

*На правах рукописи*

Булгаков Александр Дмитриевич

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ОСНОВНЫХ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ  
ИНФЕКЦИЙ В СВИНОВОДЧЕСКИХ ХОЗЯЙСТВАХ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с  
микотоксикологией и иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук

Москва– 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И.Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Алипер Тарас Иванович**

**Официальные оппоненты:**

**Сидорчук Александр Андреевич** - доктор ветеринарных наук, профессор, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К. И. Скрябина, заведующий кафедрой эпизоотологии и организации ветеринарного дела.

**Черных Олег Юрьевич** - доктор ветеринарных наук, Государственное бюджетное учреждение Краснодарского края «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория», директор.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности».

Защита диссертации состоится «\_\_\_»\_\_\_\_\_2019 г. в «\_\_\_» часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1, тел. (495) 970-03-67.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН <http://www.viev.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_»\_\_\_\_\_2019 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук

**Ездакова Ирина Юрьевна**

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**1.1. Актуальность темы.** Вирусные респираторные болезни свиней (ВРБС) широко распространены во всем мире, включая Россию. Чаще всего они встречаются у поросят 2-4-месячного возраста, при этом заболеваемость может достигать 70%, летальность - 40% (Б.Г. Орлянкин, 2010, 2016). Эти показатели зависят от многих факторов, в том числе: размеров хозяйства, соблюдения санитарных норм и правил, особенностей кормления, технологии производства, иммунного статуса животных и вирулентности возбудителя (Б.Л. Белкин, 2007; С.И. Прудников, 2007; S.H. Done, 2002). Согласно современной классификации (Орлянкин, 2010) к основным (первичным) возбудителям ВРБС, способным самостоятельно вызывать болезнь с теми или иными клиническими признаками относят: вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней (вирус РРСС), цирковироз свиней второго типа (ЦВС-2), вирус гриппа А (ВГА), респираторный коронавирус свиней (РКВС), вирус болезни Ауески (ВБА). Ассоциация ЦВС-2 с вирусом РРСС, наряду с вовлечением в инфекционный процесс респираторных бактериальных патогенов, таких как *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* играет главную роль в развитии респираторного симптомокомплекса у свиней, значительно утяжеляя течение болезни (G.M. Allan, 2000; M. Kiupel, 1999). Диагностика ВРБС основана на выделении возбудителя, выявлении его генома или специфических антител (Б.Г. Орлянкин, 2005; А.А. Шевцов, 2008). Для этих целей чаще всего используются различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА). Специфическую профилактику ВРБС проводят моно- и поливалентными вакцинными препаратами (Б.Г. Орлянкин, 2005), однако появление в хозяйстве генетически измененного штамма вируса, отличающегося по биологическим свойствам от типового, может приводить к ее неэффективности. Диагностику и специфическую профилактику РРСС и гриппа А проводят согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения животных (ОИЕ, 2012) в

список которой они входят. Глобальное распространение РРСС и гриппа А, увеличение генетического разнообразия вирусов, явная их эволюция, сопровождающаяся появлением и распространением высоковирулентных штаммов, вызывает большую озабоченность у международного сообщества.

Поскольку снижение распространенности ВРБС остается одной из приоритетных задач для отечественного свиноводства, то в этой связи на первое место выходит необходимость проведения комплексных диагностических и мониторинговых исследований, включающих определение молекулярно-биологических свойств изолятов вирусов, циркулирующих на территории Российской Федерации.

**1.2. Степень разработанности темы исследования.** В нашей стране вирус РРСС европейского генотипа (вирус РРСС-1) впервые выделен и идентифицирован в 1999 г. в НПО «НАРВАК» из патологического материала новорожденных поросят на одном из свинокомплексов Омской области во время вспышки заболевания (Б.Г. Орлянкин, 2010). Были изучены иммунобиологические свойства выделенного штамма в сравнении с американским штаммом «NADC-8» и эталонным европейским штаммом «Lelytstad» вируса РРСС, разработана тест-система для детекции генома американского и европейского генотипов вируса РРСС методом ОТ-ПЦР, технология получения рекомбинантных нуклеокапсидных белков и непрямой твердофазный ИФА, предназначенный для выявления антител к вирусу РРСС (К.П. Алексеев, 2004; А.Н. Власова, 2003; М.А. Соколов, 2004). Результаты многолетних исследований по молекулярно-генетическому анализу и определению функционально значимых генетических мутаций вируса РРСС были обобщены в докторской диссертации Т.В.Гребенниковой (2005). Результаты исследований специалистов НПО «НАРВАК», проведенных в отношении ЦВС-2, обобщены и представлены в ряде публикаций (Б.Г. Орлянкин, 2011; М.А. Шкаева, 2006). Разработанная в те годы методология изучения вируса РРСС и ЦВС-2, являющаяся основой для проведения исследований и в настоящее время, использована в данной работе.

Известны исследования С.А. Кукушкина (2009), направленные на изучение эпизоотической ситуации по РРСС в России, особенностей клинко-эпизоотологического проявления репродуктивной, респираторной и атипичной форм РРСС при остром, хроническом и ассоциированном течении заболевания в хозяйствах различного типа и направления. В диссертационной работе Ю.Г. Крысенко (2012) продемонстрирован комплексный подход к изучению патогенеза цирковиральной инфекции свиней, на практике показана диагностическая эффективность методов ИФА и ПЦР анализа, научно обоснованы и экспериментально подтверждены схемы применения рекомбинантных вакцин, позволяющие в короткие сроки снизить заболеваемость и, соответственно, повысить сохранность и среднесуточные привесы поросят. Подавляющее большинство работ, посвященных ВГА, затрагивает изучение генетической неоднородности вируса, вызывающего грипп у человека и птиц. Среди последних известны результаты исследований в области эволюции высоковирулентного штамма вируса гриппа А (H5N1) в экосистемах Северной Евразии (2005 – 2009 гг.), проведенных М.Ю. Щелкановым с соавтр. и обобщенных им в докторской диссертации (2010). В отношении гриппа свиней новых разработок в нашей стране практически нет, а немногочисленные публикации носят обзорный характер.

