет дифференцировать вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней от респираторного коронавируса свиней по длине амплифицируемого фрагмента.

ABSTRACT

Porcine transmissible gastroenteritis virus detection assay using polymerase chain reaction was developed. The method allows to differentiate porcine transmissible gastroenteritis virus from porcine respiratory coronavirus by the length of the amplified fragment.

Литература

1. Т.И. Алипер, В.Ф. Васильев, В.А. Сергеев. Персистенция вируса и эпизоотологическая опасность реконвалесцентов при ТГС // Ветеринария. 2001. № 5. С. 16–21.
2. А.Н. Гречухин. Эпизоотология вирусного (трансмиссивного) гастроэнтерита свиней в свиноводческих комплексах с промышленной технологией // Инфекционные бол. с.-х. ж-ных.: Сб. науч. тр. Л., 1988. С. 37.
3. Г.Е. Ирская. Локализация вируса трансмиссивного гастроэнтерита в органах поросят при экспериментальном заражении // Инфекционные и инвазионные заболевания с.-х ж-ных и птиц: Сб. науч. тр. Персиановка, 1993. С. 7–11.
4. О.Г. Грибанов, А.В. Щербаков, Н.А. Перевозчикова и др. Простой метод выделения и очистки РНК // Биооргани. химия. 1997. Т. 23, № 29. С. 763–765.
5. M. Pensaert, E. Cox, K. van Deem et al. A sero-epizootiological study of porcine respiratory coronavirus in Belgian swine // Vet Q. 1993. V.1, № 5. P. 16–20.
6. E. Cox, M.B. Pensaert, P. Callebaut. Intestinal protection against challenge with transmissible gastroenteritis virus of pigs immune after infection with the porcine respiratory coronavirus // Vaccine. 1993. V. 11, № 2. P. 267–272.
7. H. Laude, K.V. Reeth, M. Pensaert. Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions // Vet. Res. 1993. V. 24. P. 125–150.

УДК 619:578.825.1.31:573.6.086.83:57083.3

А.С. Оганесян

РАЗРАБОТКА НЕПРЯМОГО ВАРИАНТА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИТРА АНТИТЕЛ К ВИРУСУ БОЛЕЗНИ АУЕСКИ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ СВИНЕЙ

Введение

Болезнь Ауески — контагиозная вирусная болезнь сельскохозяйственных животных всех видов, пушных зверей и грызунов, характеризующаяся поражением центральной нервной системы и органов дыхания. Вызывается вирусом семейства Herpesviridae, рода Varicellavirus. Признаки заболевания у свиней зависят от возраста животных и патогенных свойств вируса. Летальный исход болезни в естествен-

ных условиях чаще всего наблюдают у поросят-сосунов и группы отъема. Инфицирование взрослых свиней обычно не приводит к гибели животного, но сопровождается длительным или пожизненным вирусносительством. У свиноматок часто наблюдают рождение мертвых, мумифицированных плодов или аборт на разных сроках супоросности.

Выводы

Таким образом, разработанная специфичная и чувствительная методика позволяет выявлять вирус ТГЭС в исследуемых пробах и может быть использована для исследования образцов патологического материала от свиней вируса ТГЭС, что, на наш взгляд, важно и является необходимым мероприятием, поскольку своевременная постановка диагноза дает возможность принять меры для предотвращения распространения инфекции и избежать больших экономических потерь, причиняемых этим заболеванием.