**1.3. Цель и задачи исследования.** Целью работы являлась оценка распространенности основных вирусных респираторных патогенов свиней (вирус РРСС, ЦВС-2, вирус гриппа А) и анализ их генетической вариабельности в хозяйствах различных регионов России. Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Определить распространенность вируса РРСС, ЦВС-2 и вируса гриппа А на территории свиноводческих хозяйств различных регионов Российской Федерации;
2. Провести филогенетический анализ изолятов вируса РРСС и ЦВС-2, циркулирующих на территории нашей страны в последние годы;
3. Провести типирование изолятов ВГА, выявленных на территории различных регионов РФ;

4. Разработать тест-систему на основе ПЦР для выявления цирковируса свиней генотипа 2b (ЦВС-2b) и определить ее основные диагностические параметры.

**1.4. Научная новизна работы.** Получены новые обобщённые данные о распространенности вируса РРСС-1, ЦВС-2 и вируса гриппа А в форме моно- и смешанных инфекций в свиноводческих хозяйствах ряда регионов России в 2004-2017 гг. Впервые проведен обобщенный анализ генетической variability вируса РРСС-1 и ЦВС-2, циркулирующих на территории России в 2012-2017 гг. Экспериментально доказано наличие двух генетических групп внутри 1-го субтипа вируса РРСС-1. Одна из них является общей генетической группой вируса РРСС-1 для российских и западноевропейских изолятов, вторая генетическая группа данного вируса - характерна только для нашей страны. Идентифицированы три генотипа ЦВС-2, различающиеся по своим молекулярно-биологическим свойствам; впервые в свиноводческих хозяйствах на территории Российской Федерации выявлены генотипы ЦВС-2b и ЦВС-2d. Анализ распространения подтипов вируса гриппа А показал, что в последние годы в свиноводческих хозяйствах РФ циркулируют три подтипа ВГА: Н1N2, Н2N3 и Н3N8.

**1.5. Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты исследований вносят вклад в эпидемиологию вирусных инфекций и производство биологических препаратов, включая вакцины и диагностикумы. Установленная гетерогенность вируса РРСС и ЦВС-2 свидетельствует о необходимости постоянного эпизоотологического мониторинга инфекций и возможной неэффективности применяемых средств специфической профилактики ВРБС. Разработана и утверждена нормативно-техническая документация для «Тест-системы для выявления цирковируса свиней II типа подтипа b методом полимеразной цепной реакции» (СТО-00496165-0001-2018).

**1.6. Методология и методы исследования.** Работа выполнена с использованием современного оборудования и широкого спектра иммунохимических и молекулярно-биологических методов, включающих в себя

иммуноферментный анализ, реакцию торможения гемагглютинации, полимеразную цепную реакцию и секвенирование генов продуктов ПЦР. Для обеспечения достоверности и объективности использованы статистические и математические методы обработки данных.

### **1.7. Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Оценка распространенности основных вирусных респираторных патогенов свиней (вирус РРСС, ЦВС-2, вирус гриппа А) в форме моно- и смешанных инфекций на территории свиноводческих хозяйств различных регионов РФ.

2. Результаты филогенетического анализа изолятов вируса РРСС и ЦВС-2, циркулирующих на территории России.

3. Результаты серотипирования вируса гриппа А, обнаруженного в хозяйствах нескольких регионов РФ.

4. Результаты разработки и испытания диагностической тест-системы ПЦР, сконструированной на основе консервативной последовательности ORF 2 цирковируса и предназначенной для выявления ЦВС-2b в биологическом материале свиней.

**1.8. Личный вклад автора.** Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Отдельные этапы работы проводились совместно с сотрудниками АНО «НИИ ДПБ» к.б.н. А.Г. Южаковым и М.А. Арутюновой, которым автор выражает свою искреннюю благодарность.

**1.9. Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов подтверждается достаточным количеством наблюдений, современной методологией, сертифицированным оборудованием, соответствующим поставленным задачам исследования. Материалы диссертационной работы доложены на VI – VII Международных ветеринарных конгрессах (г. Сочи, 2016 г., г. Уфа, 2017 г.), заседаниях Ученого Совета и межлабораторной методической комиссии ФГНБУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И.Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (2017 - 2018 гг.).

**1.10. Публикации результатов исследований.** По результатам диссертации опубликовано 5 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК Миннауки РФ для докторских и кандидатских диссертаций.

**1.11. Объём и структура диссертации.** Материалы диссертации изложены на 111 страницах машинописного текста и содержат: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы и приложения. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 4 рисунками. Список литературы включает 113 источников, в том числе 52 отечественных и 61 зарубежных авторов.

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Материалы и методы**

**Биологический материал для исследований.** В работе использовали образцы сыворотки крови свиней (18605 проб) и патологического материала от павших и вынужденно убитых свиней (109 проб), полученные из 68 свиноводческих хозяйств 34 регионов РФ и двух сопредельных государств (Республика Белоруссия; Республика Казахстан) в период 2004-2017 гг.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** Выявление нуклеиновых кислот вирусов в биологическом материале проводили методом ПЦР с использованием коммерческих наборов производства ООО "Ветбиохим" (Россия): «Тест-система для обнаружения цирковируса свиней II типа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)»; «Тест-система для обнаружения респираторно-репродуктивного синдрома (PPCC) свиней методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)»; «Тест-система для обнаружения вируса гриппа А методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Реакцию проводили по рекомендациям производителя, результаты ПЦР анализировали методом электрофореза в агарозном геле.

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** Выявление сывороточных вирус-специфических антител проводили методом ИФА с использованием соответствующих наборов производства ООО "Ветбиохим" (Россия): «Набор реагентов для выявления антител к цирковирусу свиней второго типа (ЦВС-2)

иммуноферментным методом «ЦИРКО-СЕРОТЕСТ»; «Набор для выявления антител к вирусу репродуктивного и респираторного синдрома свиней иммуноферментным методом «PPCC-СЕРОТЕСТ плюс»; «Набор для выявления антител к вирусу гриппа А иммуноферментным методом «ГРИПП А-СЕРОТЕСТ» согласно утвержденным инструкциям по их применению.

**Реакция торможения гемагглютинации (РТГА).** Для типирования антител к вирусу гриппа А использовали «Набор антигенов и сывороток для диагностики гриппа птиц в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) производства ОАО "Покровский Завод Биопрепаратов" (Россия). Реакцию проводили общепринятым методом, согласно МУ 3.3.2.1758-03, в строгом соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

**Секвенирование генов вирусов.** Исходную нуклеотидную последовательность генов вирусов определяли по методу Сэнгера прямым секвенированием накопленного ПЦР - продукта с использованием BigDye Termination Cycle Sequencing Kit согласно инструкции фирмы производителя. Электрофорез ДНК осуществлялся на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystem, США).

При построении филогенетических дендрограмм нуклеотидные последовательности, взятые из базы данных NCBI GenBank, были выровнены с помощью программы MEGA7.1. Для построения филогенетических деревьев также использовали программу MEGA7.1. Определение нуклеотидных последовательностей генов вирусов осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 («Applied Biosystem», США) согласно рекомендациям производителя.

**Статистическая обработка результатов.** При анализе и статистической обработке результатов применяли программу «Microsoft Excel», входящую в пакет программ «Microsoft office, 2010».

## 2.2. Результаты исследования

### 2.2.1 Оценка распространенности и анализ генетической variability вируса РРСС в свиноводческих хозяйствах РФ

На первом этапе работы был проведен ретроспективный анализ результатов исследования 10419 образцов сыворотки крови свиней, полученных за период с 2004 по 2011 гг. из 68 свиноводческих хозяйств 34 регионов РФ и 93 образцов из 3 хозяйств двух сопредельных с Россией государств. Установлено, что общее количество серопозитивных к вирусу РРСС животных в свиноводческих хозяйствах РФ составило 13,4%, а в хозяйствах сопредельных государств – 16,1 % соответственно. Вместе с тем следует отметить, что в ряде хозяйств этот показатель был значительно выше: 16,7 – 63,4%.

При проведении исследований проб сыворотки крови, отобранных в период 2012-2017 гг., были получены сопоставимые результаты. Так вирус-специфические антитела были выявлены в 13 из 14 обследованных свиноводческих хозяйств 9 из 10 регионов РФ при 12,7%-ном количестве серопозитивных животных; циркуляцию вируса РРСС в хозяйствах подтверждали методом ПЦР (табл.1).

Таблица 1 – Результаты исследования сыворотки крови свиней на наличие РНК вируса РРСС и вирус-специфических антител

Регион №	Название области	Количество хозяйств	Всего проб	Положительные пробы			
				ИФА		ПЦР	
				Количество	%	Количество	%
1	Московская	2	651	300	46,1	109	16,8
2	Томская	2	353	130	36,8	120	34
3	Свердловская	2	4921	466	9,5	76	1,5
4	Тюменская	2	52	15	28,8	28	53,8
5	Алтайский кр.	1	303	4	1,3	96	31,7
6	Нижегородская	1	20	13	65,0	17	85
7	Брянская	1	13	10	76,9	9	59,2
8	Бурятия	1	1447	53	3,7	24	1,7
9	Белгородская	1	96	8	8,3	0	0
10	Респ.Татарстан	1	37	0	0	0	0
Всего		14	7893	999	12,7	479	6,1

В большинстве случаев наличие вирус-специфических антител сопровождалось детекцией РНК вируса, а процентное соотношение серопозитивных свиней и животных-вирусоносителей положительно коррелировало со стадией заболевания и временем заноса вируса в хозяйство. В 3 хозяйствах были выявлены серонегативные свиньи, пробы от которых были положительны в ПЦР, что свидетельствовало о ранней стадии инфицирования животных.

Результаты исследования патологического материала свиней показали, что вирус РРСС в большинстве случаев локализовался в лимфатических узлах (преимущественно паховых) и легких – 52% и 50% от общего количества положительных проб, реже – в печени и селезенке (35,3% и 23,1% соответственно).

Для анализа генетической variability вируса РРСС и молекулярно-биологических свойств его изолятов, циркулирующих в свиноводческих хозяйствах РФ, все пробы в которых выявили РНК вируса, были исследованы методом секвенирования фрагментов генома (рис.1).

Филогенетический анализ показал, что изоляты вируса РРСС-1 из Тюменской, Свердловской, Московской и Нижегородской областей, образуют с известными ранее последовательностями вируса РРСС европейского типа 1-го субтипа одну общую генетическую группу. В данной группе представлены полевые изоляты, выделенные на территории Франции, Дании, Испании, США, Южной Кореи, Бельгии и Польши с 1998 до 2016 гг. Изоляты вируса РРСС-1 из Алтайского края, Брянской и Томской областей, а также Республики Бурятия вместе с ранее выделенными изолятами из РФ образуют отдельную генетическую группу внутри 1-го субтипа вируса РРСС-1. В обследованных хозяйствах не было обнаружено изолятов вируса РРСС-1 относящихся к субтипам 2 и 3 и характеризующихся высокой степенью вирулентности, хотя их циркуляция на территории России была ранее установлена (А. Yuzhakov et al., 2017).

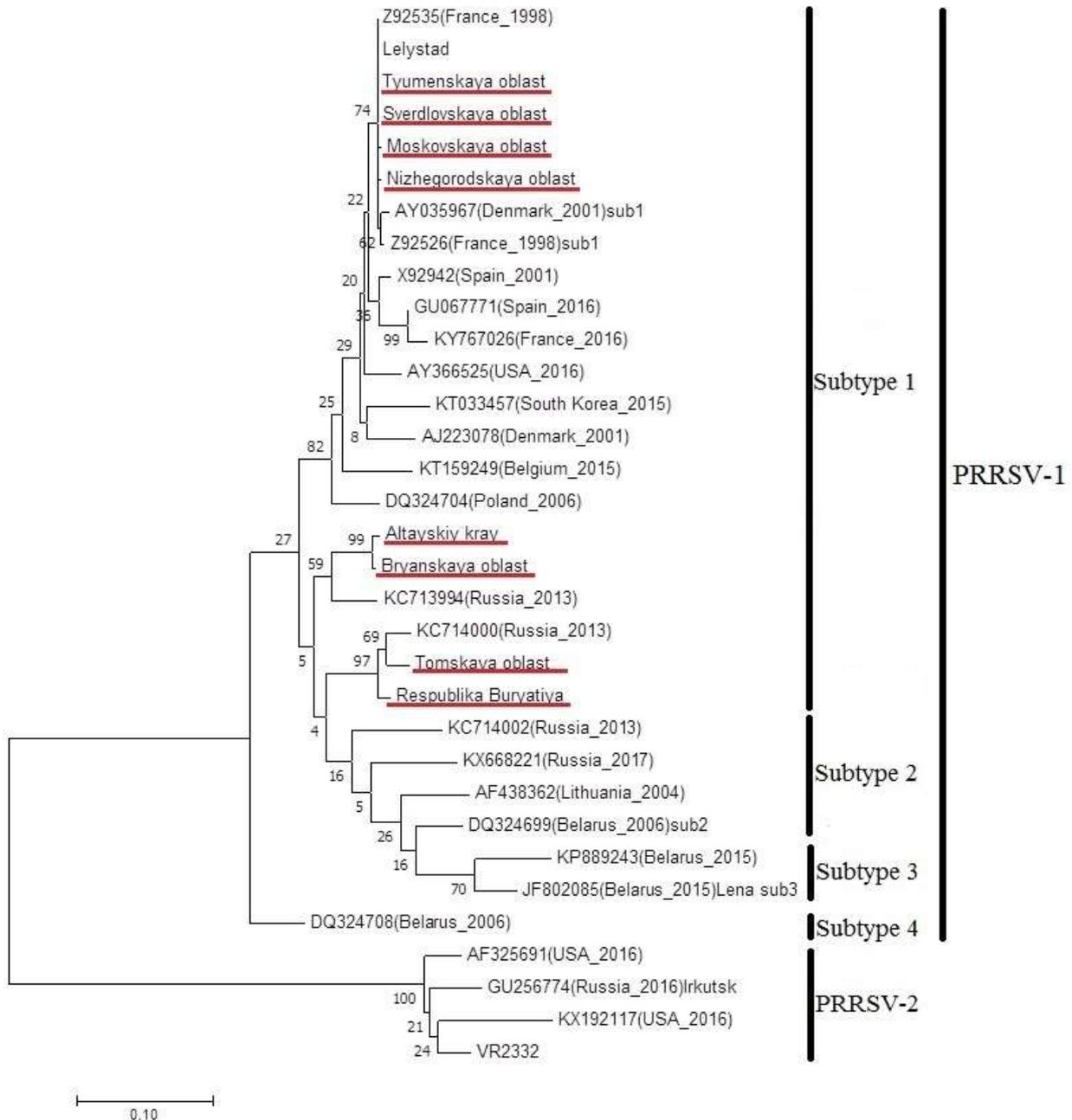


Рисунок – 1. Филогенетическая дендрограмма, полученная на основании определения фрагментов генома ORF-7 вируса PPRC (376 п.н.)

## 2.2.2 Оценка распространенности и анализ генетической variability ЦВС-2 в свиноводческих хозяйствах РФ

Алгоритм диагностических исследований на ЦВС-2 был аналогичен таковому на PPRC. Ретроспективные исследования 5429 проб сывороток крови свиней показали наличие антител к ЦВС-2 в 43,7 % проб, а в хозяйствах сопредельных государств - в 45,1 % от общего числа исследованных проб. Результаты

комплексных исследований проб сыворотки крови свиней, отобранных в 2012-2017 гг., показали значительную распространенность ЦВС-2 в свиноводческих хозяйствах нашей страны (табл.2).

Таблица 2 – Результаты исследования сыворотки крови свиней на наличие ДНК ЦВС-2 и вирус-специфических антител

Регион №	Название области (республики)	Количество хозяйств	Всего проб	Положительные пробы			
				ИФА		ПЦР	
				Количество	%	Количество	%
1	Московская	2	651	413	63,4	162	24,9
2	Томская	2	353	199	56,4	163	46,2
3	Свердловская	2	4921	1977	40,2	120	2,4
4	Тюменская	2	52	37	71,2	30	57,7
5	Алтайский	1	303	193	63,7	189	62,4
6	Нижегородская	1	20	20	100,0	20	100
7	Брянская	1	13	13	100,0	12	92,3
8	Бурятия	1	1447	82	5,7	37	2,6
9	Белгородская	1	96	77	80,2	29	30,2
10	Татарстан	1	37	0	0	0	0
Всего		14	7893	3011	38,1	762	9,7

Результаты, приведенные в табл.2, показали, что в хозяйствах всех 9 регионов, где были выявлены вирус-специфические антитела, было установлено наличие ДНК ЦВС-2, что свидетельствовало об их неблагополучии по данному заболеванию. При исследовании патологического материала ДНК ЦВС-2 была выявлена в 36 пробах, что составило 38,7% от общего числа исследованных. Для получения информации о генетической вариабельности ЦВС-2 на территории РФ, и определения его филогенетических характеристик, ПЦР-положительные пробы, отобранные в 8 регионах РФ, были исследованы методом секвенирования генов (рис. 2).

Анализ дендрограммы свидетельствует о том, что изоляты ЦВС-2 из Тюменской, Нижегородской, Томской областей и Алтайского края крайне близки к ранее известным последовательностям относящимся к ЦВС-2b и составляют с ними одну генетическую группу. В эту группу входят вирусные изоляты ЦВС-2, выделенные на территории Китая, Великобритании, Словакии, Швейцарии,

Бразилии и Малайзии в период с 2004 г. до настоящего времени и относящиеся к генотипу ЦВС-2b.

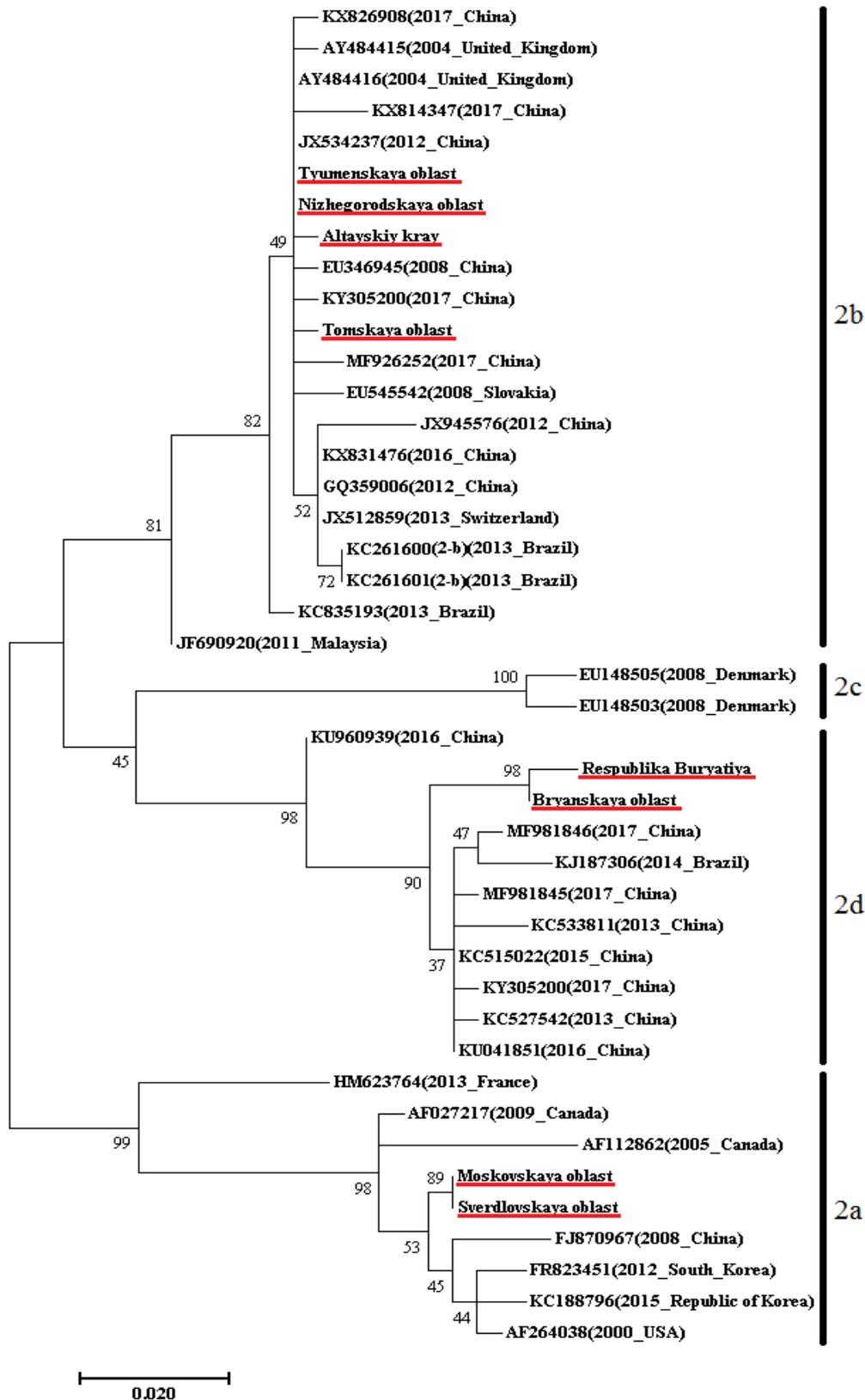


Рисунок – 2. Филогенетическая дендрограмма, полученная на основании фрагментов генома ORF-2 ЦВС-2 (307 п.н.)

Изоляты ЦВС-2 из Московской и Свердловской областей генетическими последовательностями выделенными с 2000 по 2015 гг. в Канаде, Китае, Южной Корее, КНДР и США и относящимися к генотипу ЦВС-2а. Последовательности изолятов ЦВС-2 из Брянской области и Республики Бурятия, близки к последовательностям изолятов, выделенных в 2013 - 2017 гг. в Китае и Бразилии, относящихся к генотипу ЦВС-2d, образуя с ними общую генетическую группу. Изолятов цирковируса, относящихся к генотипу ЦВС-2с обнаружено не было.

В связи с высокой патогенностью ЦВС-2b важной задачей являлась разработка эффективного метода его выявления (см. раздел 2.2.5).

### 2.2.3. Оценка распространенности подтипов вируса гриппа А в свиноводческих хозяйствах РФ

С помощью ИФА антитела к ВГА были выявлены в 13 из 14 хозяйств 9 из 10 исследуемых регионов РФ, при этом РНК вируса была обнаружена в хозяйствах 4 исследуемых регионах РФ, и в значительно меньшем количестве проб (табл.3).

Таблица 3 – Результаты исследования сыворотки крови свиней на наличие РНК ВГА и вирус-специфических антител

Регион №	Название области (республики)	Количество хозяйств	Всего проб	Положительные пробы			
				ИФА		ПЦР	
				Количество	%	Количество	%
1	Московская	2	651	501	77,0	18	2,8
2	Томская	2	353	241	68,3	6	1,7
3	Свердловская	2	4921	291	5,9	4	0,08
4	Тюменская	2	52	28	53,8	7	13,5
5	Алтайский	1	303	174	57,4	0	0
6	Нижегородская	1	20	20	100,0	0	0
7	Брянская	1	13	4	30,8	0	0
8	Бурятия	1	1447	40	2,8	0	0
9	Белгородская	1	96	72	75,0	0	0
10	Татарстан	1	37	0	0	0	0
Всего		14	7893	1371	17,4	35	0,4

Для определения подтипа ВГА пробы сыворотки крови из 5 хозяйств, давшие положительный результат в ПЦР и ИФА, были дополнительно исследованы в РТГА.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что в последние годы в свиноводческих хозяйствах на территории РФ циркулируют следующие подтипы вируса гриппа А: Н1N2; Н3N8 - Московская область, хозяйство №1; Н1N2 - Московская область, хозяйство №2; Н2N3 - Томская область; Н1N2; Н2N3 - Тюменская область; Н2N3 - Свердловская область.

#### **2.2.4. Оценка распространенности вируса РРСС-1, ЦВС-2 и ВГА в форме моно- и смешанных инфекций**

Известно, что ВРБС могут быть обусловлены как моно -, так и смешанными вирусными инфекциями, причем последние протекают в наиболее тяжелой форме. Для оценки распространенности изучаемых вирусов, циркулирующих в моно – и смешанных формах, провели системный анализ полученных результатов ИФА и ПЦР (табл.4).

Данные табл. 4 свидетельствуют о том, что РНК вируса РРСС-1 в большинстве случаев идентифицировали вместе с ДНК ЦВС-2 (5,2%), тогда как в форме моноинфекции ее выявили у 0,57% исследованных проб. ДНК ЦВС-2 в форме моноинфекции обнаружили у 4% свиней, при этом количество серопозитивных животных составило 20%, что являлось абсолютным максимумом по обследованным хозяйствам. Количество серопозитивных животных, одновременно содержащих антитела к вирусу РРСС-1 и ЦВС-2; ЦВС-2 и ВГА; РРСС-1, ЦВС-2 и ВГА составило 5,1%, 7,4% и 5,7% соответственно. На фоне имеющихся вирус-специфических антител (2,7%) не было зафиксировано случаев моноинфекции, вызванной ВГА, который был идентифицирован в двух случаях вместе с вирусом РРСС-1, 11 случаях – вместе с ЦВС-2 и в 22 случаях вместе с этими двумя вирусам.

Таблица 4 – Систематизированные результаты исследования сыворотки крови свиней на наличие нуклеиновых кислот вируса РРСС-1, ЦВС-2, ВГА и вирус-специфических антител

№, название региона	N*	п**	ВРРСС****		ЦВС-2		ВГА		ВРРСС+ЦВС-2		ВРРСС+ВГА		ЦВС-2+ВГА		ВРРСС + ЦВС-2 + ВГА	
			ИФА	ПЦР	ИФА	ПЦР	ИФА	ПЦР	ИФА	ПЦР	ИФА	ПЦР	ИФА	ПЦР	ИФА	ПЦР
1. Московская область	2	651	8 *** (1,2%)	5 (10%)	34 (5,2%)	55 (19,2%)	131 (20,1%)	0	98 (15,1%)	91 (14%)	79 (12,1%)	2 (0,3%)	166 (25,5%)	5 (0,76%)	115 (17,7%)	11 (1,7%)
2. Томская область	2	353	4 (1,1%)	14 4%	4 (1,1%)	55 (15,6%)	63 (17,8%)	0	17 (4,8%)	102 (28,9%)	10 (2,8%)	0	79 (22,4%)	2 (0,57%)	99 (28%)	4 (1,1%)
3. Свердловская область	2	4921	7 (0,14%)	6 (0,12%)	1469 (29,9%)	48 (0,98%)	6 (0,12%)	0	259 (5,3%)	68 (1,4%)	36 (0,7%)	0	85 (1,7%)	2 (0,04%)	164 (3,3%)	2 (0,04%)
4. Тюменская область	2	52	0	3 (5,8%)	9 (17,3%)	3 (5,8%)	3 (5,8%)	0	3 (5,8%)	20 (38,5%)	0	0	13 (25%)	2 (3,8%)	12 (23,1%)	5 (9,6%)
5. Алтайский край	1	303	0	11 (3,6%)	28 (9,2%)	104 (34,3%)	10 (3,3%)	0	1 (0,3%)	85 (28,1%)	0	0	161 (53,1%)	0	3 (1%)	0
6. Нижегородская область	1	20	0	0	0	3 (15%)	0	0	0	17 (85%)	0	0	7 (35%)	0	13 (65%)	0
7. Брянская область	1	13	0	1 (7,7%)	3 (23,1%)	4 (30,8%)	0	0	6 (46,2%)	8 (61,5%)	0	0	0	0	4 (30,4%)	0
8. Республика Бурятия	1	1447	0	5 (0,35%)	30 (2,1%)	18 (1,2%)	0	0	18 (1,2%)	19 (1,3%)	6 (0,4%)	0	5 (0,3%)	0	29 (2%)	0
9. Белгородская область	1	96	0	0	4 (4,2%)	29 (30,2%)	0	0	1 (1%)	0	0	0	65 (67,7%)	0	7 (7,3%)	0
10. Республика Татарстан	1	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Всего	14	7893	19 (0,24%)	45 (0,57%)	1581 (20%)	319 (4%)	213 (2,7%)	0	403 (5,1%)	410 (5,2%)	131 (1,7%)	2 (0,03%)	581 (7,4%)	11 (0,14%)	446 (5,7%)	22 (0,3%)

Примечание: \* - количество хозяйств; \*\* - количество исследованных проб; \*\*\* - количество и % положительных проб приведены от общего количества исследованных; \*\*\*\* - ВРРСС – вирус РРСС-1.

### 2.2.4 Разработка тест-системы для выявления ЦВС-2b методом полимеразной цепной реакции

Для получения положительного контроля была сконструирована рекомбинантная плазида, содержащая фрагмент генома ЦВС-2b. Плазмиду получали с помощью векторной системы клонирования продуктов ПЦР - pGEM-T-Easy («Promega», США). Используя праймеры 2b-F и 2b-R, был получен фрагмент генома ЦВС-2b размером 360 п.о. Полученный фрагмент выделили из геля, очистили, встроили в искусственные вектора pGEM-T Easy, и провели трансформацию в клетки *E.coli*. Далее были получены колонии, содержащие рекомбинантные плазмиды. Плазмиды, оказавшиеся положительными в ПЦР, секвенировали с целью подтверждения правильности клонирования.

Массовую концентрацию полученной рекомбинантной плазмиды определяли с помощью спектрофотометра при длине волны  $\lambda=260$  нм. Среднее значение массовой концентрации рассчитывалось по результатам серии измерений на приборе. Молекулярные концентрации были пересчитаны из массовых в соответствии с формулой:

$$n = (C \times N_A) / (X_{п. о.} \times M_{1 п. о.}), \text{ где}$$

- $n$  (молекул/мкл) – молекулярная концентрация плазмиды;
- $C$  (г/мкл) – массовая концентрация плазмиды в растворе;
- $N_A = 6,022 \times 10^{23}$  (молекул/моль) – число Авогадро;
- $X_{п. о.}$  = число пар нуклеотидных оснований (п. о.) в составе плазмиды (общее число пар нуклеотидов плазмиды складывается из значения универсального вектора (3015 п.н.) и размера плазмиды (143 п.н.);
- $M_{1 п. о.} = 660$  (г/моль) – средняя молярная масса 1 п. о.

Среднее значение оптической плотности составило 0,049 мкг/мкл. Количество копий ДНК -  $1,42 \times 10^{10}$  мол/мкл.

Для разработки тест-системы был выбран «гнездового» вариант ПЦР.

Олигонуклеотидные праймеры, для проведения ПЦР, были подобраны на основе сравнительного анализа последовательностей геномов ЦВС-2 взятых из

базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank, которые были выровнены с помощью программы MEGA 7.1, где была определена консервативная область, специфичная для подтипа ЦВС-2b. На основе этого фрагмента были разработаны две пары праймеров: праймеры для первого раунда ПЦР (PCV2-F и PCV2-R) (захватывают часть ORF-2 и часть ORF-1); праймеры для второго раунда ПЦР (2b-F и 2b-R) (табл. 5). Праймеры 2b-F и 2b-R, также были использованы на этапе получения рекомбинантной плазмиды содержащей фрагмент генома ЦВС-2b.

Таблица 5 – Набор праймеров использованный для выявления ЦВС-2b

Название праймеров	Последовательность праймеров	Величина фрагмента ДНК
PCV2-F	GAA GAA TGG AAG AAG CGG	1494 п.о.
PCV2-R	CAG TCA GAA CGC CCT CCT	
2b-F	CTG TTT TCG AAC GCA GTG	360 п.о.
2b-R	CTC AAA CCC CCG CTC TG	

В ходе оптимизации условий реакции ПЦР, где в качестве матрицы использовалась полученная ранее рекомбинантная плаزمиды содержащая фрагмент генома ЦВС-2b, были подобраны оптимальные температурно-временные режимы для обоих раундов амплификации.

Для определения специфичности разработанной тест-системы, была использована панель образцов содержащая различные вирусы и бактерии, вызывающие схожие с ЦВС-2b нарушения у свиней, а также другой, широко распространённый на территории РФ, подтип - ЦВС-2a (рис.3). Полученные результаты продемонстрировали 100% специфичность разработанной ПЦР для выявления ЦВС-2b. Аналитическую чувствительность разработанной тест-системы определяли, исследуя серию последовательных десятикратных разведений (до  $10^{-10}$ ) рекомбинантной плазмиды, содержащей фрагмент генома ДНК ЦВС-2b (рис.4).

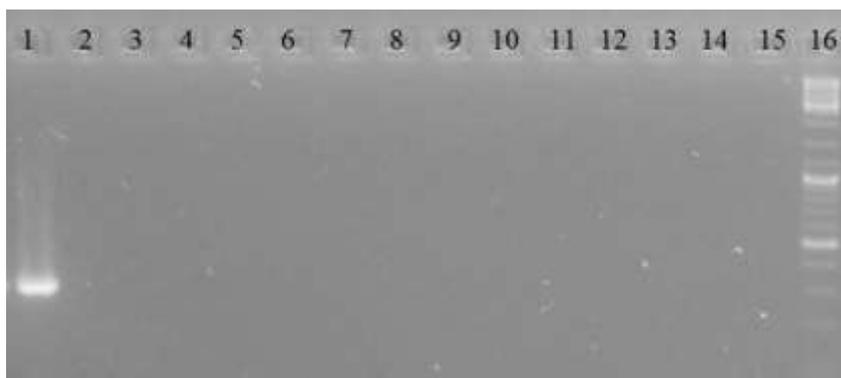


Рисунок 3 – Определение специфичности разработанной тест-системы ПЦР. 1 – ЦВС-2b; 2- культура клеток ППЭС заражённая ПВС *um. Ил-82*; 3 - вирус РРСС *um. Lelystad*; 4 - вирус КЧС *um. KC*; 5 - вирус гриппа А A/swine/HongKong/9/98; 6 - вирус болезни Ауески *um. K*; 7 - респираторный коронавирус свиней; 8 - *Leptospira* (серогр. *Pomona*); 9 - *Streptococcus suis*; 10 - *Mycoplasma hyopneumoniae*; 11- *Pasteurella multocida* (серовары А, В, Д); 12 - *Chlamydia suis*; 13 – *Salmonella choleraesuis*; 14 – исследуемые образцы; 14- ЦВС-2а; 15 - отрицательный контроль; 16 - маркер молекулярной массы.

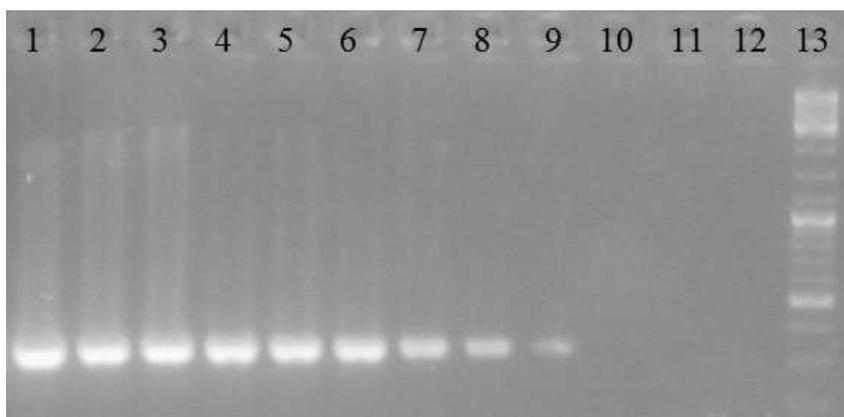


Рисунок 4 – Определение аналитической чувствительности разработанной тест-системы ПЦР. 1–исходная рекомбинантная плазмида; 2–11 - разведения рекомбинантной плазмиды  $10^{-1}$ - $10^{-10}$ ; 12 – отрицательный контроль; 13- маркер молекулярной массы.

Анализ полученных результатов позволил заключить, что разработанная тест-система выявляет ДНК ЦВС-2b в разведении рекомбинантной плазмиды до  $10^{-8}$ , что соответствует  $1,42 \times 10^2$  мол/мл.

Для оценки практической эффективности разработанной тест-системы было исследовано 90 проб сыворотки крови свиней, полученных из свиноводческого хозяйства РФ, неблагополучного по ЦВБС, 24 из которых (26,7%) из которых оказались положительными (табл.6).

Таблица 6 – Результаты выявления ЦВС-2b с помощью разработанной ПЦР

№	Исследуемый материал	Количество исследованных образцов	Количество положительных проб
1	Сыворотка крови поросят (20-30 дней)	11	3
2	Сыворотка крови поросят (50-70 дней)	12	2
3	Сыворотка крови поросят (90-110 дней)	11	3
4	Сыворотка крови ремонтных свинок (220-240 дней)	15	4
5	Сыворотка крови основных свиноматок	17	5
6	Паховые лимфоузлы от павших поросят (60-100 дней)	9	2
7	Легкие от павших поросят (60-120 дней)	10	4
8	Печень от павших поросят (60-110 дней)	5	1
Всего		90	24

Таким образом, разработанная тест-система оказалась пригодной для рутинных диагностических исследований с целью обнаружения ЦВС-2b в пробах биологического материала свиней различного происхождения.

### 3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

#### 3.1. Выводы:

1. Выявлено, что по результатам серологического обследования распространенность вируса РРСС в среднем по России составила 13,4% (2004-2011 гг.) и 12,7% в 2012-2017 гг.; ЦВС-2 – 41% и 38,1% соответственно. РНК вируса РРСС выявлена у 6,1% обследованных свиней, ДНК ЦВС-2 - у 9,7% животных соответственно (2012-2017 гг.).

2. Продемонстрировано, что показатели распространенности вируса РРСС и ЦВС-2 значительно варьировали в зависимости от региона страны, года исследования и благополучия хозяйств по вирусным респираторным болезням свиней. Так в ряде неблагополучных хозяйств по наличию генетического

материала вируса и соответствующих по специфичности антител они превышали 50%-ное значение.

3. Филогенетический анализ вируса РРСС, циркулирующего в нашей стране, выявил его значительную генетическую вариабельность. Идентифицированы изоляты вируса РРСС европейского типа 1-го субтипа, родственные изолятам, циркулирующим в Западной Европе и обнаружена отдельная генетическая группа изолятов вируса РРСС европейского типа 1-го субтипа, характерная только для Российской Федерации. Вирус РРСС американского генотипа (вирус РРСС-2) в обследованных регионах выявлен не был.

4. Филогенетический анализ изолятов ЦВС-2 показал распространение на территории Российской Федерации трех наиболее известных генотипов вируса: ЦВС-2а, 2b и 2d, соответственно.

5. Выявлено, что по результатам серологического обследования распространенность вируса гриппа А в популяции свиней в среднем по России составила 17,4% (2012-2017гг.), РНК вируса была выявлена у 0,4% обследованных животных. Установлено, что циркулирующий вирус относился к Н1N2, Н2N3 и Н3N8 подтипам ВГА.

6. Установлено, что смешанные вирусные инфекции чаще всего обусловлены ассоциацией ЦВС-2 и вируса РРСС-1. В виде моноинфекции чаще всего в обследованных хозяйствах циркулировал ЦВС-2.

7. На основе консервативной последовательности гена ORF2 ЦВС-2b разработана диагностическая «Тест-система для выявления цирковируса свиней II типа b подтипа методом полимеразной цепной реакции». По результатам испытаний установлено, что специфичность тест-системы составила 100%, аналитическая чувствительность -  $1,42 \times 10^2$  молекул/мкл.

### **3.2. Практические предложения**

1. Рекомендуется проводить комплексные диагностические исследования свинопоголовья на РРСС, ЦВС-2 и грипп А при ввозе, перемещении животных и комплектовании стада, независимо от их статуса вакцинации.

2. При проведении профилактической вакцинации против ВРБС в каждом конкретном хозяйстве рекомендуется применять препарат, содержащий в своем составе подтип вируса РРСС-1 или ЦВС-2, близкий по филогенетическому родству циркулирующему вирусу.

3. Разработанную тест-систему ПЦР для выявления ЦВС-2b рекомендуется использовать для диагностических и мониторинговых исследований.

4. Рекомбинантная плазида, содержащая фрагмент генома ЦВС-2b, может быть использована в качестве универсального положительного контроля в тест-системах аналогичной направленности.

### **3.3. Перспективы дальнейшей разработки темы**

Основным направлением данной темы являлось изучение распространения вируса РРСС-1, ЦВС-2, вируса гриппа А и их генетической вариабельности в хозяйствах различных регионов России с целью повышения эффективности применяемых и разрабатываемых средств диагностики и специфической профилактики ВРБС. Полученные результаты указывают важность дальнейшей работы в этом направлении, заключающейся в проведении регулярного эпизоотологического мониторинга инфекций, выявления новых генетически измененных вариантов вирусов, изучения их биологических свойств, включения в состав вакцин и разработке лабораторных тестов для их идентификации. Такой комплексный подход к проблеме будет способствовать снижению инцидентности ВРБС и оздоровлению поголовья свиней нашей страны.

## **4. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Влияние колострального иммунитета на антигенную активность вакцины "Веррес-Цирко" и распределение изотип-специфических антител в иммунном ответе к цирковирусу свиней второго типа / С.А. Раев, М.А. Арутюнова, В.В. Цибезов, А.Д. Булгаков, М.И. Мусиенко, О.А. Верховский, А.Д. Забережный, Т.И. Алипер // Ветеринария. – 2015. – № 11. – С.26-31.

2. Филогенетический анализ возбудителей респираторно-репродуктивного синдрома и цирковирусной болезни свиней, циркулирующих на территории российской федерации / Т.И. Алипер, **А.Д. Булгаков**, Т.В. Гребенникова, А.Г. Южаков, А.М. Гулюкин // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. – 2015. – Т. 78. – С.57-70.

3. Молекулярно-генетический анализ геномов вирусов респираторно-репродуктивного синдрома свиней и цирковируса второго типа, циркулирующих на территории российской федерации / **А.Д. Булгаков**, Т.В. Гребенникова, А.Г.Южаков, Т.И.Алипер, Е.А.Непоклонов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2014. – № 4. – С.29-33.

4. Разработка тест-системы для обнаружения и дифференциации цирковируса свиней 2-го типа подтипов 2a и 2b на основе множественной ПЦР в реальном времени / О.В. Елисеева, О.Е. Латышев, О.Н. Зайкова, **А.Д. Булгаков**, Т.В. Гребенникова, Е.А. Непоклонов // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2013. - № 3. – С.24-26.

5. Получение рекомбинантного капсидного белка цирковируса свиней второго типа (генотип 2b) в бакуловиральной системе и использование его для изготовления вакцины / С.А. Раев, К.П. Алексеев, Е.В. Шемельков, **А.Д. Булгаков**, М.И. Мусиенко, Б.Г. Орлянкин, О.А. Верховский, Т.И. Алипер // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2012. – № 3. – С.17-19.